



Universidad de Buenos Aires

Facultad de Farmacia y Bioquímica

**Caracterización de la Funcionalidad y el Fenotipo de
Linfocitos T CD8⁺ en Individuos HIV-1 positivos bajo
Tratamiento Antirretroviral Combinado**

Autor: Bioquímica Jimena Patricia Salido

Director: Dra. Gabriela Turk

Consejero de estudios: Dr. Emilio Malchiodi

Lugar de trabajo:

Instituto de Investigaciones Biomédicas en Retrovirus y SIDA (INBIRS, UBA/CONICET)

A mis viejos

“Un padre vale por cien maestros”

Jean-Jacques Rousseau

“El agradecimiento es la memoria del corazón.”

Leo José.

“Las palabras nunca alcanzan cuando lo que hay que decir desborda el alma.”

Julio Cortázar.

A las personas que hicieron posible la realización de este trabajo: los médicos del Grupo Argentino de Seroconversión, especialmente a Pedro Cahn, Omar Sued y María Inés Figueroa; y a todos los participantes del estudio.

A todo el INBIRS! A Horacio por permitirme realizar la tesis en el Instituto. A todas las personas que forman parte de este gran lugar. Qué suerte que tuve de haber caído aquí!

Al comité de seguimiento (mis followers), Flor, Nati y Lourdes, por estar pendientes y ayudarme siempre en todo!

Al mejor grupo de becarios, en cada uno de ustedes he encontrado un amigo.

A Gaby Turk, por haber creído en mí y darme la oportunidad, por todo lo que me enseñaste y estar siempre al pie del cañón. Gracias por haber sido la mejor directora. Un placer enorme haber trabajado codo a codo con vos!

A Jorge Geffner, por hacerlo posible.

Al grupo Turk, Nanu, Julita y César, por decir que Sí! Por trabajar siempre en equipo, porque todo fue más fácil con ustedes como compañeros de grupo, AMIGOS de grupo.

A Mariacin, por las eternas charlas, las salidas, las risas, por ser una gran amiga y mi compinche en todo este lío. Nada hubiera sido lo mismo sin vos. Te quiero!

A mis amigos, la familia que elegí, por el aguante infinito.

A mi familia toda, he extrañado los domingos con ustedes siempre.

A mis lolos, los mejores que me podrían haber tocado.

A mis viejos, por el apoyo incondicional, por hacernos lo que somos, por hacer suyos nuestros logros, por ser un ejemplo para nosotros. Por TODO! Este título es también de ustedes.

A mis hermanos, (Marian, Carla, Choli y Cacho), todo es más divertido cuando estamos juntos.

A Ricky, gracias por tu amor, gracias por estar, gracias por amarme sin dudar (afuera nos espera otra batalla). Te amo C.!!!

A todos....**Gracias!**

Parte de los resultados incluidos en esta tesis han sido publicados en:

Phenotype, Polyfunctionality, and Antiviral Activity of *in vitro* Stimulated CD8⁺ T-Cells from HIV⁺ Subjects Who Initiated cART at Different Time-Points after Acute Infection

Jimena Salido, María Julia Ruiz, César Trifone, María Inés Figueroa, María Paula Caruso, María Magdalena Gherardi, Omar Sued, Horacio Salomón, Natalia Laufer, Yanina Ghiglione y Gabriela Turk.

Frontiers in Immunology 2018, Oct 23;9:2443. doi: 10.3389/fimmu.2018.02443. eCollection 2018.

RESUMEN

Diversas estrategias han sido propuestas en la búsqueda de una cura a la infección por HIV, muchas dependen de la actividad antiviral de los LT CD8⁺ (LTCD8). El objetivo de esta tesis fue investigar la funcionalidad y el fenotipo LTCD8 HIV-específicos expandidos *in vitro*, obtenidos de individuos HIV⁺ bajo tratamiento antirretroviral combinado (cART). Según el momento de inicio del cART, se reclutaron dos grupos, grupo de inicio del tratamiento temprano (TTe) o tardío (TTa). Se obtuvieron células mononucleares de sangre periférica y fueron expandidas con *pools* de péptidos de Nef y Gag. Post-expansión se evaluó sobre los LTCD8 la especificidad, funcionalidad, diferenciación del fenotipo de memoria, expresión de PD-1, y la actividad antiviral. A pesar de que la respuesta se encuentra disminuida post-cART, ésta pudo ser específicamente expandida *in vitro*, demostrando un perfil polifuncional y de memoria efectora, y elevada capacidad de mediar actividad antiviral. El momento de inicio del tratamiento impactó en la diferenciación del fenotipo de memoria, posiblemente reflejando diferencias en la duración de la estimulación antigénica sobre el sistema inmune. En ambos grupos, se encontraron características de la respuesta inmune antes del cART que podrían actuar como biomarcadores de las células que persisten post-cART. Estos resultados tienen implicancias importantes en el diseño de estrategias que busquen modular la respuesta LTCD8.

PALABRAS CLAVES: HIV, remisión virológica, LT CD8⁺ expandidos, polifuncionalidad y fenotipo, actividad antiviral, tiempo de inicio del cART.

ABSTRACT

Several strategies have been proposed in the quest for an HIV cure, many rely on CD8⁺ T cells (CD8TC) antiviral activity. In this thesis, the functionality and phenotype of *in vitro* expanded HIV-specific CD8TC, obtained from HIV⁺ subjects on combined antiretroviral treatment (cART), was investigated. According to the momento of cART initiation, two groups were recruited: early treatment (TTe) or delayed treatment (TTa) groups. Peripheral blood mononuclear cells were obtained and expanded using Nef and Gag peptide pools. Post-expansion, CD8TC specificity, functionality, memory phenotype differentiation, PD-1 expression, as well as antiviral activity were assessed. Even though, post-cART HIV specific immune response results deeply diminished, it could be selectively expanded, demonstrating a polifunctional and effector memory/effector profiles, as well as strong antiviral activity. Differences in cART initiation timing affected mainly memory phenotype differentiation, possibly reflecting the impact of antigenic stimulation on the immune system. In both groups, characteristics of the immune response observed before cART could be proposed as biomarkers of the functionality of CD8TC that persist post-cART. In sum, these results have important implications in the design of strategies aimed at boosting CD8TC beneficial responses.

KEY WORDS: HIV viral remission, expanded CD8⁺ T-cell response, polyfunctionality and phenotype, antiviral activity, time of cART initiation.

ÍNDICE:

LISTADO DE FIGURAS Y TABLAS	VII
ABREVIATURAS	XII
I. INTRODUCCIÓN	1
I. 1. VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA	2
I. 2. EPIDEMIOLOGÍA	3
I. 2. 1. <i>Situación Mundial</i>	3
I. 2. 2. <i>Situación en Argentina</i>	4
I. 2. 3. <i>Epidemiología Molecular</i>	5
I. 3. EL VIRIÓN	7
I. 3. 1. <i>Estructura viral y organización genómica</i>	7
I.3.1.1. <i>Morfología</i>	7
I.3.1.2. <i>Genoma</i>	8
I. 3. 2. <i>Ciclo de Replicación</i>	9
I. 4. INMUNOPATOGENIA	11
I. 4. 1. <i>Curso natural de la infección por HIV</i>	11
I. 4. 2. <i>Curso de la infección en tiempos de cART</i>	13
I. 5. <i>ESTRATEGIAS PLANTEADAS PARA LOGRAR LA REMISIÓN VIROLÓGICA SOSTENIDA</i>	16
I. 6. <i>RESPUESTA T CD8+ HIV-ESPECÍFICA DURANTE EL CURSO NATURAL DE LA INFECCION Y EN INDIVIDUOS BAJO TRATAMIENTO</i>	17
II. OBJETIVOS E HIPÓTESIS	23
II. 1. OBJETIVO GENERAL	24
II. 1. 1. <i>Objetivos específicos</i>	24
II. 2. HIPÓTESIS DE TRABAJO	26
III. MATERIALES & MÉTODOS	28
III. 1. POBLACIÓN EN ESTUDIO	30
III. 2. PROCESAMIENTO DE MUESTRAS	31
III. 3. PÉPTIDOS	32
III. 4. EXPANSIÓN DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA	32

III. 5. ENSAYO DE ELISPOT (PRE Y POST-EXPANSIÓN)	33
III. 6. MARCADO DE MOLÉCULAS DE SUPERFICIE E INTRACELULARES	34
III. 6. 1. Evaluación de la polifuncionalidad de la población celular T CD8 ⁺ específica: capacidad de degranulación (expresión en membrana de CD107A/B) y secreción de citoquinas (IFN- γ , IL-2, TNF- α y MIP-1 β)	35
III. 6. 2. Evaluación del fenotipo (en términos de expresión de marcadores de memoria y agotamiento) en las poblaciones T CD8 ⁺ total y HIV-específica	36
III. 6. 3. Activación inmune	37
III. 6. 4. Citometría de flujo: adquisición y análisis de datos	37
III. 7. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIVIRAL (POST-EXPANSIÓN)	40
III. 7. 1. Ensayo de Inhibición Viral (VIA, Viral Inhibition Assay)	43
III.7.1.1. Generación de los Stocks Virales	43
III.7.1.2. Infección y co-cultivo	44
III. 7. 2. Evaluación de la citotoxicidad directa (Ensayo VITAL)	45
III. 8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	48
III. 9. RESUMEN DE ENSAYOS REALIZADOS Y ESQUEMA GRÁFICO DE TRABAJO	49
IV. RESULTADOS	51
IV. 1. DESCRIPCIÓN DE LA POBLACIÓN EN ESTUDIO	52
IV. 2. ANÁLISIS DE LA RESPUESTA CELULAR T CD8 ⁺ HIV-ESPECÍFICA MEDIANTE ELISPOT EN LA MUESTRA POST-TRATAMIENTO (PRE- Y POST-EXPANSIÓN)	57
IV. 2. 1. Magnitud de la respuesta HIV-específica evaluada luego de la expansión en los individuos reclutados	58
IV. 3. ANÁLISIS DE LA POLIFUNCIONALIDAD DE LOS LT CD8 ⁺ HIV-ESPECÍFICOS POST-EXPANSIÓN ..	62
IV. 4. ANÁLISIS DEL FENOTIPO DE MEMORIA EN LOS LT CD8 ⁺ POST-EXPANSIÓN	65
IV. 4. 1. Distribución de las subpoblaciones de memoria en la población de LT CD8 ⁺ totales post-expansión	65
IV. 4. 2. Distribución de las subpoblaciones de memoria en la población de LT CD8 ⁺ HIV-específicos post-expansión	66
IV. 4. 3. Análisis de la expresión del marcador de muerte celular programada PD-1 y distribución de las subpoblaciones de memoria en la población de LT CD8 ⁺ PD-1 ⁺ post-expansión	67

IV. 5. ANÁLISIS DE LA CAPACIDAD DE MEDIAR ACTIVIDAD ANTIVIRAL DE LOS LT CD8 ⁺ HIV-ESPECÍFICOS POST-EXPANSIÓN	71
IV. 5. 1. Capacidad de los LT CD8 ⁺ HIV-específicos expandidos de inhibir la replicación viral in vitro (VIA) en los grupos TTa y TTe	72
IV. 5. 2. Capacidad de los LT CD8 ⁺ HIV-específicos expandidos de mediar actividad citotóxica directa in vitro (VITAL) en los grupos TTa y TTe	75
IV. 6. RELACIÓN ENTRE LA POLIFUNCIONALIDAD Y LA DISTRIBUCIÓN DE LAS SUBPOBLACIONES DE MEMORIA EN LA POBLACIÓN T CD8 ⁺ CON LA CAPACIDAD DE MEDIAR ACTIVIDAD ANTIVIRAL POST-EXPANSIÓN	77
IV. 6. 1. Relación entre la capacidad de inhibir la replicación viral in vitro (VIA) y la frecuencia de las subpoblaciones de memoria observadas en las muestras post-expansión	77
IV. 6. 2. Relación entre la capacidad de mediar citotoxicidad directa in vitro (VITAL) y la frecuencia de subpoblaciones de memoria y células polifuncionales observadas en las muestras post-expansión	78
IV. 6. 3. Análisis de la expresión del factor de muerte celular programada 1 (PD-1) y su asociación con la polifuncionalidad y la actividad antiviral de los LT CD8 ⁺ post-expansión	80
IV. 7. CALIDAD DE LA RESPUESTA INMUNE ANTES DEL INICIO DEL TRATAMIENTO Y SU RELACIÓN CON LAS CARACTERÍSTICAS DE LA RESPUESTA T CD8 ⁺ HIV-ESPECÍFICA EVALUADA EN MUESTRAS POST-TRATAMIENTO Y LUEGO DE LA EXPANSIÓN <i>IN VITRO</i>	82
IV. 7. 1. Perfil polifuncional de los LT CD8 ⁺ HIV-específicos evaluado ex vivo en las muestras obtenidas antes del inicio del cART	82
IV. 7. 2. Análisis del perfil de diferenciación de memoria en los LT CD8 ⁺ totales, HIV-específicos y PD-1 ⁺ , evaluados ex vivo en las muestras obtenidas antes del inicio del cART	85
IV. 7. 3. Relaciones entre la calidad de la respuesta T CD8 ⁺ evaluada en las muestras tomadas previo al inicio del cART, y la progresión clínica y funcionalidad inmune en las muestras post-cART	93
IV.7.3.1. Relación entre la calidad de la respuesta inmune evaluada en las muestras basal y pre-cART y los aspectos clínicos evaluados en las muestras tomadas luego de un año de iniciado el tratamiento (post-cART)	94
IV.7.3.2. Relación entre la calidad de la respuesta evaluada en las muestras basales y los aspectos evaluados en las muestras post-cART post-expansión	98
IV.7.3.3. Relación entre la calidad de la respuesta evaluada en las muestras pre-cART y los aspectos evaluados en las muestras post-cART post-expansión	100
V. DISCUSIÓN	103

VI. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS..... 115

VII. REFERENCIAS..... 118

LISTADO DE FIGURAS Y TABLAS**FIGURAS****Capítulo I**

Figura 1: Número estimado de personas viviendo con HIV al año 2017 en el mundo.

Figura 2: Situación epidemiológica en Argentina.

Figura 3: Esquema general de la distribución mundial de subtipos y formas recombinantes.

Figura 4: Esquema de la partícula viral madura.

Figura 5: Esquema del genoma proviral del HIV.

Figura 6: Esquema simplificado del ciclo de replicación del HIV.

Figura 7: Curso natural de la infección por HIV.

Figura 8: Cinética de la carga viral plasmática al interrumpir el cART.

Figura 9: Patogénesis de la Activación Inmune.

Figura 10: Casos de remisión virológica sostenida o transiente de la CV en ausencia de cART.

Figura 11: Esquema de la estrategia de "Shock and Kill".

Figura 12: Eventos significativos que involucran a los LT CD8⁺ durante la infección por HIV (aguda, crónica y tratada).

Figura 13: Modelo de la ruta de diferenciación jerárquica de Linfocitos T.

Capítulo III

Figura 14: Línea de tiempo ilustrando las características de los grupos de estudio y las distintas muestras con las que se trabajó en este estudio.

Figura 15: Estrategia utilizada para la selección y análisis de LT CD8⁺, por citometría de flujo **(A)** Identificación de LT CD8⁺. **(B)** Panel de Polifuncionalidad. **(C)** Panel de Fenotipo de Memoria.

Figura 16: Estrategia utilizada para determinar la pureza del cultivo de LT CD4⁺.

Figura 17: Esquema gráfico del ensayo de VIA.

Figura 18: Esquema gráfico del ensayo VITAL.

Figura 19: Estrategia de selección por citometría de flujo empleada en el ensayo VITAL para determinar el porcentaje de lisis específica.

Figura 20: Esquema gráfico de la estrategia experimental. **(A)** En las muestras post-cART. **(B)** En las muestras basales y/o pre-cART.

Capítulo IV

Figura 21: Parámetros clínicos evaluados en las muestras obtenidas de individuos pertenecientes al grupo TTa (muestra basal, pre-cART y post-cART) y al grupo TTe (muestra basal y post-cART). **(A)** CV plasmática. **(B)** Recuento absoluto de LT CD4⁺. **(C)** Relación CD4/CD8.

Figura 22: Expresión de marcadores de activación inmune celular evaluado en las muestras obtenidas antes de iniciar el cART. **(A)** Activación inmune en LT CD4⁺. **(B)** Activación inmune en LT CD8⁺.

Figura 23: Evaluación de células productoras de IFN- γ mediante ELISPOT, pre- y post-expansión. Pocillos representativos obtenidos: **(A)** control negativo, **(B)** positivo pre-expansión, **(C)** positivo post-expansión luego de sembrar 25.000 células por pocillo y **(D)** positivo post-expansión luego de sembrar 50.000 células por pocillo.

Figura 24: Análisis de la respuesta HIV específica por ELISPOT, pre- y post-expansión. **(A)** Magnitud de la respuesta total anti-Nef, anti-Gag y anti-CEF (SFU/10⁶ PBMCs), antes y después de la expansión *in vitro*. **(B)** Contribución relativa de cada antígeno al total de la respuesta HIV-específica.

Figura 25: Análisis de la calidad de la respuesta específica por ELISPOT mediante la evaluación del tamaño promedio de los *spots* obtenidos para la respuesta anti-Nef, anti-p24 y anti-CEF, pre- y post-expansión.

Figura 26: Perfil de polifuncionalidad de los LT CD8⁺ HIV-específicos post-expansión *in vitro*. **(A)** Gráficos de tortas. **(B)** Gráfico de barras.

Figura 27: Perfil de polifuncionalidad de los LT CD8⁺ con diferente especificidad antigénica (Nef, p24 o CEF), dentro del grupo TTa y TTe. **(A)** Gráficos de torta. **(B)** Gráficos de barras.

Figura 28: Distribución de las subpoblaciones de memoria en los LT CD8⁺ totales post-expansión a partir de muestras de individuos TTa y TTe. **(A)** Gráficos de torta. **(B)** Gráfico de barras.

Figura 29: Distribución de las subpoblaciones de memoria en los LT CD8⁺ Nef-, p24- y CEF-específicos, identificados en base a la producción de citoquinas y/o capacidad de degranulación. **(A)** Gráficos de torta. **(B)** Gráficos de barras.

Figura 30: Expresión de PD-1 en LT CD8⁺ totales y HIV-específicos post-expansión en la muestra post-cART de individuos TTa y TTe.

Figura 31: Distribución de las subpoblaciones de memoria en los LT CD8⁺PD-1⁺ totales analizada post-expansión, en los individuos TTA y TTe. **(A)** Gráficos de torta. **(B)** Gráfico de barras.

Figura 32: Proporción de células PD-1⁺ observadas post-expansión en las subpoblaciones de memoria T_{ME} y T_{ET}, dentro del compartimento T CD8⁺ total, en individuos del grupo TTA y TTe.

Figura 33: Proporción de LT CD8⁺ HIV-específicos (Nef o p24-específicos) observados post-expansión en las subpoblaciones de memoria total T_{ME} y T_{ET}, en individuos del grupo TTA y TTe.

Figura 34: Concentración del antígeno p24 (ng/ml) en sobrenadante del cultivo de células *target* y efectoras, determinado a los días 4 y 7 post-infección.

Figura 35: Ensayo de inhibición viral *in vitro* (VIA) mediado por los LT CD8⁺ Nef- y p24-específicos.

Figura 36: Citogramas obtenidos de un ensayo VITAL representativo.

Figura 37: Porcentaje de lisis específica mediado por LT CD8⁺ Nef- y p24-específicos, determinado por el ensayo VITAL.

Figura 38: Correlaciones entre VIA y el porcentaje de las subpoblaciones de memoria total y HIV-específicas post-expansión. Magnitud de VIA *versus* **(A)** %LT_{SCM} CD8⁺ totales; **(B)** %LT_{MC} CD8⁺ totales; **(C)** %LT_{ET} CD8⁺ totales y **(D)** %LT_{SCM} CD8⁺ HIV-específicos.

Figura 39: Correlaciones entre la magnitud del VITAL (1:5) y las proporciones de LT CD8⁺ HIV-específicos de memoria post-expansión. Porcentaje de lisis específica (VITAL 1:5) *versus* **(A)** %LT_{SCM} CD8⁺ HIV-específicos; **(B)** %LT_{MC} CD8⁺ HIV-específicos; **(C)** %LT_{ET} CD8⁺ HIV-específicos.

Figura 40: Correlaciones entre VITAL 1:5 y la polifuncionalidad de los LT CD8⁺ HIV-específicos post-expansión. Porcentaje de lisis específica (VITAL 1:5) *versus* **(A)** %LT CD8⁺CD107A/B⁺; **(B)** %LT CD8⁺IFN- γ ⁺; **(C)** %LT CD8⁺MIP-1 β ⁺; **(D)** %LT CD8⁺TNF- α ⁺; **(E)** %LT CD8⁺ CD107A/B/IFN- γ ⁺ bifuncionales; **(F)** %LT CD8⁺ CD107A/B/IFN- γ ⁺ trifuncionales; **(G)** %LT CD8⁺ CD107A/B/IFN- γ ⁺ tetrafuncionales y **(H)** %LT CD8⁺ CD107A/B/IFN- γ ⁺/TNF- α ⁺ tetrafuncionales.

Figura 41: Correlaciones entre el %LT CD8⁺ PD-1⁺ HIV-específicos y el % porcentaje de células con distintos perfiles funcionales post-expansión. %LT CD8⁺ PD-1⁺ HIV-específicos *versus* **(A)** %lisis específica (VITAL relación 1:5); **(B)** %LT CD8⁺ capaces de degranular; **(C)** %LT CD8⁺ productores de IFN- γ ; **(D)** %LT CD8⁺ productores de MIP-1 β ; **(E)** %LT CD8⁺ productores de TNF- α ; **(F)** %LT CD8⁺ tetrafuncionales (CD107/IFN- γ /TNF- α más una función extra).

Figura 42: Perfil de polifuncionalidad de los LT CD8⁺ HIV-específicos, en el grupo TTA (muestras basal, pre-cART y post-cART post-expansión) y TTe (muestras basal y post-cART post-expansión). **(A)** Gráficos de torta. **(B)** Gráficos de barras.

Figura 43: Distribución de las subpoblaciones de memoria en los LT CD8⁺ totales en el grupo TTa (muestras basal, pre-cART y post-cART) y TTe (muestras basal y post-cART). **(A)** Gráficos de torta. **(B)** Gráficos de barras.

Figura 44: Distribución de las subpoblaciones de memoria en los LT CD8⁺ HIV-específicos en el grupo TTa (muestras basal, pre-cART y post-cART) y TTe (muestras basal y post-cART). **(A)** Gráficos de torta. **(B)** Gráficos de barras.

Figura 45: Expresión de PD-1 en LT CD8⁺ en el grupo TTa (muestras basal, pre-cART y post-cART) y TTe (muestras basal y post-cART).

Figura 46: Distribución de las subpoblaciones de memoria en los LT CD8⁺PD-1⁺ totales en el grupo TTa (muestras basal, pre-cART y post-cART) y TTe (muestras basal y post-cART). **(A)** Gráficos de torta. **(B)** Gráficos de barras.

Figura 47: Arresto en la diferenciación del perfil de memoria de LT CD8⁺ desde T_{ME} hacia T_{ET}, calculado como el coeficiente $LT_{ME}/(LT_{ME}+LT_{ET})$ previo al cART, en los compartimentos de LT CD8⁺ Totales, LT CD8⁺ HIV-específicos y LT CD8⁺ PD-1⁺; respectivamente.

Figura 48: Correlaciones entre el recuento absoluto de CD4⁺ post-cART *versus* **(A)** %LT_{ME} CD8⁺; **(B)** %LT_{ET} CD8⁺; **(C)** el arresto en la diferenciación de memoria de LT CD8⁺ desde T_{ME} hacia T_{ET}; **(D)** %LT CD8⁺PD-1⁺; **(E)** %LT CD4⁺ HLA-DR⁺ y **(F)** %LT CD4⁺ CD38/HLA-DR⁺, en la muestra pre-cART.

Figura 49: Correlaciones entre la relación CD4/CD8 post-cART *versus* **(A)** %LT_{ME} CD8⁺; **(B)** %LT_{ET} CD8⁺; **(C)** el arresto en la diferenciación de memoria de los LT CD8⁺ desde T_{ME} hacia T_{ET}; **(D)** %LT CD8⁺PD-1⁺; **(E)** %LT CD8⁺ HLA-DR⁺; **(F)** %LT CD8⁺CD38/HLA-DR⁺; **(G)** %LT CD4⁺ HLA-DR⁺ y **(H)** %LT CD8⁺CD38/HLA-DR⁺, en la muestra pre-cART.

Figura 50: Correlaciones entre aspectos evaluados en las muestras basales y aquellos evaluados post-cART post-expansión. **(A)** %LT CD8⁺ pentafuncionales post-cART *vs* %LT_{SCM} CD8⁺ total basal. **(B-G)** VIA post-cART *vs* **(B)** %LT_{ME} HIV-específicos, **(C)** %LT CD8⁺CD38⁺, **(D)** %LT CD8⁺CD38/HLA-DR⁺, **(E)** %LT CD4⁺CD38⁺, **(F)** %LT CD4⁺HLA-DR⁺ y **(G)** %LT CD4⁺ CD38/HLA-DR⁺, en la muestra basal. **(H)** %Lisis específica (VITAL 1:1) post-cART *vs* %LT CD4⁺CD38⁺ basal. **(I)** %Lisis específica (VITAL 1:5) post-cART *vs* %LT CD4⁺CD38⁺ basal.

Figura 51: Correlaciones entre aspectos evaluados en las muestras pre-cART y aquellos evaluados post-cART post-expansión. Correlaciones entre %LT CD8⁺ pentafuncionales post-cART *vs* **(A)** %LT_{SCM} CD8⁺ totales y **(B)** %LT_{SCM} CD8⁺ HIV-específicos pre-cART. **(C-G)** Correlaciones entre VIA post-cART *vs* **(C)** %LT_N CD8⁺ totales, **(D)** %LT_{MC} CD8⁺ totales, **(E)** %LT_{ME} CD8⁺ HIV-específicos, **(F)** %LT_{ME} CD8⁺PD-1⁺ y

(G) %LT CD8⁺ CD38⁺, en las muestras pre-cART. **(H)** Correlación entre %Lisis específica (VITAL 1:1) post-cART y %LT CD4⁺CD38⁺ pre-cART.

TABLAS

Capítulo III

Tabla 1: Anticuerpos monoclonales utilizados según panel.

Tabla 2: Resumen de ensayos realizados en las distintas muestras obtenidas para este estudio.

Capítulo IV

Tabla 3: Datos clínicos correspondientes a los individuos HIV⁺ reclutados.

Tabla 4: Resumen datos clínicos de los grupos bajo estudio.

ABREVIATURAS

aa: Aminoácidos

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADNdc: ADN doble cadena

AEC: 3-amino-9-etil-cabazol

APC: Aloficocianina (*allophycocyanin*)

ARN: Ácido Ribonucleico

ARNm: ARN mensajero

ARNsc+: ARN simple cadena con polaridad positiva

ARV: Virus relacionado al SIDA (*AIDS Related Virus*)

BSA: Seroalbumina bovina (*Bovine serum albumin*)

cART: Tratamiento antirretroviral combinado (*combined antirretroviral treatment*)

CCL4: *C-C motif chemokine ligand 4*

CCR7: Receptor de quimiocinas tipo 7 (*C-C chemokine receptor type 7*)

CEF: Citomegalovirus, *Epstein Barr* e Influenza

CFSE: molécula fluorescente éster de succinimidil-carboxifluoresceína (*carboxyfluorescein succinimidyl ester*)

CMH-I: complejo mayor de histocompatibilidad de clase I

CRF: Formas recombinantes circulantes (*Circulating Recombinant Forms*)

CV: Carga Viral

DMEM: *Dulbecco's modified Eagle Medium*

DMSO: Dimetilsulfóxido

EC: Controladores Elite (*Elite Controllers*)

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético (*Ethylenediaminetetraacetic acid*)

ELISA: ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (*enzyme-linked immunosorbent assay*)

ELISPOT: Ensayo de Puntos por Inmunoabsorción Unida a Enzimas (*Enzyme-Linked ImmunoSpot*)

ETS: Enfermedades de transmisión sexual

-
- FDR: Tasa de descubrimientos falsos (*Discovery Rate False*)
- FITC: Isotiocianato de fluoresceína (*fluorescein isothiocyanate*)
- FMO: fluorescencia menos uno (*fluorescence minus one*)
- FSC-A: *Forward scatter area*
- FSC-H: *Forward scatter height*
- GALT: Tejido linfoide asociado a mucosas (*Gut-associated lymphoid tissue*)
- HAART: Tratamiento antirretroviral de alta eficiencia (*Highly Active Antiretroviral Treatment*)
- HIV: Virus de la inmunodeficiencia humana (*Human Immunodeficiency Virus*)
- HLA: Antígenos Leucocitarios Humanos (*Human Leukocyte Antigen*)
- HTLV-III: Virus Linfotrópico Humano Tipo III (*Human T Lymphotropic Virus Type III*)
- IFN: Interferón
- IL: Interleuquina
- IQ: Rango Intercuartilo (*Interquartile Range*)
- Kb: Kilobases
- LAV: Virus asociado a linfadenopatía (*Lymphadenopathy Associated Virus*)
- LTR: Repeticiones terminales largas (*Long Terminal Repeats*)
- MIP: Proteína inflamatoria de macrófagos (*Macrophage Inflammatory Protein*)
- NIH: Institutos Nacionales de Salud (*National Health Institutes*)
- OMS: Organización Mundial de la Salud
- ON: Durante toda la noche (*Overnight*)
- ONUSIDA: Organización de la Naciones Unidas para la Lucha contra el SIDA
- ORF: Marco de lectura abierto (*Open Reading Frames*)
- PBMC: Células mononucleares de sangre periférica (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*)
- PBS: Solución tamponada de fosfatos (*Phosphate Buffer Saline*)
- PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*)
- PD-1: Marcador de muerte programada 1 (*Programmed cell death 1*)
- PE/Cy7: ficoeritrina-cianina7 (*phycoerythrin-cyanine7*)
- PE: ficoeritrina (*phycoerythrin*)

PerCP-Cy5.5: peridina clorofila proteína-cianina 5.5 (*peridin chlorophyll protein-Cyanine 5.5*)

PFA: Paraformaldehído (*paraformaldehyde*)

PHA: Fitohemaglutinina (*phytohemagglutinin*)

PKH-26: molécula fluorescente roja (*red fluorescent cell linker*)

PMA: Forbol Miristato Acetato

PTE: Potenciales epítopes de células T (*Potential T cell epitopes*)

PVDF: Fluoruro de polivinilideno

rpm: Revoluciones por minuto

RT: Transcriptasa inversa (*Reverse Transcriptase*)

SFB: Suero fetal bovino

SFU: Unidades formadoras de spots (*Spot Forming Units*)

SIDA: Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida

SIV: Virus de la inmunodeficiencia de simios (*Simian Immunodeficiency Virus*)

SSC: *Side-scatter light*

T/F: virus transmitidos/fundadores (*Transmitted/founders*)

T_{ET}: Células T efectoras terminales

T_{MC}: Células T de memoria central

T_{ME}: Células T de memoria efectora

T_N: Células T Naïve

TNF: Factor de necrosis tumoral (*Tumor Necrosis Factor*)

T_{SCM}: Células T *stem* de memoria

VIA: Ensayo de inhibición viral (*Viral inhibition assay*)

VSV: Virus de la Estomatitis Vesicular

WB: *Western Blot*

I. INTRODUCCIÓN

“Lo que sabemos es una gota de agua, lo que ignoramos es el océano”

Isaac Newton

I. 1. VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA

El Virus de la Inmunodeficiencia Humana (HIV, *Human Immunodeficiency Virus*) es el agente etiológico del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA). Las primeras claves acerca de la etiología del SIDA llegaron en 1983, dos años después de su descripción clínica, a partir del trabajo de *Françoise Barré-Sinoussi* [1], en colaboración con un grupo encabezado por *Luc Montagnier*. El agente aislado por este grupo fue denominado Virus Asociado a Linfadenopatía (LAV, *Lymphadenopathy Associated Virus*), debido a que fue aislado a partir de individuos que padecían esa patología. Durante ese año y el siguiente, *Robert Gallo* [2, 3] aisló un retrovirus citopático con tropismo por células T al que denominó Virus Linfotrópico Humano Tipo III (HTLV-III, *Human T Lymphotropic Virus Type III*). Un año después, *Jay Levy* [4] obtuvo un aislamiento viral a partir de células sanguíneas provenientes de un sujeto con SIDA al cual denominó Virus Relacionado al SIDA (ARV, *AIDS Related Virus*). Posteriormente, estudios de microscopía electrónica, entre otros, revelaron que la morfología de estos tres virus era muy similar entre sí y con un género particular de la familia *Retroviridae*, los Lentivirus [5]. Allí se determinó que, de hecho, los tres aislamientos correspondían al mismo agente viral. Finalmente, en 1986, el Comité Internacional de Taxonomía Viral nombró al virus de la manera que hoy se lo conoce: HIV.

En 1986, *Françoise Clavel*, *Montagnier* y colaboradores [6] describieron un tipo distinto de HIV, prevalente en ciertas regiones de África Occidental, al que denominaron HIV-2 para distinguirlo del virus original. Los individuos infectados con HIV-2 también desarrollan SIDA, aunque con un período de latencia clínica más prolongado y menor morbilidad [7].

Durante los 37 años que han transcurrido desde la descripción de los primeros casos a la actualidad, la problemática HIV/SIDA ha afectado a más de 77,3 millones de personas y se ha establecido como una de las principales preocupaciones a nivel de Salud Pública mundial [8].

La aparición del tratamiento antirretroviral como monoterapia alrededor de 1990 y, posteriormente, el desarrollo de terapias combinadas (conocidas inicialmente como *HAART*, *Highly Active Antirretroviral Treatment* y denominadas actualmente *cART*, *combined Antirretroviral Therapy* o terapia antirretroviral combinada), impactaron enormemente sobre la calidad y expectativa de vida de los individuos infectados, cambiando totalmente el paradigma en cuanto a la infección, reduciendo dramáticamente la morbilidad y mortalidad asociada al HIV/SIDA y, de esta manera, transformándola de una infección mortal a una

enfermedad crónica [9] [10]. Sin embargo, aunque se ha convertido en una infección manejable, no existen aún tratamientos que permitan curarla. En este contexto, la problemática de la infección ha movido su foco, siendo ahora de particular interés el desarrollo de terapéuticas que permitan a los individuos infectados alcanzar la remisión virológica sostenida [11] [12].

I. 2. EPIDEMIOLOGÍA

I. 2. 1. Situación Mundial

Datos actualizados provenientes de la Organización de la Naciones Unidas para la Lucha contra el SIDA (ONUSIDA) y de la Organización Mundial de la Salud (OMS) [8] indican que, hasta el año 2017, entre 31,1 y 43,9 millones de personas estaban infectadas con el virus en todo el mundo, con una prevalencia mundial en adultos del 0,8% (*Figura 1*). Durante 2017, se produjeron 1,8 millones de nuevas infecciones y el número de muertes asociadas a SIDA alcanzó los 1,3 millones. Aunque el número de nuevas infecciones continua decreciendo con los años, debido a la incorporación del tratamiento antirretroviral, no lo hace al ritmo necesario para alcanzar las metas mundiales propuestas para el 2020 [13].

En América Latina, se produjeron 100.000 nuevas infecciones durante el 2017, llevando el total de infectados a 1,8 millones. En esta región, se observó que durante el período 2010-2017 el número de nuevas infecciones se mantuvo relativamente estable logrando una disminución de sólo el 1% en ese período.

En cuanto al acceso al cART, hasta el año 2017, 21,7 millones de personas se encontraban recibiendo el tratamiento antirretroviral, es decir que aproximadamente el 59% de los infectados a nivel mundial tenían acceso al mismo. Particularmente en América Latina, aunque no se produjeron grandes cambios en cuanto al número de nuevas infecciones en la región, la alta cobertura del tratamiento permitió la reducción en un 12% de las muertes relacionadas a SIDA en el período 2010-2017.

En cuanto a los modos de transmisión, la vía sexual sigue constituyendo la principal vía de contagio a nivel mundial seguida por la vía parenteral y vertical. En el caso de las mujeres embarazadas viviendo con HIV, el acceso al cART alcanzó un 80% y el número de nuevas infecciones en niños fue un 35% menor que en el año 2010. En 2017, se estimó que el número de nuevas infecciones por HIV en niños menores de 15 años fue de 180.000, infectándose, cada día, unos 500 niños. A pesar de los avances en las nuevas políticas de testeo de la infección durante el embarazo y la consecuente disminución en la tasa de

transmisión vertical en la región, ésta vía continúa siendo importante, con un 11,4% de nuevas infecciones en nacidos de madres viviendo con HIV. Este aspecto resalta la importancia de implementar políticas de salud pública más estrictas que logren mejoras en estos parámetros.

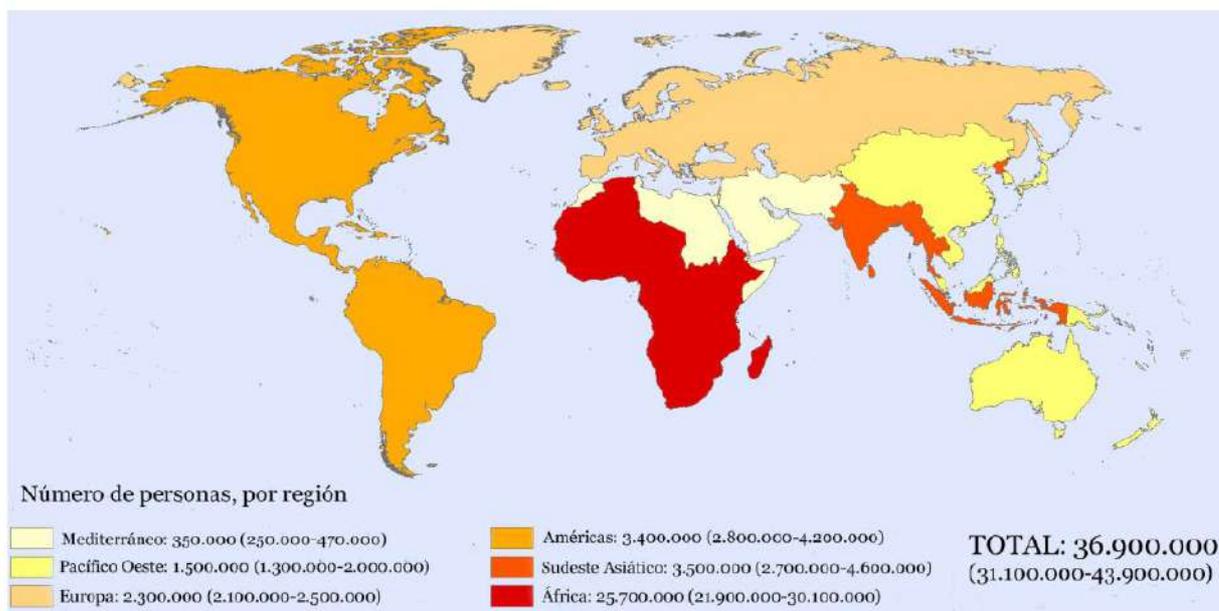


Figura 1: Número estimado de personas viviendo con HIV al año 2017 en el mundo. Adaptado de [8].

I. 2. 2. Situación en Argentina

Los últimos datos oficiales acerca de la situación epidemiológica en Argentina, provistos por la Dirección de SIDA y ETS en el Boletín n°34, indican que hasta diciembre de 2017, 122 mil personas vivirían con HIV en Argentina, de las cuales un 30% (36.600 personas) desconocerían su situación serológica [14] (Figura 2). En el 98% de los casos reportados la transmisión se produjo por relaciones sexuales no protegidas. La epidemia en la Argentina se encuentra relativamente estable y concentrada, con una prevalencia en la población general de jóvenes y adultos del 0,4%, aunque existen grupos en riesgo en los que la prevalencia alcanza el 34%. Por cada mujer diagnosticada, se reporta que son diagnosticados 2,3 varones. La mediana de edad en la que se realizó el diagnóstico fue de 33 años para las mujeres y 32 años para los varones. La proporción de diagnósticos tardíos alcanzó el 30% en las mujeres y el 37,5% en los varones. Durante el año 2015, se diagnosticaron alrededor de 6.500 casos de infección por HIV, se produjeron 51 infecciones por transmisión vertical y fallecieron 1.553 personas por SIDA. Cabe destacar

que, del 70% de la población infectada que conocía su status, sólo un 81% se encontraba bajo tratamiento en el año 2017.



Figura 2: Situación epidemiológica en Argentina. Comparación de las tasas de VIH cada 100.000 habitantes según región y sexo, Argentina 2014-2015 [14].

I. 2. 3. Epidemiología Molecular

La presencia del HIV-1 y 2 en la población humana es consecuencia de eventos de transmisión zoonótica independientes a partir de primates no humanos [15]. El HIV-1 se caracteriza por una gran diversidad genética, clasificándose en cuatro grupos M, N, O y P (siendo éste último grupo de muy baja prevalencia y tendiendo a su desaparición [16]), subtipos y formas recombinantes inter-subtipos. El grupo M del HIV-1 es el responsable de la pandemia mundial, y se ha diversificado en nueve subtipos diferentes, denominados mediante letras (A-D, F-H, J, K) y, a la fecha, 96 formas recombinantes circulantes descritas (CRF, *Circulating Recombinant Forms*) generadas mediante recombinación, entre y dentro de los diferentes subtipos [17]. Por el contrario, los grupos N y O han sido encontrados en muy baja proporción, el grupo N únicamente en Camerún, mientras que, el grupo O es responsable de generar una

epidemia que se limita al Oeste de África Central [18]. La gran variabilidad molecular existente puede atribuirse a la alta tasa de replicación viral, a la frecuente introducción de mutaciones por la enzima transcriptasa reversa y a la recombinación. El esparcimiento global de los subtipos y formas recombinantes del HIV-1 ha generado un patrón de distribución complejo y dinámico (Figura 3) [19].

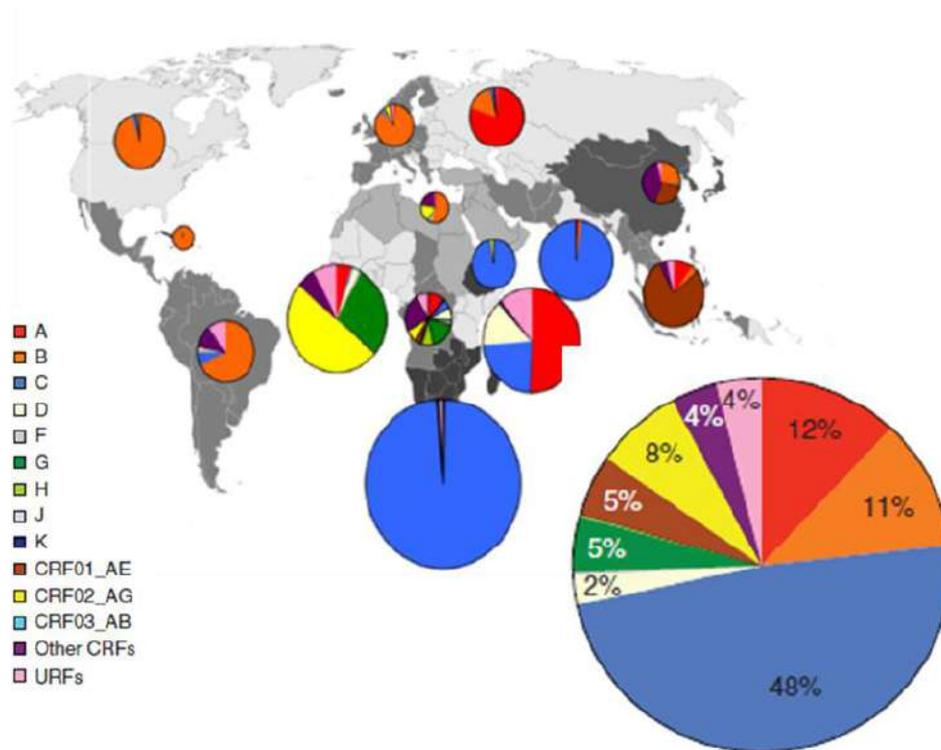


Figura 3: Esquema general de la distribución mundial de subtipos y formas recombinantes más prevalentes de cada región, periodos 2004-2007. Adaptado de [19].

El subtipo C predomina en África e India y, en el 2007, representaba el 48% de todos los casos de HIV-1 globalmente. El subtipo B predomina en Europa del Este, América y Australia. Los subtipos recombinantes circulantes se encuentran aumentando progresivamente [18] [20].

América del Sur está caracterizada por la circulación de subtipo B en la región noroeste (igual a lo observado en América Central y América del Norte) mientras que la situación en el Cono Sur es un poco más compleja. En Brasil se encuentran variantes pertenecientes a los subtipos B, C y F y formas recombinantes BF [21, 22]. En nuestro país, los estudios de caracterización del HIV-1 comenzaron a desarrollarse a principios de la década del 90, [23, 24] pero la mayor contribución fue hecha en el año 2001, cuando Carr y col. informaron sobre una nueva CRF en sujetos HIV+ de Argentina y Uruguay,

denominada CRF12_BF [25]. Algunos estudios recientes demuestran una alta prevalencia de los recombinantes BF en la población argentina infectada por HIV [26-30], e incluso se han detectado nuevas recombinantes A/G [31].

I. 3. EL VIRIÓN

El HIV pertenece al género *Lentivirus*, incluido dentro de la familia *Retroviridae*. Los miembros de dicha familia se caracterizan por poseer una enzima denominada transcriptasa reversa (RT, *Reverse Transcriptase*) capaz de sintetizar ADN de doble cadena a partir del ARN genómico. Los retrovirus difieren de otros virus dado que cada virión contiene dos copias de ARN simple cadena de polaridad positiva como genoma, las cuales se encuentran empaquetadas conjuntamente con la finalidad de incrementar las probabilidades de éxito en la síntesis de ADN, ya que si una de las cadenas de ARN se encuentra fragmentada, la RT puede saltar entre templados y copiar la otra molécula de ARN [32].

I. 3. 1. Estructura viral y organización genómica

I.3.1.1. Morfología

La partícula viral posee una estructura esférica, envuelta, de aproximadamente 100 a 120 nm de diámetro (*Figura 4*). La envoltura viral es una membrana bicapa lipoproteica, derivada de la célula hospedadora, que contiene 2 glicoproteínas virales principales, gp41 y gp120, que protruyen hacia el exterior. Estas se originan por escisión enzimática de la pre-proteína viral precursora gp160. Hacia el interior de la partícula viral se encuentra, en primera instancia, la matriz (p17) en íntima asociación con la cara interna de la envoltura. Posteriormente, se encuentra la cápside formada por la proteína p24, que encierra en su interior las dos hebras de RNA genómico monocatenario. Este RNA se asocia íntimamente a dos proteínas, a la nucleoproteína p7 (unida en forma no covalente) y a la RT. Dentro de la cápside se encuentran, además, la integrasa y la proteasa [33, 34].

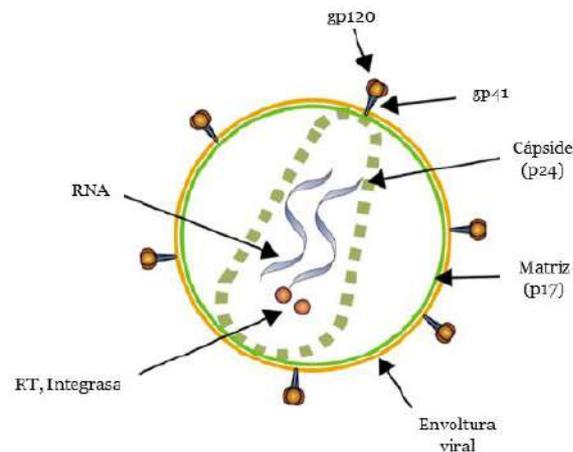


Figura 4: Esquema de la partícula viral madura, donde se indican algunas de las proteínas estructurales. Proteína transmembrana gp41, proteína de superficie gp120, RT (transcriptasa reversa) [35].

I.3.1.2. Genoma

El genoma del HIV consta de dos moléculas casi idénticas de ARN simple cadena con polaridad positiva (ARNsc⁺), cada una de 9,2 kilobases (Kb). El mismo codifica 3 genes comunes a todos los retrovirus (*gag*, *pol* y *env*) junto a otros 6 genes que codifican para proteínas regulatorias (*tat* y *rev*) y accesorias (*nef*, *vif*, *vpr* y *vpu*) (Figura 5). Mediante el solapamiento entre algunos de los genes, el virus emplea los 3 posibles marcos de lectura abiertos (ORFs, *open reading frames*) para codificar las distintas proteínas. La región *gag* codifica las proteínas estructurales internas del virión a partir de dos precursores, que son post-traduccionamente procesados mediante clivaje proteolítico produciendo las proteínas maduras de la matriz, cápside, nucleocápside, p1, p2 y p6. La región *pol* codifica las enzimas RT (que posee las actividades ADN-polimerasa-ARN dependiente, ADN-polimerasa-ADN dependiente y ARNasa H), la Integrasa y la Proteasa. La región *env* codifica las glicoproteínas de transmembrana y de superficie (gp120 y gp41), las cuales forman el complejo que interacciona específicamente con el receptor celular [32]. Una vez integrado al genoma celular, el ADN proviral se encuentra flanqueado por repeticiones terminales largas (LTR, *Long Terminal Repeats*) generadas durante el proceso de transcripción inversa. Los LTR están compuestos por las regiones U3, R y U5 y son los responsables de regular, al menos en parte, la expresión de los genes virales. Dentro del genoma se hallan también intrones. El mecanismo de *splicing* es utilizado como estrategia para regular, de manera temporal, la expresión génica.

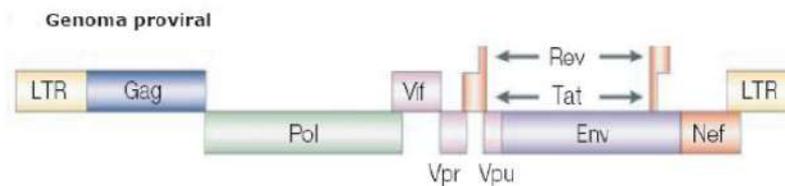


Figura 5: Esquema del genoma proviral del HIV (9,2 Kb). Contiene marcos de lectura abiertos (ORFs, open reading frames) para 16 proteínas que son sintetizadas a partir de al menos 10 transcritos [36].

I. 3. 2. Ciclo de Replicación

Adsorción y entrada a la célula: el proceso de entrada del virus a la célula blanco esta mediada por la interacción de dos glicoproteínas virales con dos moléculas en la membrana celular. El receptor en la célula blanco es la molécula CD4 que interacciona con la glicoproteína gp120, interacción que induce una serie de cambios conformacionales en la glicoproteína viral gp41 permitiendo, asimismo, su interacción con el correceptor, perteneciente a la familia de los receptores de quemoquinas [37]. Los correceptores más importantes para el HIV-1 son el CCR5 y CXCR4 [38-40], los cuales determinan el tropismo viral (variantes R5-trópicas y X4-trópicas). Luego de la adsorción de la partícula viral se produce la fusión entre la envoltura viral y la membrana de la célula blanco [41], permitiendo la liberación de la nucleocápside al citoplasma celular y el desnudamiento (*Figura 6*).

Retrotranscripción: la transcripción inversa del genoma viral (*Figura 6*) se produce en un complejo ribonucleoproteico que incluye no solo a la RT y a las dos moléculas de ARN, sino también a otras proteínas virales. Este proceso se produce en el citoplasma de la célula huésped y está catalizado por la enzima viral RT, la cual convierte al genoma viral en una molécula de ADN doble cadena (ADNdc). La RT no posee actividad de lectura de prueba (o *proof-reading*), por lo que introduce una alta tasa de error. Este aspecto, sumado a la gran velocidad de replicación, conduce a la producción de variantes denominadas cuasiespecies y a la gran diversidad inter-aislamientos que se observa para el HIV [32].

Entrada al núcleo e integración: finalizada la transcripción inversa, el ADN viral es traslocado al núcleo como parte de un complejo de pre-integración ribonucleoprotéico que incluye, además del ADNdc, a proteínas virales (integrasa, proteínas de la cápside) y algunas proteínas celulares [41] (*Figura 6*). La entrada al núcleo del complejo de pre-integración es un proceso activo que requiere el pasaje a través de los poros nucleares en células que no se encuentran en división. Una vez en el núcleo, se produce la

integración del ADN viral al genoma celular, preferentemente en regiones que poseen alta densidad de genes y actividad transcripcional.

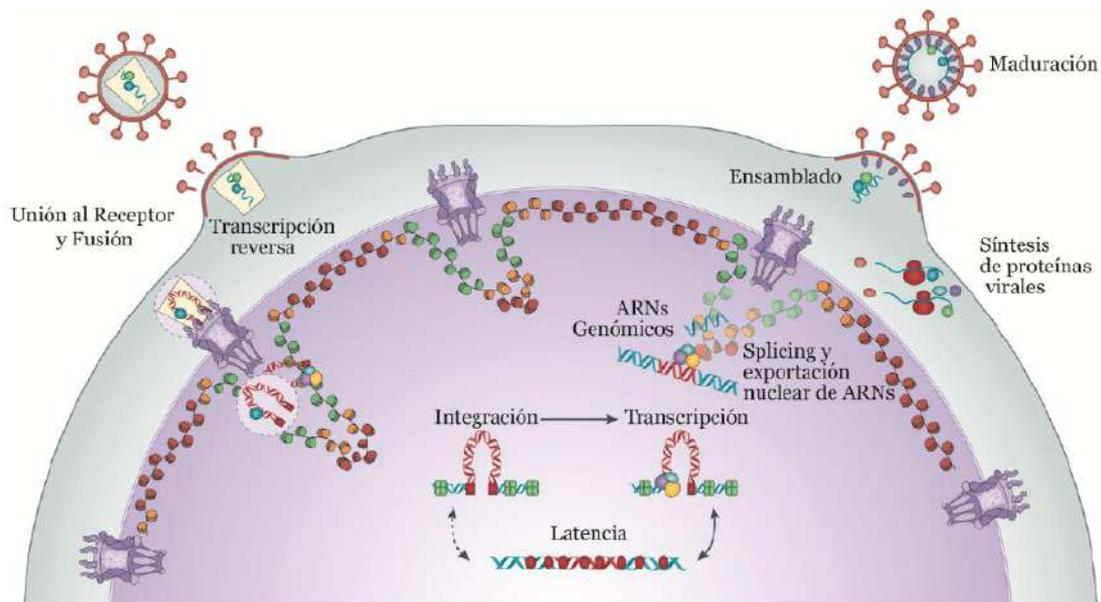


Figura 6: Esquema simplificado del ciclo de replicación del HIV-1. Luego de la fusión del virión con los receptores en la membrana celular, el genoma viral de ARN es retrotranscrito a ADN, luego se produce el desnudamiento (es decir, se desensambla la cápside viral), la entrada al núcleo y la integración del ADN viral a la cromatina celular. Durante la infección productiva, la transcripción viral es seguida por el splicing y la exportación del ARN viral del núcleo, y la producción y ensamblaje de nuevas partículas virales, que brotan de la membrana plasmática y se transforman en infecciosas luego de madurar. Alternativamente, el ADN viral integrado puede ser silenciado a través de diversos mecanismos, transformándose en un reservorio viral silente (latencia proviral). Modificado de *Lusic y Siliciano [41]*.

Transcripción y regulación post-transcripcional: en células productivamente infectadas, durante el proceso de transcripción, los transcritos virales adquieren la estructura denominada *Cap* (compuesto por un residuo 7-metilguanosina unido al trifosfato del extremo 5'), son poliadenilados en el extremo 3' y son prácticamente indistinguibles de otros ARN mensajeros (ARNm) celulares. Se generan 3 clases de ARNm a partir de transcritos de HIV (9Kb, 4Kb y 2Kb). La regulación está mediada por la proteína Rev, mediante su interacción con el elemento RRE presente en los transcritos. A través de esta unión dirige el pasaje de los transcritos desde el núcleo hacia el citoplasma para su traducción [37] (*Figura 6*).

Ensamblado, maduración y brotación: el objetivo final del proceso de replicación viral es generar progenie. Para ello, el ARN (9kb) genómico es encapsidado y transportado a regiones especializadas donde se produce la brotación. En la etapa de maduración, la partícula viral cambia su morfología, adoptando la estructura esférica y con su cápside cónica en el centro de la misma (*Figura 4*).

Latencia: además del proceso descrito previamente, se establecen reservorios celulares transcripcionalmente silentes en células T CD4⁺ en reposo. El genoma viral integrado sufre un silenciamiento transcripcional llevando a la generación del reservorio viral latente, el cual constituye el mayor obstáculo a la hora de eliminar la infección por HIV, debido a que no es afectado por el tratamiento y es la causa del rebote viral que se produce una vez interrumpido el cART [41, 42].

I. 4. INMUNOPATOGENIA

I. 4. 1. Curso natural de la infección por HIV

Una vez establecida la infección por el HIV, el curso natural de la misma (en ausencia de tratamiento antirretroviral) se caracteriza por un deterioro progresivo del sistema inmune que lleva, en última instancia, al desarrollo de SIDA. En la mayoría de los casos, la transmisión ocurre a través de mucosas (vaginal o rectal) y comienza con la infección de un número pequeño de linfocitos T de memoria efectores CD4⁺CCR5⁺ [43], macrófagos y células dendríticas ubicadas en la lámina propia [44]. Las células dendríticas residentes no sólo son sensibles a la infección sino que también facilitan la diseminación viral [45]. La primera amplificación viral ocurre en órganos linfáticos regionales (por ejemplo, nódulos linfáticos drenantes). A partir de allí, los linfocitos T infectados y viriones libres son volcados al torrente sanguíneo, permitiendo la colonización de otros órganos (tracto gastrointestinal, bazo, médula ósea) y la infección masiva de células susceptibles [46]. Esto resulta en un pico de viremia (10^6 a 10^7 copias de ARN viral/ml de plasma) que, a veces, puede coincidir temporalmente con la aparición de síntomas clínicos denominados, en conjunto, Síndrome Retroviral Agudo y que incluyen fiebre, linfadenopatías, sudoración nocturna y artralgia, entre otros [47] (*Figura 7*). El descenso del pico de viremia y la reversión de los síntomas agudos son atribuidos a la acción de linfocitos T CD8⁺ citotóxicos (LT CD8⁺) y, en menor medida, al agotamiento de células blanco. Esto es seguido por el establecimiento del *set point* viral [48]. La aparición de anticuerpos específicos en el suero de los individuos es posterior al control de la replicación viral (*Figura 7*), por lo que se cree que no desempeñarían un papel fundamental en la misma. A tiempos tempranos post-infección, la población viral es homogénea pero luego se diversifica generando una innumerable cantidad de cuasiespecies y dando origen a variantes de escape a la neutralización y a la acción de los LT CD8⁺, así como también variantes resistentes a drogas antirretrovirales.

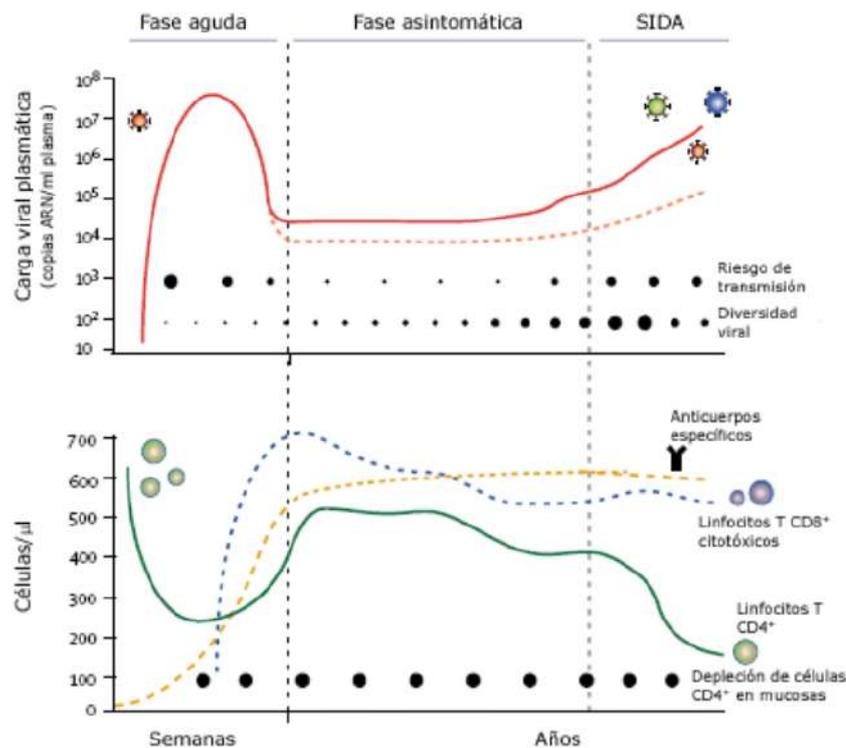


Figura 7: Curso natural de la infección por HIV-1. La etapa aguda se caracteriza por alta carga viral (línea roja), descenso en el recuento de células T CD4⁺ y ausencia de anticuerpos específicos. Luego de la infección aguda, la carga viral se estabiliza en distintos niveles en diferentes individuos (*set point*, línea roja punteada). La diversidad viral aumenta a lo largo del tiempo mientras que el riesgo de transmisión es máximo durante la etapa aguda y hacia las etapas finales de la infección. El descenso del pico de viremia está asociado con la aparición de linfocitos T CD8⁺ específicos. Los anticuerpos específicos aparecen posteriormente. La depleción de células T CD4⁺ que ocurre a nivel de mucosas no se recupera a lo largo del tiempo [35].

Lo que distingue a la infección por HIV es la depleción progresiva de las células T CD4⁺ [49] tanto por eliminación directa debido a la infección como por el gatillado de mecanismos de muerte en las células T CD4⁺ en reposo, activación inmune, proliferación y senescencia. Durante la infección temprana se produce una reducción transitoria de las células T CD4⁺ circulante, seguida por una recuperación que alcanza valores cercanos a los normales. Durante la etapa crónica de la infección, el recuento de células T CD4⁺ disminuyen progresivamente hasta llegar el advenimiento de la enfermedad (*Figura 7*). El efecto más importante en la homeostasis de las células T sucede de manera temprana en el tracto gastrointestinal, donde ocurre una depleción masiva de células T CD4⁺ activadas. A lo largo del tiempo, esta población no se recupera, ni siquiera en el marco del tratamiento antirretroviral [50], lo que se contrapone a lo observado para células T CD4⁺ circulantes en sangre periférica. Finalmente, la gran depleción de células linfoides en el tracto gastrointestinal, junto con la apoptosis de enterocitos y el

aumento de la permeabilidad en la mucosa intestinal, conlleva a un aumento de la concentración en plasma de productos microbianos, como son los lipopolisacáridos [51]; lo que contribuiría en gran medida a la activación inmune generalizada, típica de los individuos infectados.

I. 4. 2. Curso de la infección en tiempos de cART

La aparición de los antirretrovirales de alta eficiencia durante la década del 90 permitió que los individuos infectados alcanzaran la supresión de la viremia plasmática hasta niveles indetectables, así como una mejora subsecuente en la expectativa y calidad de vida, impactando enormemente en la dinámica de la infección [52]. Sin embargo, los efectos detrimentales ocasionados por el virus en diferentes componentes del sistema inmune durante las primeras semanas de la infección hacen que, incluso con una buena adherencia al tratamiento, estas alteraciones persistan [53, 54]. Además, el tratamiento no logra erradicar la infección, ya que el provirus permanece oculto de manera latente en reservorios, constituidos principalmente por linfocitos T CD4⁺ en reposo [12, 55]. Este fenómeno se pone en evidencia cuando individuos con carga viral plasmática suprimida, inclusive por períodos prolongados de tiempo, interrumpen el tratamiento. En los mismos se observa que, al cabo de unas semanas (generalmente 2-3 semanas), la carga viral plasmática vuelve a niveles máximos [56] (*Figura 8*). Entonces, la administración de cART de manera ininterrumpida y de por vida se hace indispensable, transformando a la infección en una enfermedad crónica manejable [57-59].

El inicio del tratamiento permite recuperar los niveles de linfocitos T CD4⁺, mejorar la relación CD4/CD8 y reducir los niveles de activación inmune e inflamación, siendo esta mejora más pronunciada cuanto antes se inicie el tratamiento después de la primoinfección (*Figura 9*). Sin embargo, en ningún caso se logran alcanzar los niveles observados en individuos no infectados [60-62]. Esta situación se debería a diferentes procesos que llevan a un estado de inflamación crónica: replicación persistente, a pesar del tratamiento, en tejidos santuarios como nódulos linfoides, mucosa intestinal y sistema nervioso central; alteración en el metabolismo de lípidos, derivado del tratamiento en sí y, principalmente, al gran daño inicial producido por la infección a nivel del GALT [62].

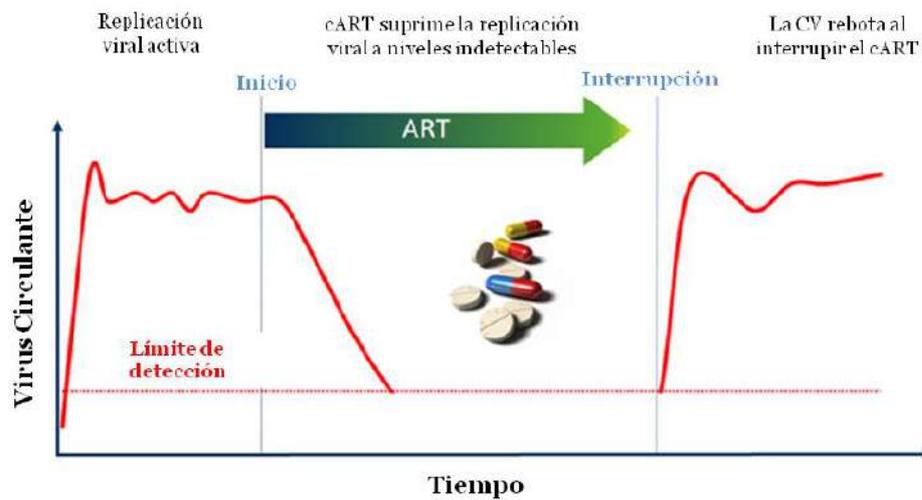


Figura 8: Cinética de la carga viral plasmática al interrumpir el cART. La infección no tratada se caracteriza por elevados niveles de replicación viral que puede medirse en el plasma de individuos infectados. El cART reduce la replicación viral a niveles indetectables (con la metodología disponible en la actualidad). Cuando el cART es interrumpido el virus replica nuevamente, demostrando que permanece en reservorios celulares y anatómicos durante el tratamiento. Adaptado de *Kulpa y Chomont [56]*.

Es por esto que, a pesar de todos los beneficios que conlleva la instauración del tratamiento, las personas infectadas presentan elevada morbilidad y mortalidad comparadas con la población general, con mayor predisposición a sufrir: enfermedad cardiovascular, alteraciones renales, hepáticas y metabólicas, osteoporosis, disfunción neurocognitiva, cáncer, fragilidad, entre otras patologías. Entonces, resulta fundamental la búsqueda de terapias alternativas que permitan resolver la infección [54].

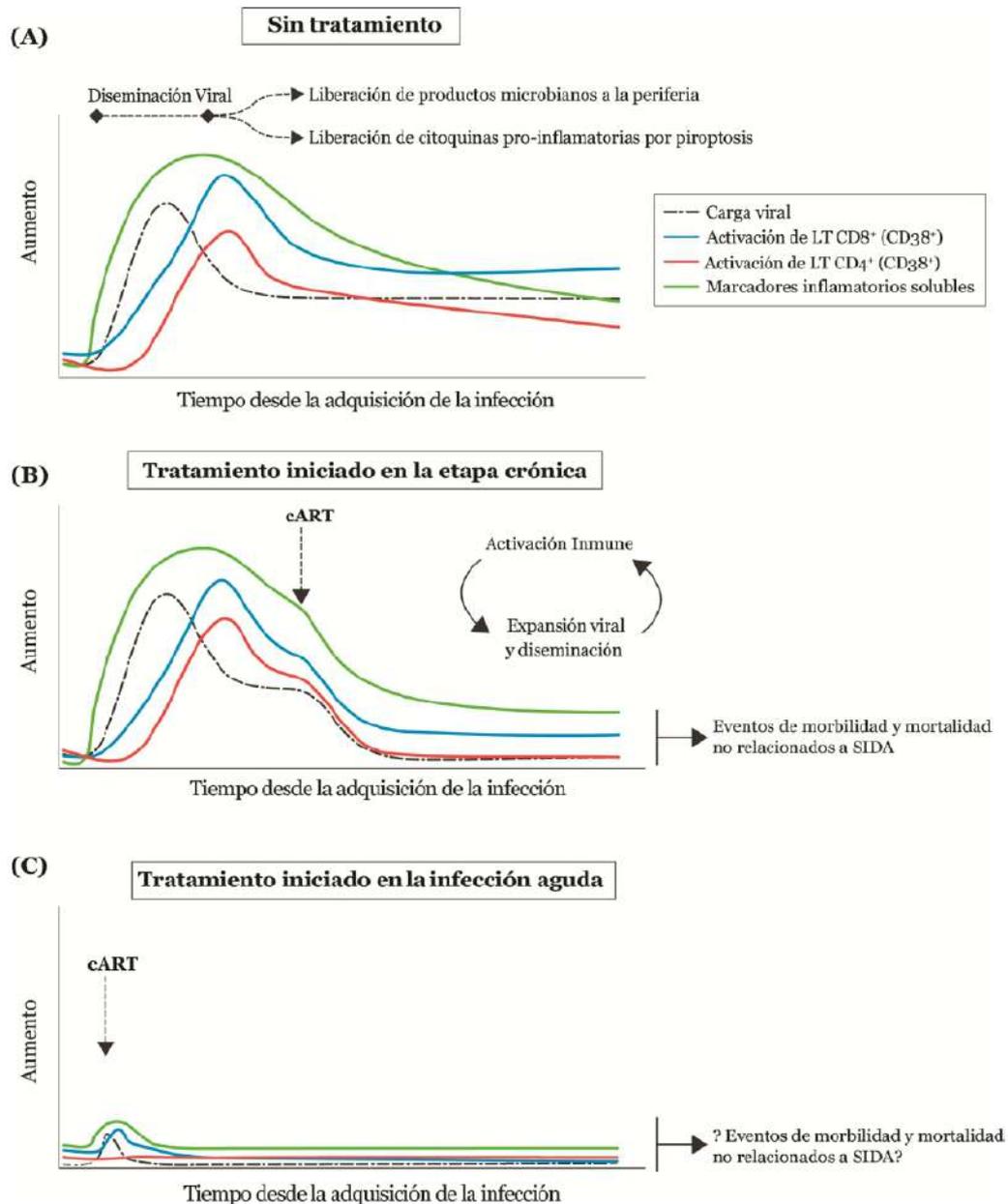


Figura 9: Patogénesis de la Activación Inmune. (A) En la infección aguda, la activación inmune se detecta concomitantemente con la CV. (B) Cuando el cART es iniciado durante la etapa crónica, la CV se hace indetectable y disminuyen la expresión de marcadores de activación inmune (en los compartimentos CD4 y CD8), así como los marcadores solubles de inflamación, pero no logran alcanzar valores normales. (C) El inicio temprano del cART, sobre todo cuando es iniciado antes del pico de viremia en la infección aguda, normaliza la activación de LT CD8⁺ y previene la de los LT CD4⁺, se normalizan la mayoría de los marcadores solubles de inflamación, pero otros permanecen elevados a pesar del cART. Todavía no se conoce a ciencia cierta el impacto del inicio temprano del cART sobre la mortalidad y morbilidad no relacionada a SIDA. Adaptado de [61].

I. 5. ESTRATEGIAS PLANTEADAS PARA LOGRAR LA REMISIÓN VIROLÓGICA SOSTENIDA

La principal barrera para lograr la cura a la infección por HIV radica en la habilidad del virus de permanecer de manera quiescente en el reservorio, constituido principalmente por LT CD4⁺ de memoria en reposo, permaneciendo oculto a la vigilancia del sistema inmune [63]. Actualmente, solo un caso de cura exitoso ha sido documentado, el llamado "Paciente Berlín" (*Timothy Brown*), logrado mediante el trasplante de células hematopoyéticas progenitoras resistentes a la infección (recibió un trasplante de células madres de un donante CCR5 Δ 32; *Figura 10*) [64, 65]. Sin embargo, la existencia de individuos capaces de controlar naturalmente la replicación del virus (*Elite Controllers*, ECs), así como diferentes casos reportados de remisión virológica sostenida tras la interrupción del tratamiento antirretroviral (controladores post-tratamiento) y otros ejemplos de remisión virológica sostenida en escenarios complejos ("Bebé Mississippi" y "Pacientes Boston") [63, 65, 66], permiten hipotetizar que lograr la remisión virológica sostenida en los individuos infectados sería factible.

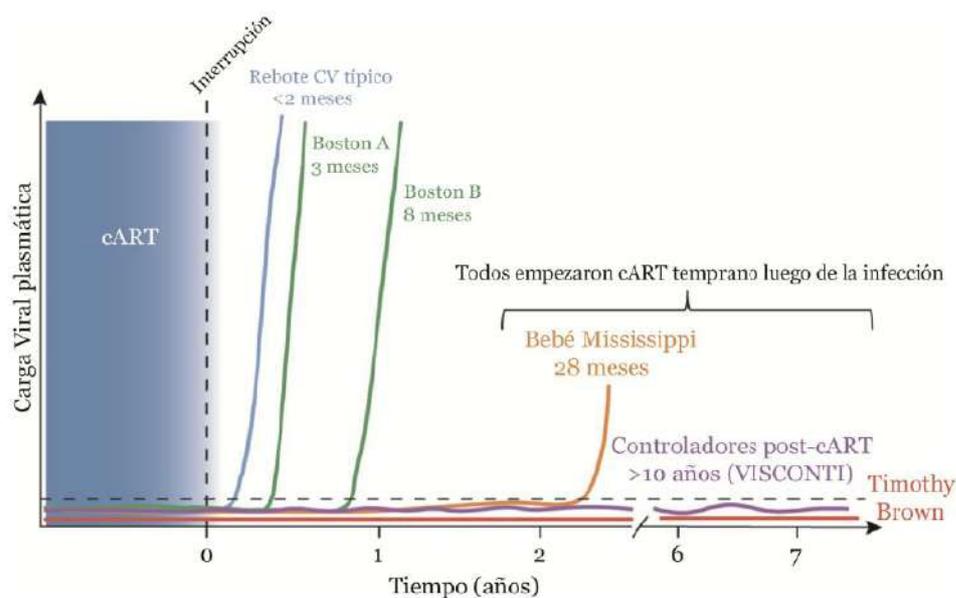


Figura 10: Casos de remisión virológica sostenida o transiente de la CV en ausencia de cART. Adaptado de *Deeks et al.* [67].

Diversas estrategias para alcanzar la cura fueron planteadas, algunas de ellas proponen eliminar totalmente el virus con capacidad replicativa del organismo (cura esterilizante) y otras, posiblemente más factibles de ser llevadas a la práctica, lograr un control inmunológico de la replicación viral sin

eliminación total del reservorio (cura funcional o, más correctamente, remisión virológica sostenida en ausencia de tratamiento) [63, 65]. La estrategia más discutida es la llamada “*Shock and Kill*”, que se fundamenta en la reactivación de la replicación del virus a partir de LT CD4⁺ de memoria latentemente infectados (reversión de la latencia) y la subsiguiente eliminación de estas células por el propio sistema inmune (*Figura 11*) [66-69].

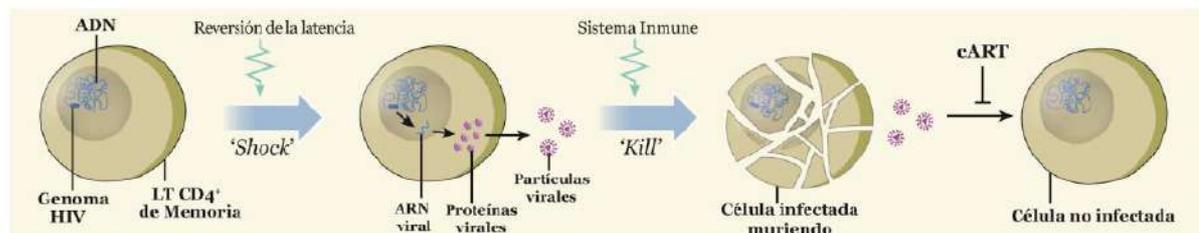


Figura 11: Esquema de la estrategia de “*Shock and Kill*”. Implica re-activar la replicación viral (reversión de la latencia) a partir del reservorio (LT CD4⁺ de memoria latentemente infectados) y la posterior eliminación de las células reactivadas por el sistema inmune del individuo. Asimismo, el cART impediría que se produzcan nuevas infecciones. Adaptado de [70].

Este modelo requiere la pre-existencia de respuestas celulares capaces de eliminar efectivamente células productoras de virus y/o limitar la replicación viral. Además del modelo expuesto, nuevas estrategias que involucran a los linfocitos T CD8⁺ surgen constantemente, como es el caso de la transferencia adoptiva de linfocitos T que ha sido muy explorado en el campo de los tratamientos oncológicos e infecciones virales persistentes [71-73]. Sin embargo, como se discutirá a continuación, la respuesta de los LT CD8⁺ está severamente disminuida en individuos bajo tratamiento antirretroviral, limitando el éxito de estas estrategias [74].

I. 6. RESPUESTA T CD8⁺ HIV-ESPECÍFICA DURANTE EL CURSO NATURAL DE LA INFECCION Y EN INDIVIDUOS BAJO TRATAMIENTO

Durante la infección aguda, la respuesta por parte de los LT CD8⁺ se correlaciona con el declive inicial en la replicación del virus. No obstante, a pesar de esta disminución en la viremia, la gran mayoría de los individuos infectados no son capaces de controlar la replicación viral en ausencia de cART. Las primeras evidencias de que las células T CD8⁺ HIV-específicas estaban involucradas en el control de la replicación

viral fueron aportadas por estudios realizados en humanos y primates no humanos durante la fase aguda de la infección, durante la cual se observó que el surgimiento de LT CD8⁺ HIV-específicos se correlacionó con la disminución del pico de viremia y el establecimiento del *set point* viral, potente predictor de la progresión a la enfermedad. Asimismo, se describieron mutantes virales de escape a los LT CD8⁺, y ciertos alelos HLA (*Human Leukocyte Antigen*) han sido asociados a un mejor control de la replicación viral (Figura 12) [75, 76].

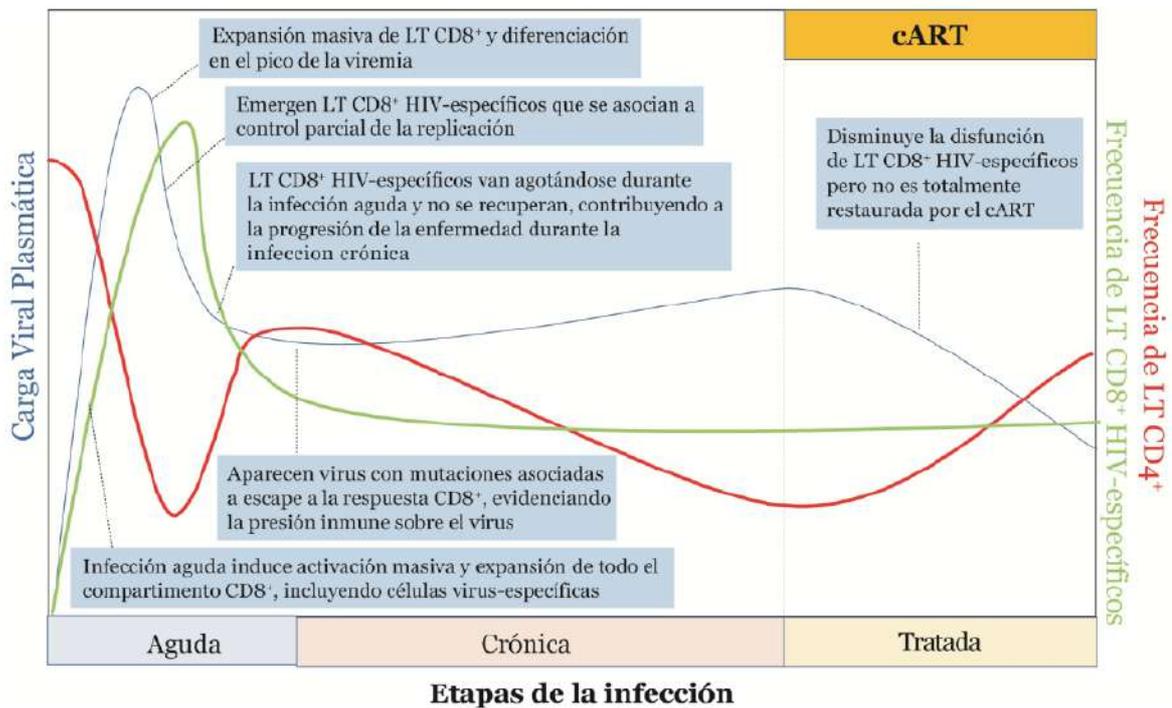


Figura 12: Eventos significativos que involucran a los LT CD8⁺ durante la infección por HIV (aguda, crónica y tratada). Adaptado de [76].

Al iniciar el cART, la magnitud de la respuesta T CD8⁺ HIV-específica decae rápidamente [77, 78], seguramente debido a la ausencia de estimulación antigénica. A pesar de esto, algunas publicaciones han demostrado que las células remanentes mantienen la capacidad de ejercer función antiviral [79-81]. Más aún, recientemente se ilustró en un modelo primate no humano que los LT CD8⁺ podrían tener un rol en el control de la infección viral incluso durante el tratamiento [82]. Otros estudios indicaron que los LT CD8⁺ siguen ejerciendo presión selectiva bajo tratamiento, sugiriendo que esta respuesta estaría actuando sobre la replicación viral residual [83]. De hecho, se ha observado que el reservorio viral se encuentra compuesto, en gran parte, por variantes virales con mutaciones asociadas a escape inmune en epítopes

dominantes, y esto se acentúa cuando el tratamiento es iniciado tardíamente [63, 84, 85]. Asimismo, diferentes atributos de la respuesta T CD8⁺ han sido relacionados al tamaño del reservorio una vez iniciado el tratamiento [86-89].

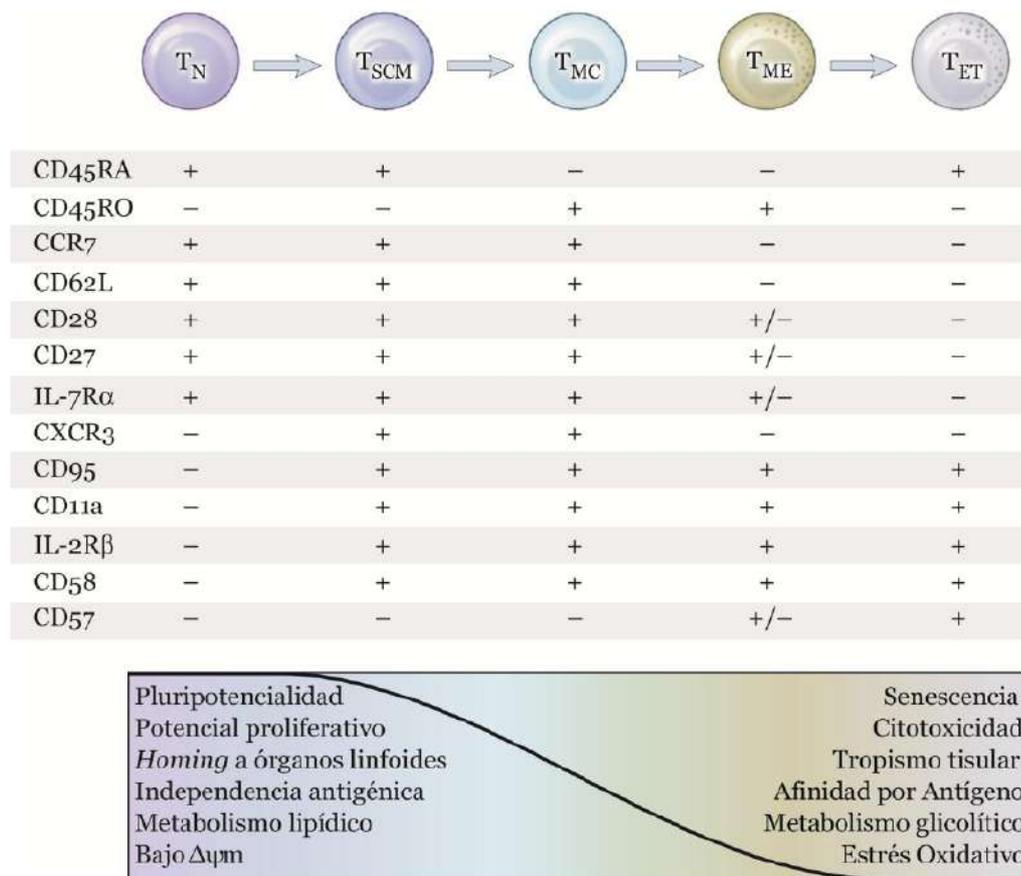


Figura 13: Modelo de la ruta de diferenciación jerárquica de Linfocitos T. Luego del encuentro con el antígeno las células T_N se diferencian progresivamente hacia diversas subpoblaciones de células T de memoria, y en última instancia, en células T_{ET}. Valiéndonos de la expresión positiva o negativa de los marcadores de superficie CD45RO, CCR7, CD95 se identificaron 5 subpoblaciones de células T en éste trabajo. A medida que ocurre la diferenciación celular desde T_{SCM} hasta T_{ET}, las subpoblaciones pierden o adquieren funciones específicas de manera progresiva. T_N: células naïve; T_{SCM}: células stem de memoria; T_{MC}: células de memoria central; T_{ME}: células de memoria efectora; T_{ET}: células efectoras terminales. $\Delta\Psi_m$: potencial de membrana mitocondrial. Adaptado de Gattinoni y col. [90, 91].

Las células T CD8⁺ no son entidades individuales con una única función, sino que, en conjunto, comprenden una población celular que presenta una compleja ruta de diferenciación y posee una gran capacidad de ejercer múltiples funciones [90, 91] (Figura 13), de las cuales un gran número pueden

afectar la replicación del virus. Diferentes trabajos realizados en el contexto de la infección por HIV, llevados a cabo en diferentes cohortes y modelos, sugieren que la especificidad, la calidad (en términos funcionales) y el fenotipo de las células son todos determinantes de la capacidad para mediar la actividad antiviral.

Está bien establecido que existen claras diferencias en la especificidad de los LT CD8⁺, es decir en las proteínas virales que son blancos inmunodominantes, a lo largo del curso natural de la infección por HIV. Durante la etapa aguda, la respuesta está principalmente dirigida hacia Nef (antígeno de expresión temprana) [92-94], pero durante la etapa crónica esta respuesta se hace más amplia y reconoce diferentes epítopes virales como Gag, Env y Vpr [95-97]. La magnitud de la respuesta inmune específica varía según que proteína viral es reconocida como blanco. Algunos estudios han establecido una fuerte asociación entre respuestas T CD8⁺ Gag-específicas y bajas viremias en la infección crónica [95, 98]. Más específicamente, nuestro grupo ha demostrado que el nivel de inmunodominancia de la respuesta anti-Gag (es decir la contribución relativa de la respuesta anti-Gag respecto de las otras proteínas virales) a tiempos tempranos post-infección, se asocia de manera indirecta con la tasa de progresión a la enfermedad [75]. En la misma línea, los individuos *EC* presentan una respuesta T CD8⁺ dirigida ampliamente contra Gag y con una gran capacidad de mediar actividad antiviral [75, 98, 99]. Los posibles mecanismos que podrían explicar la mayor habilidad de los LT CD8⁺ con especificidad anti-Gag para mediar una mejor respuesta antiviral incluyen: habilidad para eliminar células recientemente infectadas (aún antes de la integración del genoma viral al genoma celular) [100, 101], restricciones relacionadas al *fitness* viral y propias de Gag para escapar a la presión inmune [102, 103] y una mayor funcionalidad para mediar mecanismos antivirales tanto citolíticos como no citolíticos [104, 105]. Sin embargo, al iniciar tratamiento, se observa una brusca caída en la frecuencia y magnitud de linfocitos T CD8⁺ HIV-específicos, atribuido principalmente a la caída de la CV plasmática y la consecuente disminución de la estimulación antigénica (*Figura 12*) [74, 85]. A pesar de ello, la respuesta de memoria HIV-específica persiste y puede ser detectada, incluso luego de años de tratamiento antirretroviral [83, 86]. Esto se atribuye a que bajos niveles de replicación viral estarían teniendo lugar (principalmente en sitios santuario) y existiría cierto nivel de expresión de proteínas virales. En este sentido, se demostró la expresión de ARNm correspondiente a la región codificante de Nef en individuos bajo cART, así como también una mayor proporción de LT CD8⁺ Nef-específicos [88, 106]. Esto pone de manifiesto que la

especificidad de la respuesta citotóxica una vez iniciado el tratamiento, constituye un factor clave en el control viral pero aún es un aspecto poco explorado.

La capacidad antiviral de los LT CD8⁺ no está determinada ni se caracteriza por una única función celular, sino que cada célula es capaz de producir un amplio espectro de moléculas efectoras, de manera aislada o simultánea. La polifuncionalidad celular se describe como la habilidad de una célula de producir por lo menos tres marcadores; entre los cuales se encuentran CD107A/B (marcador de degranulación), la proteína inflamatoria de macrófagos 1 β (MIP-1 β , *Macrophage Inflammatory Protein*, o también llamada CCL4, *C-C motif chemokine ligand 4*), interferón γ (IFN- γ), interleuquina 2 (IL-2) y el factor de necrosis tumoral α (TNF- α , *tumor necrosis factor alpha*), como los más típicos. La polifuncionalidad de la respuesta HIV-específica ha sido asociada con la capacidad de mediar control viral [107-109]. En un trabajo previo de nuestro grupo, se pudo detectar una significativa frecuencia de células específicas polifuncionales a tiempos tempranos post-infección. Sin embargo, no se pudo establecer una asociación con un mayor o menor *set-point* viral [75].

Además de la especificidad y la calidad de la respuesta, el fenotipo sería también determinante de la habilidad de las células de mediar control viral. Los LT CD8⁺ sufren cambios en su fenotipo y transitan desde un estado *naïve*, pasando por un fenotipo de memoria y culminando en células efectoras terminales (*Figura 13*). Las células T de memoria o efectoras poseen la capacidad de montar una respuesta secundaria de forma rápida en respuesta a la infección, mientras que las células *naïve*, al no haber estado en contacto con el antígeno previamente, no son funcionalmente activas de manera inmediata. Recientemente, se han postulado ciertas asociaciones, incluyendo resultados de nuestro grupo, entre el estadio de diferenciación de los LT CD8⁺ totales (y HIV-específicos) y el control viral a lo largo de la infección [110-113]. Aquellos individuos cuyas células presentaron mayor capacidad de inhibir la replicación viral, presentan altas frecuencias de células en estadios terminales [105], con una mayor capacidad de respuesta al antígeno, lo cual contribuiría a un efecto antiviral superior. Por otro lado, se ha descrito que la estimulación antigénica constante que tiene lugar durante la infección crónica conduce a un estado de agotamiento de los LT CD8⁺ HIV-específicos, caracterizado por la expresión en la superficie celular de altos niveles de la molécula inhibitoria PD-1 (*Programmed death-1*), disminución de las capacidades proliferativa, de secreción de citoquinas y citotóxica así como alteración en la diferenciación del fenotipo de memoria. Una vez iniciado el cART, estas alteraciones se revierten parcialmente al disminuir los niveles de antígeno circulantes [74, 114, 115]. Numerosos autores especulan que las células

de memoria que persisten luego de iniciado el tratamiento serían más funcionales y menos susceptibles a la apoptosis que aquellas encontradas en individuos sin tratamiento, pero aún así no tendrían las características observadas en los controladores *elite* [83]. Es decir, el tratamiento parece restaurar la respuesta inmune a un fenotipo menos agotado, pero aún resta dilucidar de manera acabada las características funcionales y fenotípicas de las células HIV-específicas que permitirán la eliminación de las células T CD4⁺ latentemente infectadas y reactivadas.

Lo descripto anteriormente ilustra que, a pesar de ciertas controversias, existe una buena caracterización de las propiedades funcionales y fenotípicas de la respuesta T CD8⁺ HIV-específica luego del inicio del cART. Sin embargo, aún queda por dilucidar cómo estas células responden en el contexto de una reactivación viral desde el reservorio. Asimismo, resta identificar aspectos positivos de la misma que puedan ser estimulados o características negativas que puedan llegar a ser un obstáculo en la implementación y éxito de las terapias de remisión virológica.

Dentro de este contexto, se postulan el objetivo general, los objetivos específicos e hipótesis de trabajo, los cuales se describen a continuación.

II. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

“Las hipótesis son andamios que se colocan ante el edificio y se quitan al término de las obras. Son imprescindibles para el albañil, que sin embargo no debe tomar el andamio por el edificio”

Johann Wolfgang Von Goethe

II. 1. OBJETIVO GENERAL

Existe un gran caudal de evidencia que sugiere que una respuesta T CD8⁺ HIV-específica potente se asocia a un mejor control de la replicación del virus. Esto ha llevado al surgimiento de propuestas terapéuticas que buscan potenciar dicha respuesta con el fin de lograr la cura de la infección o, al menos, una remisión virológica sostenida. El éxito así como la factibilidad de estas estrategias de cura que buscan valerse del propio sistema inmune del huésped para eliminar el reservorio viral, dependerá en gran medida de la calidad de la misma. Lograr identificar aspectos favorables a re-estimular y posibles aspectos desfavorables a subsanar, permitirá el desarrollo de estrategias más eficientes. Teniendo en cuenta los antecedentes en el área, el OBJETIVO GENERAL de este trabajo fue EVALUAR LA FRECUENCIA, POLIFUNCIONALIDAD, FENOTIPO Y CAPACIDAD ANTIVIRAL DE CÉLULAS T CD8⁺ HIV-ESPECÍFICAS RE-ESTIMULADAS *IN VITRO* OBTENIDAS DE INDIVIDUOS BAJO cART a fin de valorar el potencial uso de su re-estimulación como estrategia terapéutica para la erradicación de los reservorios. Adicionalmente, se plantea establecer si EL MOMENTO DE INICIO DEL cART LUEGO DE LA INFECCIÓN AGUDA modifica los parámetros a evaluar.

Este trabajo aportará datos claves para comprender los mecanismos de control de la infección por HIV en el contexto de la supresión virológica mediada por el cART y evaluar la factibilidad de estrategias de cura del tipo "Shock and Kill" o transferencia adoptiva de linfocitos T. Además permitirá evaluar el impacto del momento de inicio del tratamiento (temprana o tardíamente luego de la infección aguda) sobre la funcionalidad y fenotipo de la respuesta T CD8⁺ lo que permitirá determinar la necesidad de aplicar estrategias diseñadas "a medida" o personalizadas para ambos grupos de individuos.

II. 1. 1. Objetivos específicos

- **OE1:** Determinar la magnitud y calidad (en términos funcionales y fenotípicos) de la respuesta T CD8⁺ HIV-específica en muestras de individuos HIV⁺ bajo cART (**muestra post-cART**) que iniciaron el mismo de manera temprana (Tratamiento Temprano, **TTe**) o tardía (Tratamiento Tardío, **TTa**) post-infección.
- Emplear un modelo *in vitro* de expansión de células T CD8⁺ HIV-específicas en las muestras obtenidas al año de iniciar el cART, en ambos grupos de individuos.

- ▣ Determinar la magnitud (frecuencia de células específicas) y la amplitud (número de proteínas virales *targets*) de la respuesta T CD8⁺ HIV-específica, tanto *ex vivo* como post-estimulación *in vitro*, por ELISPOT.
 - ▣ Analizar la polifuncionalidad de las células CD8⁺ HIV-específicas obtenidas post-expansión, mediante la evaluación de su capacidad de degranulación y producción de diferentes citoquinas y quemoquinas, por citometría de flujo.
 - ▣ Caracterizar el perfil inmunofenotípico, por citometría de flujo, de la población celular T CD8⁺ (total y HIV-específica) post-expansión, mediante la determinación de la distribución de las subpoblaciones de memoria (T_N, T_{SCM}, T_{MC}, T_{ME} y T_{ET}) así como del marcador de agotamiento celular PD-1.
 - ▣ Determinar la capacidad antiviral de las células T CD8⁺ HIV-específicas expandidas *in vitro* mediante la evaluación de su capacidad de inhibir la replicación viral y/o eliminar células T CD4⁺ infectadas mediante mecanismos citolíticos.
 - ▣ Determinar la existencia de asociaciones entre la frecuencia, polifuncionalidad y fenotipo de las células T CD8⁺ HIV-específicas obtenidas post-expansión con la capacidad de inhibir la replicación viral y/o eliminar células T CD4⁺ infectadas mediante mecanismos citolíticos.
 - ▣ **OE2:** Determinar asociaciones entre la calidad (en términos funcionales y fenotípicos) de la respuesta T CD8⁺ HIV-específicas evaluada durante la fase aguda de la infección (**muestra basal**, ambos grupos de individuos), antes del inicio del cART (**muestra pre-cART**, grupo TTa) y luego de un año de iniciado el cART (**muestra post-cART**, ambos grupos de individuos), con los parámetros clínicos, inmunológicos y marcadores de progresión evaluados luego de iniciado el tratamiento.
 - ▣ Determinar la carga viral plasmática, el recuento de poblaciones linfocitarias (muestra basal, pre-cART y post-cART) y los niveles de activación inmune celular (muestra basal y pre-cART) en los dos grupos de estudio y a diferentes tiempos.
-

- ▣ Analizar *ex vivo*, la proporción, polifuncionalidad y el perfil inmunofenotípico de la respuesta T CD8⁺ HIV-específica, en las muestras basales (infección aguda) de ambos grupos de individuos y además en la muestra anterior al inicio del tratamiento (pre-cART) en el grupo TTa.
- ▣ Realizar análisis de correlaciones entre los parámetros específicos de la respuesta T CD8⁺ observados en las muestras basales y pre-cART con los parámetros de progresión evaluados post-cART.
- ▣ **OE3:** Determinar asociaciones entre la calidad de la respuesta T CD8⁺ HIV-específica evaluada durante la fase aguda de la infección (**muestra basal**) o antes del inicio del cART (**muestra pre-cART**), en relación con la respuesta T CD8⁺ HIV-específica evaluada en muestras obtenidas post-cART y expandidas *in vitro* (**muestra post-cART post-expansión**), en ambos grupos de individuos.
- ▣ Identificar posibles biomarcadores (en las muestras basales y pre-cART) con capacidad predictora sobre la calidad de la respuesta T CD8⁺ post-cART post-expansión.

II. 2. HIPÓTESIS DE TRABAJO

- ▣ A pesar de encontrarse los individuos TTa y TTe bajo tratamiento antirretroviral efectivo por más de un año, la respuesta inmune específica es factible de ser expandida *in vitro*.
 - ▣ La frecuencia, especificidad, polifuncionalidad y diferenciación de memoria de los linfocitos T CD8⁺ obtenidos a partir de muestras de individuos bajo cART y expandidos *in vitro*, está afectada por el tiempo de estimulación antigénica (tiempo sin cART) y por el nivel de disfunción alcanzado previo al inicio del tratamiento.
 - ▣ Luego de la re-estimulación *in vitro*, la capacidad de mediar actividad antiviral se ve influenciada por la especificidad, el grado de polifuncionalidad, el nivel de diferenciación, y la expresión de marcadores de agotamiento.
-

- La calidad (en términos funcionales y fenotípicos) de la respuesta inmune previa al inicio del cART se relaciona con las características de la respuesta inmune evaluada en la muestra post-tratamiento y re-estimulada *in vitro*.

 - Los parámetros asociados con una mejor calidad de respuesta inmune evaluados en las muestras obtenidas antes y/o después del inicio del cART se relacionan con marcadores asociados a una menor progresión a la enfermedad.
-

III. MATERIALES & MÉTODOS

*“Ninguna cantidad de experimentación puede probar definitivamente que tengo razón;
pero un solo experimento puede probar que estoy equivocado”*

Albert Einstein

III. 1. POBLACIÓN EN ESTUDIO

Se reclutaron un total de 25 participantes HIV+ para este estudio, a través del Grupo Argentino de Seroconversión [116]. Los individuos fueron incluidos en la cohorte al momento del diagnóstico de la infección aguda, siguiendo el siguiente criterio de inclusión [117]: i) serología negativa seguida por una serología positiva para HIV, confirmada por Western Blot (WB), dentro de los 6 meses ii) serología positiva, WB indeterminado y niveles detectables de ARN viral en plasma ó iii) síntomas de infección aguda con serología negativa o indeterminada y posterior confirmación de infección. Una vez incorporados al estudio, los individuos fueron seguidos longitudinalmente. Para el caso particular de este trabajo, se utilizaron muestras de sangre periférica obtenidas a diferentes tiempos: al momento de la infección aguda (**muestra basal**), antes del inicio del tratamiento (**muestra pre-cART**) y luego de un año de iniciado el tratamiento (**muestra post-cART**).

Para determinados análisis, los individuos fueron divididos en dos grupos según el momento de inicio del tratamiento: aquellos que lo iniciaron en la etapa aguda (menos de 4 de meses a partir del momento estimado de infección), de ahora en más grupo **TTe** (Tratamiento Temprano, n=13); y aquellos que lo hicieron luego de ese período o grupo **TTa** (Tratamiento Tardío, n=12) (*Figura 14*).

En el caso del grupo **TTa**, se obtuvieron muestras en dos estadios previos al inicio del cART: muestra basal (tomada al momento del diagnóstico de la infección por HIV) y muestra pre-cART (tomada inmediatamente antes del inicio del cART). En cambio, para el grupo **TTe** sólo se contó con la muestra basal que, en este caso, coincide con la muestra pre-tratamiento. Esto es porque, este grupo de individuos fue reclutado luego de la implementación de los nuevos lineamientos de la OMS, que recomiendan iniciar el cART inmediatamente luego del diagnóstico de la infección, lineamientos que Argentina incorporó a las guías nacionales de tratamiento antirretroviral en 2015 [118, 119]. Por ello, hoy en día no se podría contar un grupo con las características del grupo **TTa** para un estudio prospectivo.

Este estudio fue evaluado y aprobado por el comité de Ética Humana de la Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires y por el comité de Bioética de Fundación Huésped. Todos los individuos reclutados firmaron un consentimiento informado aceptando participar en este estudio al momento de su inclusión en el mismo.

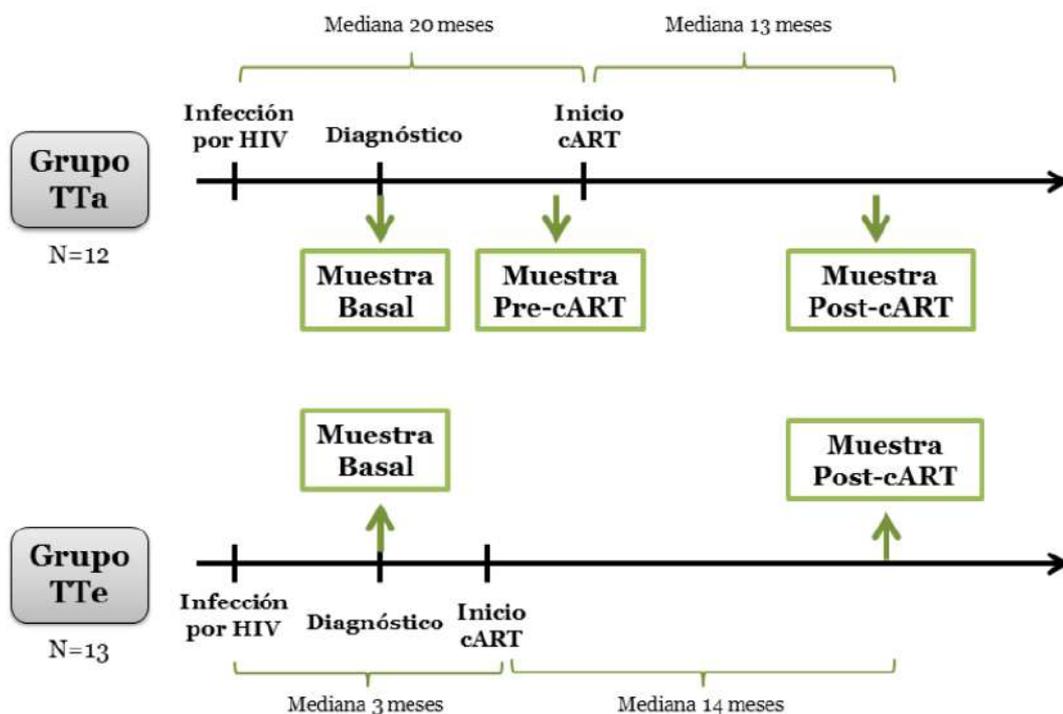


Figura 14: Línea de tiempo ilustrando las características de los grupos de estudio y las distintas muestras con las que se trabajó en este estudio.

III. 2. PROCESAMIENTO DE MUESTRAS

De todos los individuos reclutados se obtuvieron muestras de sangre a diferentes tiempos post-infección y fueron procesadas de la siguiente manera: se recolectaron 40 ml de sangre periférica en tubos conteniendo EDTA (*Ethylenediamine tetraacetic acid*, ácido etilendiaminotetraacético) y se centrifugaron a 2.500 revoluciones por minuto (rpm) durante 10 minutos. El plasma se separó y se guardó a -80°C hasta su procesamiento. Las células mononucleares de sangre periférica (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMCs) se obtuvieron mediante centrifugación en gradiente de densidad *Ficoll-Hypaque* (GE Healthcare) y se criopreservaron en nitrógeno líquido, en una solución de suero fetal bovino (SFB, *Gibco BRL*) suplementada con 10% de dimetilsulfóxido (DMSO, *Sigma-Aldrich*), tomando todos los recaudos necesarios para conservar su viabilidad. Para cada muestra se determinó la CV plasmática mediante el método de ADN ramificado (*branched-DNA*, *Versant, HIV-1 RNA 3.0 assay viral load system*, *Siemens Healthcare*; límite de detección 50 copias de ARN de HIV-1/ml de plasma) y el recuento de las poblaciones linfocitarias LT CD_4^+ y CD_8^+ ($\text{CD}_3^+/\text{CD}_4^+$ y $\text{CD}_3^+/\text{CD}_8^+$) por citometría de flujo (*TruCount*, *BD FACSCanto*, *BD Biosciences*).

III. 3. PÉPTIDOS

En los ensayos que se describirán a continuación se utilizaron, como estímulos, péptidos correspondientes a las proteínas Gag y Nef de HIV-1. Los mismos se obtuvieron a través del programa de provisión de reactivos (*AIDS Reference and Reagent Program*) de los Institutos Nacionales de Salud de EE.UU. (*NIH, National Institutes of Health*). Los péptidos utilizados (*HIV-1 PTE [potential T cell epitopes] Gag/Nef Peptides*) presentan 15 aminoácidos (aa) de longitud e incluyen a todos los potenciales epítopes de células T descritos para diferentes variantes de HIV-1 circulantes a nivel mundial, permitiendo maximizar la detección de respuestas positivas [120]. En este trabajo se agruparon los péptidos en 3 mezclas o *pools*: uno correspondiente a la proteína Nef (127 péptidos) y 2 *pools* que comprenden a la proteína Gag (correspondientes a las subunidades p17 = 97 péptidos y p24 = 128 péptidos). También, se utilizó el *pool* de péptidos virales CEF (Citomegalovirus, *Epstein Barr* e Influenza), el cual es una mezcla de péptidos derivados de los mencionados virus [121] que se utilizó como control positivo. Todos los péptidos llegaron al laboratorio liofilizados, fueron cuidadosamente resuspendidos en DMSO en una concentración final de 40 µg/µl, alicuotados y guardados a -20°C hasta su utilización.

III. 4. EXPANSIÓN DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA

A partir de las muestras obtenidas al año del inicio del cART (**muestra post-cART**), se realizó un protocolo de expansión de células T CD8⁺ HIV-específicas, puesto a punto por nuestro grupo a partir de diferentes trabajos publicados (*Tabla 2 y Figura 20*) [81, 122-125]. Para ello, PBMCs criopreservadas se descongelaron en solución tamponada de fosfatos (PBS, *Phosphate Buffer Saline; Sigma-Aldrich*), con el adición de 2% de SFB (*Gibco BRL*), 1mM de EDTA y 25 U/ml de la enzima DNasa I (*Benzonase; Sigma-Aldrich*), y se lavaron dos veces en el mismo medio de descongelado (5 minutos a 1500 rpm). Luego las células fueron resuspendidas en medio RPMI 1640 (*Gibco BRL*) suplementado con 10% de SFB, 2 mM L-glutamina (*Gibco BRL*), 100 U/ml penicilina (*Gibco BRL*), 100 µg/ml estreptomina (*Gibco BRL*), 10 mM HEPES (*Gibco BRL*) (en adelante, medio RPMI completo). La viabilidad celular se chequeó mediante el método de exclusión de las células muertas por tinción con azul tripán. Solamente las muestras con un 95% de viabilidad celular fueron utilizadas para el ensayo. Una vez descongeladas, las células fueron cultivadas en placas de 12 pocillos a una densidad de $2 \cdot 3 \times 10^6$ células/ml en RPMI completo suplementado con 100 U/ml de interleuquina-2 humana recombinante (IL-2-hr, *Biolegend Inc, EE.UU.*) y en presencia de 1 µg/ml del *pool* de péptidos de HIV correspondiente o del *pool* de péptidos de CEF,

durante 14 días. El medio de cultivo fue reemplazado cada 72 horas con medio fresco RPMIc adicionado con IL-2-hr. De esta manera se expandieron las células Nef-, p17-, p24- y CEF-específicas con el *pool* de péptidos correspondiente, al cabo de 14 días.

III. 5. ENSAYO DE ELISPOT (PRE Y POST-EXPANSIÓN)

La proporción de células HIV-específicas productoras de IFN- γ se evaluó en las muestras obtenidas al año post-tratamiento (**muestra post-cART**) de los individuos reclutados, mediante el ensayo de ELISPOT (*Enzyme-Linked ImmunoSpot assay*). La evaluación se realizó antes (*ex vivo*, ELISPOT pre-expansión) y después de expandir PBMCs con péptidos específicos como se describió en el párrafo anterior (ELISPOT post-expansión), siguiendo protocolos publicados por nuestro grupo de trabajo [75, 94, 122]. Para ambos ensayos (ELISPOT pre- y post-expansión), se cubrieron placas de 96 pocillos con fondo de fluoruro de polivinilideno (PVDF, *polyvinylidene difluoride*; *MultriScreen IP plates*, Millipore, EE.UU.) durante 16 horas a 4°C con una solución 5 $\mu\text{g/ml}$ de anticuerpo monoclonal anti-IFN- γ humano (BD *Biosciences*, EE.UU.), en PBS. A la mañana siguiente, las placas recubiertas fueron lavadas 4 veces con PBS y se bloquearon durante 2 horas a 37°C con 200 $\mu\text{l/pocillo}$ de medio RPMI completo. Finalizado el bloqueo, se removió el medio de las placas y se dispensaron las células a una densidad de 10⁵ células/pocillo para la condición *ex vivo*, mientras que para la condición post-expansión se dispensaron a una densidad tanto de 50.000 células/pocillo como 25.000 células/pocillo (se hizo de esta manera para evitar saturar el ensayo y hacer posible la lectura luego del protocolo de expansión). Los *pooles* de péptidos se diluyeron en medio RPMI completo y se añadieron en cada pocillo, alcanzando una concentración final de 2 $\mu\text{g/ml}$. Cada condición se ensayó, al menos, por duplicado. Para cada sujeto testeado se incluyeron un control negativo (RPMI completo sin péptidos, suplementado con 0,5% DMSO) y dos controles positivos: un control de estimulación policlonal (PMA/Ionomicina) consistente en 5 ng/ml de acetato forbol miristato (PMA, *phorbol myristate acetate*, Sigma-Aldrich) más 500 ng/ml Ionomicina (Sigma-Aldrich) y un control de estimulación específica consistente en el *pool* de péptidos CEF (concentración final 2 $\mu\text{g/ml}$). Las placas se incubaron toda la noche (ON, *overnight*) a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% CO₂. Luego, se lavaron 4 veces con PBS suplementado con 0,05% *Tween 20* (de ahora en más PBS-*Tween*, Promega, EE.UU.) y se agregaron 100 $\mu\text{l/pocillo}$ del anticuerpo monoclonal anti-IFN- γ humano biotinilado (BD *Biosciences*) previamente diluido (2 $\mu\text{g/ml}$) en PBS suplementado con 10% SFB y filtrado a través de un filtro de PVDF de 0,22 μm (Millipore). Después de 2 horas de incubación a temperatura ambiente, las placas se lavaron 4 veces con PBS-*Tween* y se agregó 100 $\mu\text{l/pocillo}$ del complejo estreptavidina-

peroxidasa (SAV-HRP, *BD Biosciences*) diluido en PBS. Las placas se incubaron 1 hora a temperatura ambiente, se lavaron 4 veces con PBS-*Tween* seguido de 2 lavados más con PBS sólo. Para el revelado de la reacción se utilizó el reactivo AEC (3-amino-9-etil-cabazol, *BD Biosciences*) siguiendo las instrucciones del proveedor. Una vez secas, las placas se analizaron en el lector de placas de ELISPOT *ImmunoSpot* (*Cellular Technology Ltd.*, EE.UU.) y se procedió al recuento de los *spots* utilizando el *software Immunospot*. El tamaño, forma y apariencia de los *spots* observados en los pocillos del control positivo (CEF) se utilizaron como referencia de aceptación de aquellos observados en los pocillos experimentales. Los resultados se expresaron como unidades formadoras de *spots* (SFU, *spot forming units*)/ 10^6 PBMCs, luego de haberse restado el valor de *background* (es decir, el obtenido para el control negativo). El umbral de positividad para la respuesta se estableció como al menos 25 SFU/ 10^6 PBMC o como 3 veces el promedio de los controles negativos si esto último fuera mayor a 25 SFU/ 10^6 PBMCs. Además del número de *spots*, se registró el tamaño promedio de los *spots* frente a un determinado estímulo.

III. 6. MARCADO DE MOLÉCULAS DE SUPERFICIE E INTRACELULARES

La polifuncionalidad y el fenotipo de memoria/efector de las células T CD8⁺ se evaluaron en tres tipos de muestras: i) muestras obtenidas al año de cART y expandidas con péptidos específicos (**muestras post-cART** post-expansión, grupos TTa y TTe), ii) **muestras basales** (*ex vivo*, grupos TTa y TTe), iii) **muestra pre-cART** (*ex vivo*, grupo TTa) (*Figura 14 y 20*). Estos parámetros fueron caracterizados mediante el marcado de moléculas de superficie e intracelulares, por citometría de flujo.

En el caso de la evaluación post-expansión (muestra post-cART), una vez concluidos los 14 días de estímulo las células fueron lavadas dos veces en RPMI completo y se dispensaron en placas de 96 pocillos con fondo en U a una densidad de 5×10^5 células/pocillo. Luego fueron re-estimuladas durante 5 horas en presencia de anticuerpos co-estimuladores (anti-CD28 y anti-CD49d, 1 µg/ml; *BD Biosciences*), monensina (GolgiStop, 0,7 µl/ml; *BD Biosciences*), brefeldina A (10 µg/ml; *Sigma-Aldrich*) y el *pool* de péptidos correspondiente (el mismo utilizado para la expansión, 2 µg/ml). A todos los pocillos se agregó una mezcla de anticuerpos anti-CD107A y anti-CD107B, ambos conjugados con el fluoróforo isotiocianato de fluoresceína (CD107A/B-FITC, *Biologend*). Para cada condición de PBMCs expandidas con un dado *pool* de péptidos (Nef, p17, p24 o CEF), se incluyó un control negativo (medio RPMI completo más DMSO y los anticuerpos coestimuladores). Luego, se incubó la placa durante 5 horas a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂. Para cada individuo evaluado se incluyó, en cada panel de citometría, un control

de isotipo, es decir, PBMCs expandidas (sin importar el *pool* de péptidos particular) re-estimuladas durante 5 horas en idénticas condiciones salvo que, en lugar de añadir el *mix* de anticuerpos anti-CD107A/B-FITC, se añadió un control de isotipo para FITC.

Para el análisis de las muestras directamente *ex vivo* (muestras basales y pre-cART), PBMCs fueron descongeladas y lavadas como se describió anteriormente, resuspendidas a una densidad de 4×10^6 células/ml en medio RPMI completo e incubadas a 37°C durante 2 horas. Luego, se lavaron y se dispensaron en placas de 96 pocillos con fondo en U a una densidad de 5×10^5 células/pocillo. A fin de proceder con la estimulación de las células, en cada pocillo se agregaron anticuerpos co-estimulatorios (anti-CD28 y anti-CD49d, $1 \mu\text{g/ml}$; *BD Biosciences*), monensina (Golgistop, $0,7 \mu\text{l/ml}$; *BD Biosciences*), brefeldina A ($10 \mu\text{g/ml}$; *Sigma-Aldrich*) y el *pool* de péptidos correspondiente ($5 \mu\text{g/ml}$). Para cada individuo evaluado, se incluyó un control negativo (medio RPMI completo más DMSO y los anticuerpos coestimulatorios), un control positivo (PMA, 10 ng/ml más ionomicina 500 ng/ml) y un control de isotipo (como se explicó anteriormente). Asimismo, se estudió la respuesta frente al *pool* de péptidos CEF ($2 \mu\text{g/ml}$ final). A los pocillos se agregó la mezcla de anticuerpos anti-CD107A/B-FITC y se incubó la placa durante 5 horas a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO_2 , al igual que para la muestra post-expansión. Dependiendo el ensayo a realizar (polifuncionalidad o fenotipo) se prosiguió de la siguiente manera:

III. 6. 1. Evaluación de la polifuncionalidad de la población celular T CD8⁺ específica: capacidad de degranulación (expresión en membrana de CD107A/B) y secreción de citoquinas (IFN- γ , IL-2, TNF- α y MIP-1 β)

Luego de las 5 horas de estimulación a 37°C , las células se transfirieron a placas de 96 pocillos con fondo en V y se procedió al marcado de las moléculas de superficie CD3, CD4, CD8, CD14 y CD19. Para esto, se utilizaron los siguientes anticuerpos directamente conjugados a fluoróforos (*Tabla 1*): anti-CD3-BV785 (*Brilliant Violet*), anti-CD4-BV650, anti-CD8-APC (aloficocianina, *allophycocyanin*), anti-CD14-*Pacific Blue* y anti-CD19-*Pacific Blue* (*Biolegend*). Mediante el marcado de CD14/CD19 fue posible excluir del análisis a los linfocitos B (CD19⁺) y monocitos (CD14⁺), centrándonos únicamente en la población de linfocitos CD3⁺. Se recurrió al marcador de viabilidad *Zombie NIR™ Fixable Viability Kit* (*Biolegend*) para la exclusión de células muertas. El marcado de las moléculas se realizó durante 30 minutos en oscuridad y a 4°C . Luego, las células se lavaron dos veces con RPMI completo, se fijaron y permeabilizaron utilizando las soluciones comerciales *Fixation Buffer/Permeabilization Wash Buffer*

(*Biolegend*) siguiendo las instrucciones del fabricante. Finalizada la fijación y permeabilización, las células se lavaron 2 veces utilizando la solución comercial *Permeabilization Wash Buffer* (*Biolegend*) y se procedió al marcado de las proteínas intracelulares (30 minutos, 4°C y en oscuridad). Para ello, a todas las condiciones en estudio se les agregó los anticuerpos conjugados anti-IL-2-PerCP-Cy5.5 (*peridin chlorophyll protein-Cyanine 5.5*), anti-IFN- γ -BV711, (*BD Biosciences*), anti-TNF- α - PE/Cy7 (ficoeritrina-cianina7, *phycoerythrin-cyanine7*) y anti-MIP-1 β - PE (o CCL4-ficoeritrina, *phycoerythrin*). En el caso de los pocillos de isotipo se añadieron, luego de la fijación y permeabilización, los correspondientes controles conjugados con: PerCP-Cy5.5, BV711, PE/Cy7 y PE. Luego del marcado, las células se lavaron 2 veces con la solución *Permeabilization Wash Buffer*, se fijaron con paraformaldehído 0,5% (PFA, *paraformaldehyde*) y se guardaron a 4°C (por no más de 24 horas) hasta su adquisición en un citómetro de 3 láseres y 16 detectores *BD FACSAria FUSION* (*BD Biosciences*), utilizando el programa *BD FACSDiva*, versión 8.0.1 (*BD Biosciences*), para el análisis de los datos ver *Capítulo III.6.4 y Figura 15*.

III. 6. 2. Evaluación del fenotipo (en términos de expresión de marcadores de memoria y agotamiento) en las poblaciones T CD8⁺ total y HIV-específica

Luego de las 5 horas de estimulación a 37°C, las células se transfirieron a placas de 96 pocillos con fondo en V y se procedió al marcado de las moléculas de superficie (*Tabla 1*): CD3-BV785, CD4-BV650, CD8-APC, CD14/CD19-*Pacific Blue*, tal como se describió para el panel de polifuncionalidad, junto con el marcador de viabilidad *Zombie NIR™ Fixable Viability Kit* para poder excluir las células muertas del análisis; durante 30 minutos a 4°C y en oscuridad. Para las condiciones de este estudio, se marcaron los siguientes receptores para determinar la proporción de las distintas subpoblaciones de memoria: anti-CCR7-Alexa700 (receptor de quimiocinas tipo 7, *C-C chemokine receptor type 7*), anti-CD45RO conjugado a PerCPCy5.5 y anti-CD95 (Fas/APO-1/TNFRSF6) conjugado a *PE-Dazzle594* (*Biolegend*). Por otro lado, se analizó la expresión del marcador celular de muerte programada 1 (PD-1, *Programmed Cell Death 1*) mediante un anticuerpo anti-PD-1 conjugado a PE (*Biolegend*). En el caso de los pocillos de isotipo, se añadieron los correspondientes controles conjugados con Alexa700, PerCPCy5.5, PE/Dazzle594 y PE. La marca se realizó durante 30 minutos a 4°C y en oscuridad, y luego de la incubación, las células se lavaron dos veces con RPMI completo, se fijaron y permeabilizaron utilizando las soluciones *Fixation Buffer/Permeabilization Wash Buffer* siguiendo las instrucciones del fabricante. Luego, se procedió con el marcado intracelular de las moléculas IFN- γ , IL-2, TNF- α , y MIP-1 β todos ellos conjugados a FITC (*Biolegend*), durante 30 minutos a 4°C, en oscuridad. Para los controles de isotipo se

añadieron, luego de la fijación y permeabilización, el correspondiente control conjugado con FITC. Finalizada la marcación, las células se lavaron dos veces con la solución *Permeabilization*, se fijaron con 0,5% PFA y se guardaron a 4°C (por no más de 24 horas) hasta su análisis en un citómetro de flujo BD *FACSAria FUSION*, utilizando el programa BD *FACSDiva*. Para el análisis de los datos ver *Capítulo III.6.4 y Figura 15*.

III. 6. 3. Activación inmune

Para caracterizar el nivel de activación inmune celular (en **muestras basales y pre-cART**) se analizó, *ex vivo*, la expresión de los marcadores CD38 y HLA-DR [126] por citometría de flujo (*Tabla 1*). Para ello, de cada individuo se tomó una alícuota de PBMCs sin estimular y se realizó la marcación de superficie con los siguientes anticuerpos conjugados (además de añadir el marcador de viabilidad): anti-CD3-PE/Cy7, anti-CD4-PerCP, anti-CD8-PE, anti-HLA-DR-FITC y anti-CD38-APC (BD *Biosciences*), durante 30 minutos a 4°C y en oscuridad. Para cada individuo evaluado se incluyó un control de isotipo, conteniendo: marcador de viabilidad, anti-CD3-PECy7, anti-CD4-PerCP, anti-CD8-PE, y los correspondientes controles de isotipo conjugados con FITC y APC. Luego de la incubación, las células se lavaron dos veces con RPMI completo, se fijaron con 0,5% PFA y se guardaron a 4°C hasta su análisis en un citómetro de flujo BD *FACSAria FUSION*, utilizando el programa BD *FACSDiva*. Luego de la adquisición de las muestras se procedió al análisis, donde se cuantificó el nivel de activación como el porcentaje de células T CD8⁺ o CD4⁺ que expresaron el marcador CD38, HLA-DR o ambos marcadores en simultáneo.

III. 6. 4. Citometría de flujo: adquisición y análisis de datos

Las células marcadas fueron adquiridas y analizadas por citometría de flujo (BD *FACSAria FUSION* 3-láser, 16 detectores; BD *FACSDiva software* versión 8.0.1). Los datos obtenidos fueron luego analizados *off-line* con el programa *FlowJo* versión 10 (*Data Analysis Software, LLC*). Para cada experimento, se llevaron a cabo los controles de compensación y controles de isotipo correspondientes en las muestras de cada sujeto evaluado. Los controles de compensación se realizaron mediante el uso de *CompBeads* (BD *Biosciences*), micropartículas de poliestireno que permiten optimizar la compensación fluorescente en análisis de citometría de flujo multicolor. Asimismo, durante la puesta a punto del panel de anticuerpos a utilizar, se realizaron controles “*fluorescence minus one*” (FMO) para optimizar la discriminación de

todas las poblaciones. Por otro lado, se realizaron controles de isotipo en cada panel evaluado como se explicó anteriormente.

Tabla 1: Anticuerpos monoclonales utilizados según panel

<i>Anticuerpo</i>	<i>Fluorocromo</i>	<i>Clon</i>	<i>Marca</i>
<i>Panel de Polifuncionalidad</i>			
CD3	BV785	OKT3	<i>Biolegend</i>
CD4	BV650	OKT4	<i>Biolegend</i>
CD8	APC	HIT-8a	<i>Biolegend</i>
CD14	Pacific blue	M5E2	<i>Biolegend</i>
CD19	Pacific blue	HIB19	<i>Biolegend</i>
CD107A	FITC	H4A3	<i>Biolegend</i>
CD107B	FITC	H4B4	<i>Biolegend</i>
IFN- γ	BV711	B27	<i>BD</i>
IL-2	PerCP-Cy5.5	MQ1-17H12	<i>Biolegend</i>
MIP-1 β /CCL4	PE	D21-1351	<i>BD</i>
TNF- α	PE/Cy7	MAB11	<i>Biolegend</i>
<i>Panel de Memoria</i>			
CD3	BV785	OKT3	<i>Biolegend</i>
CD4	BV650	OKT4	<i>Biolegend</i>
CD8	APC	HIT-8a	<i>Biolegend</i>
CD14	Pacific blue	M5E2	<i>Biolegend</i>
CD19	Pacific blue	HIB19	<i>Biolegend</i>
CD45RO	PerCP-Cy5.5	UCHL1	<i>Biolegend</i>
CCR7	Alexa 700	Go49H7	<i>Biolegend</i>
CD95	PE/Dazzle 594	DX2	<i>Biolegend</i>
PD-1	PE	EH12.2H7	<i>Biolegend</i>
CD107A	FITC	H4A3	<i>Biolegend</i>
CD107B	FITC	H4B4	<i>Biolegend</i>
IFN- γ	FITC	4S.B3	<i>Biolegend</i>
IL-2	Alexa 488	MQ1-17H12	<i>Biolegend</i>
MIP-1 β /CCL4	FITC	D21-1351	<i>BD</i>
TNF- α	FITC	MAB11	<i>Biolegend</i>
<i>Panel de Activación</i>			
CD3	PE/Cy7	OKT3	<i>Biolegend</i>
CD4	PerCP	OKT4	<i>Biolegend</i>
CD8	PE	HIT-8a	<i>Biolegend</i>
HLA-DR	FITC	L243	<i>Biolegend</i>
CD38	APC	HB-7	<i>Biolegend</i>
<i>Panel Ensayo VITAL</i>			
CD3	PE/Cy7	OKT3	<i>Biolegend</i>
CD4	PerCP	OKT4	<i>Biolegend</i>
CD8	BV510	SK1	<i>Biolegend</i>

Para el análisis de polifuncionalidad (*Figura 15A*), se realizó, en primer lugar, un gráfico en función del área y de la altura de la dispersión frontal de la luz (FSC-A, *forward scatter area* y FSC-H, *forward*

scatter height) para remover dobletes. Luego se excluyeron las células muertas en base a la fluorescencia del marcador *Zombie NIR* (histograma en APC-Cy7) y, en segunda instancia, aquellas que expresaban en superficie los marcadores CD14/CD19 (*Pacific Blue versus SSC-height*). Sobre esta población se realizó la discriminación de la población de linfocitos en función de los valores de dispersión frontal y refracción del láser (*FSC* y *side-scatter light SSC*), donde se adquirieron un mínimo de 100.000 eventos (las muestras que no cumplían el mínimo de eventos adquiridos en esta población no se incluyeron en los análisis posteriores). Luego, se seleccionaron aquellos eventos CD3⁺ en un citograma CD3 *versus* SSC-H (*SSC-height*), y sobre esta población se construyó un gráfico de CD8⁺ *versus* CD4⁺ (APC vs BV650) para identificar los linfocitos CD3⁺/CD8⁺. Sobre esta población, se estudió la expresión de citoquinas (IFN- γ , IL-2 y TNF- α), la quemoquina MIP-1 β y del marcador de degranulación CD107A/B (*Figura 15B*). Cada función se estudió por separado y en conjunto; esto último se llevó a cabo utilizando las herramientas disponibles en el programa de análisis *FlowJo* versión 10, el cual permite, mediante una estrategia *booleana*, identificar células capaces de mediar una, dos, tres, cuatro o hasta cinco funciones simultáneamente (identificando así células mono-, bi-, tri-, tetra- y penta-funcionales). Los datos presentados corresponden a los resultados obtenidos luego de restado el *background* inespecífico (DMSO), lo cual fue realizado para cada función particular. Se determinó, como punto de corte, un desvío estándar sobre el valor del *background* y todos los valores que cayeron por debajo de ese punto se les asignó una respuesta con valor 0 (negativa).

Por otro lado, se evaluó la expresión de los marcadores CCR7, CD45RO y CD95 (marcadores de fenotipo de memoria) y de la molécula PD-1 (marcador de agotamiento) (*Figura 15C*), tanto en la población total de células T CD8⁺ como en la población HIV-específica. La estrategia de selección de poblaciones fue idéntica que para el caso de la polifuncionalidad, hasta la selección de las células CD3⁺/CD8⁺. Sobre esta población, se determinaron las subpoblaciones de memoria mediante un citograma CCR7 *versus* CD45RO (*Figura 15C*). A partir de la expresión diferencial de estos dos marcadores se describen cuatro subpoblaciones de LT CD8⁺: células *Naïve/SCM* (*stem cell memory*) ($T_{N/SCM}$, CCR7⁺/CD45RO⁻); células de memoria central (T_{MC} , CCR7⁺/CD45RO⁺); células de memoria efectora (T_{ME} , CCR7⁻/CD45RO⁺) y células efectoras terminales (T_{ET} , CCR7⁻/CD45RO⁻). Para poder discernir entre las células T_N y T_{SCM} , se construyó, a partir de la subpoblación CCR7⁺/CD45RO⁺, un histograma en función de la expresión de la molécula CD95 (T_N : CD95⁻ y T_{SCM} : CD95⁺). Para identificar las células T CD8⁺ HIV-específicas (células productoras de citoquinas o que degranulan en respuesta a la estimulación con el antígeno) se realizó un

citograma en base a la fluorescencia de las mismas en FITC (CD8 *versus* FITC). Cabe destacar que, tanto las citoquinas/quemoquina como CD107A/B, se marcaron con el mismo fluorocromo para optimizar la detección de las células T CD8⁺ HIV-específicas, independientemente de su función. Se consideró una respuesta positiva cuando la población FITC⁺ (citoquinas⁺ y CD107A/B⁺) en los pocillos estimulados con péptidos fue al menos el doble que el *background*; mayor a 0,05% luego de restado el *background* e incluía al menos 1.000 eventos. Este criterio se estableció para minimizar la posibilidad de errores y sesgos provocados por un bajo número de eventos en análisis subsiguientes. Sobre las células CD8⁺FITC⁺ se determinó la distribución de las subpoblaciones de memoria utilizando una estrategia de *gating* idéntica a la aplicada a la población de CD8⁺ total. Para evaluar la expresión del marcador de agotamiento PD-1, el análisis se realizó mediante un citograma de PE *versus* SSC-H, tanto en la población CD8⁺ total como CD8⁺ HIV-específica. Asimismo, la expresión de PD-1 también se evaluó dentro cada subpoblación de memoria total. Por último, sobre la población de células CD8⁺PD1⁺ se evaluó la distribución de las subpoblaciones de memoria y la expresión de citoquinas.

III. 7. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIVIRAL (POST-EXPANSIÓN)

Con el objetivo de evaluar la capacidad de los LT CD8⁺ obtenidos post-expansión (**muestra post-cART**) de mediar actividad antiviral, tanto por mecanismos citolíticos como no citolíticos, dos técnicas ya publicadas fueron adaptadas a nuestro sistema de expansión. Por un lado, se evaluó la capacidad de los LT CD8⁺ expandidos de suprimir la replicación viral en células primarias T CD4⁺ autólogas, mediante el ensayo denominado ensayo de inhibición viral (*Viral Inhibition Assay*, VIA) originamente descrito por Sáez-Cirión y colaboradores [127] y adaptado por nuestro grupo [75] con algunas modificaciones. Si bien, la aplicación del ensayo de VIA posee diversas ventajas, como ser la cuantificación del efecto de las células T CD8⁺ sobre la replicación del virus y el hecho de ser posible adaptarlo a diferentes cepas virales; éste no nos permite discriminar si la actividad antiviral está mediada en mayor proporción por mecanismos citolíticos o no citolíticos. Es por ello que nos propusimos incorporar un segundo ensayo que permitiera discriminar este aspecto. El Ensayo VITAL (*VITAL Assay*), desarrollado por Hermans y col. [128], evalúa exclusivamente la capacidad de los LT CD8⁺ HIV-específicos de lisar LT CD4⁺ autólogos que expresan antígenos del virus en su membrana. Ambos ensayos (VIA y VITAL) requirieron la generación de células efectoras específicas (LT CD8⁺) y células autólogas blanco o *target* (LT CD4⁺), como se explica a continuación.

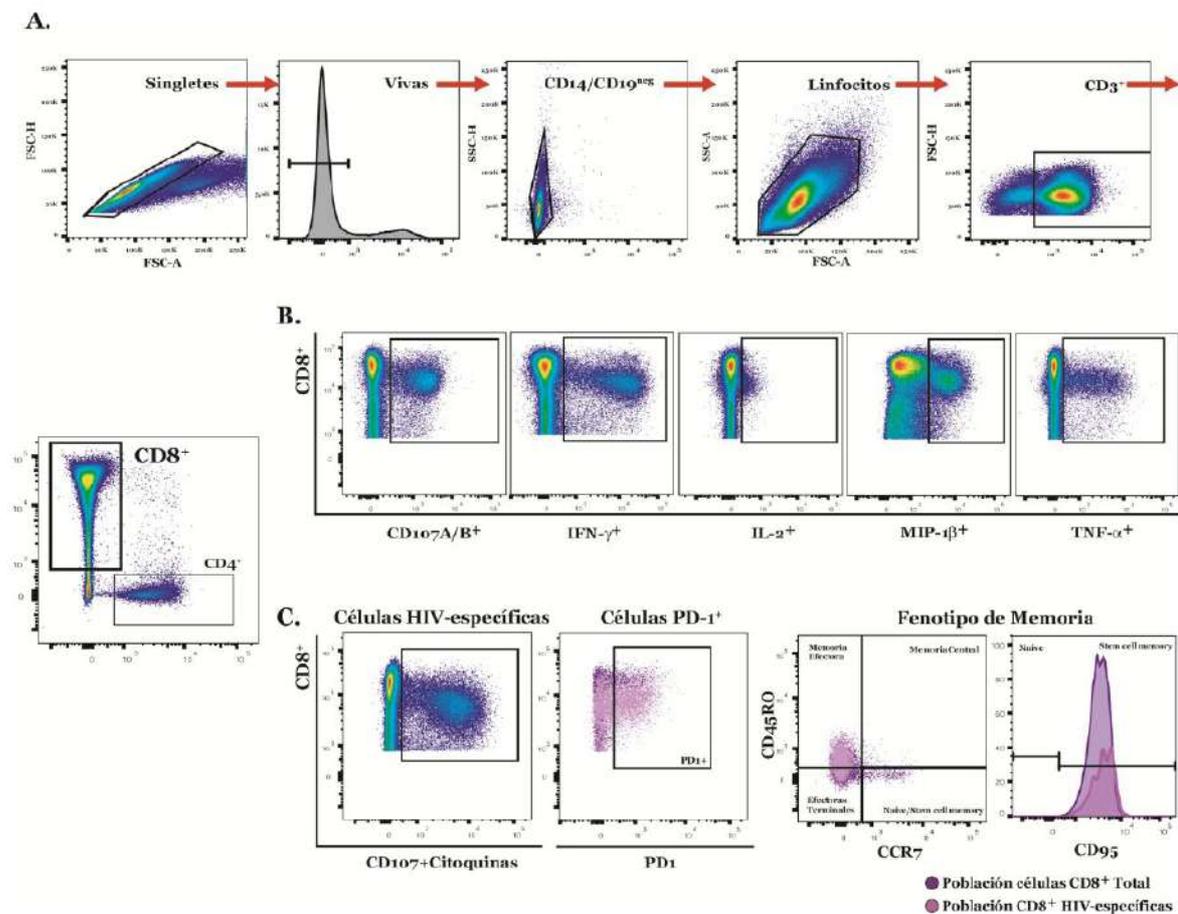


Figura 15: Estrategia utilizada para la selección y análisis por citometría de flujo de la población linfocitaria T CD8⁺ HIV-específica secretora de citoquinas (IFN- γ , IL-2, TNF- α y MIP-1 β) y/o con capacidad de degranulación (CD107A/B), e identificación de las subpoblaciones T CD8⁺ en base a su fenotipo de memoria y expresión de PD-1. **(A)** A partir de un gráfico de FSC-A versus FSC-H se seleccionaron los singletes. Luego se excluyeron las células muertas en un histograma de APC-Cy7 (*Zombie NIR*) y seguidamente también aquellas CD14/CD19⁺ (*Pacific Blue versus SSC-height*). Sobre esta población, se seleccionaron los linfocitos (*FSC vs SSC*) y luego los eventos CD3⁺ (*BV786 versus SSC-H*). Sobre ésta población, se construyó un gráfico de CD8 versus CD4 (*APC vs BV650*) para identificar los linfocitos CD3⁺/CD8⁺. Una vez identificada esta población, se estudió, por un lado la polifuncionalidad (panel de polifuncionalidad, **B**) y por otro el fenotipo (panel de memoria, **C**). **(B)** Panel de Polifuncionalidad. El marcador de degranulación y las distintas citoquinas fueron evaluadas construyendo citogramas de CD8⁺ versus FITC, BV711, PerCP-Cy5.5, PE y PECy7, respectivamente. **(C)** Panel de Fenotipo de Memoria. Para identificar las subpoblaciones de memoria, se construyó sobre el *gate* de células CD8⁺, un citograma de CD45RO vs CCR7 (*PerCP-Cy5.5 vs Alexa700*), y a partir de la subpoblación CCR7/CD45RO⁺ un histograma en función de CD95. Este análisis se realizó tanto sobre las células CD8⁺ totales, como HIV-específicas y PD-1⁺. Para identificar las células HIV-específicas se realizó un citograma CD8 versus FITC. Para evaluar la expresión de PD-1 en las diferentes poblaciones, se realizó un citograma en función de PE.

Luego del descongelado, tal como se detalló anteriormente, las células fueron fraccionadas en dos partes, una parte fue expandida con el protocolo expuesto en el capítulo III.4, para generar LT CD8⁺ Nef- y p24-específicos efectores (antígenos que demostraron la mayor eficiencia de expansión en nuestro sistema, ver

Capítulo IV, Resultados). La fracción restante de células fue cultivada durante 14 días (en paralelo a la expansión de los LT CD8⁺) con el anticuerpo monoclonal humano recombinante bi-específico anti-CD3.8 (obtenido del *NIH AIDS Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH*, generados por los Drs. Johnson Wong y Galit Alter: https://www.aidsreagent.org/pdfs/ds12277_001.pdf, *Figura 20*). Este anticuerpo está compuesto por fragmentos de dos anticuerpos monoclonales y se une a las moléculas CD3 y CD8. Al agregarse al cultivo de PBMCs, elimina eficientemente a los LT CD8⁺, enriqueciendo progresivamente el cultivo en células T CD4⁺ activadas (expansión de LT CD4⁺). Para esto, PBMCs fueron plaqueadas en placas de 24 pocillos a una densidad celular de 1,5-2x10⁶ células/ml de RPMI completo adicionado con 50 U/ml de IL-2 hr y 0,5 µg/ml del anticuerpo bi-específico CD3.8, en un volumen final de 1 ml. El medio se renovó cada 72 horas con RPMI completo adicionado con 50 U/ml IL2-hr. Al día 13, se determinó la pureza alcanzada en el cultivo mediante citometría de flujo, empleando anticuerpos monoclonales anti-CD3-PECy7, anti-CD4-PerCP y anti-CD8-BV510, además del marcador de viabilidad *Zombie NIR*. Las células se adquirieron en un citómetro *FACSCanto (BD Biosciences)* y se analizaron con el programa *FlowJo v.10*. La pureza del cultivo fue, en todas las muestras analizadas, de al menos 90% linfocitos T CD4⁺ con una viabilidad del 95% (*Figura 16*). De esta manera se logró obtener, luego de 14 días, un cultivo de aproximadamente 10x10⁶ de LT CD4⁺ *targets* activados para cada individuo estudiado.

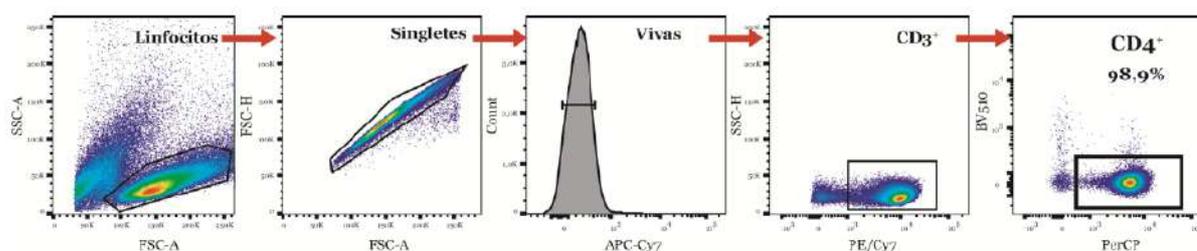


Figura 16: Estrategia utilizada para determinar la pureza del cultivo de LT CD4⁺, obtenidos a partir del tratamiento de PBMCs con el anticuerpo bi-específico CD3.8 más IL-2, durante 14 días.

La expansión de los LT CD8⁺ Nef- y p24- específicos se realizó como se describió en el *Capítulo III. 4*. Al día 13, se determinó, en una fracción de células, el porcentaje de LT CD8⁺ Nef- y p24-específicos (productores de citoquinas o capaces de degranular) valiéndonos del ensayo de estimulación corto descrito en el capítulo *III.6* y usando un protocolo de marca similar al del panel de fenotipo, pero con algunas modificaciones en los anticuerpos empleados: *Zombie-NIR*, anti-CD3-PeCy7, anti-CD4-PerCP,

anti-CD8-BV510, citoquinas (IFN- γ , IL-2, TNF- α) y el marcador de degranulación (CD107A/B) en FITC; esto con el objetivo de identificar el porcentaje de células HIV-específicas. Las células fueron adquiridas en el citómetro *FACS CANTO*. Al día 14 de expansión, los LT CD8⁺ fueron purificados del cultivo mediante un *kit* de separación magnética (*BD Biosciences*), por selección positiva. En primer lugar, se lavaron las células expandidas con una solución de PBS suplementado con 0,5% de albumina sérica bovina (BSA, *bovine serum albumin*), 2 mM EDTA y 0,09% azida (de ahora en más solución S). Luego, se procedió a la separación de los LT CD8⁺ mediante la utilización de un anticuerpo monoclonal anti-CD8 (*BD Biosciences*) que se encuentra conjugado a nanopartículas magnéticas. Para ello, se dispensaron las células en tubos plásticos de 3 ml, se agregaron 50 μ l de nanopartículas por cada 10⁶ PBMCs y se las incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Finalizada la incubación, se diluyó la muestra con solución S y se incubó durante 10 minutos depositando el tubo en el imán magnético para, de esta manera, poder aislar las células que se hubieran pegado a las nanopartículas. Luego sin retirar el tubo del imán, se aspiró el sobrenadante en su totalidad (el cual se descartó), se retiró el tubo del imán y se resuspendieron las células en solución S, se colocó nuevamente el tubo en el imán y se realizó el procedimiento dos veces más a modo de lavado. De esta manera, se purificaron los LT CD8⁺ Nef- y p24-específicos efectores. Luego se procedió con los ensayos de VIA y VITAL, los cuales se describen en detalle a continuación.

III. 7. 1. Ensayo de Inhibición Viral (VIA, *Viral Inhibition Assay*)

III.7.1.1. *Generación de los Stocks Virales*

Para el ensayo de VIA, los LT CD4⁺ autólogos (células *targets* previamente purificadas y activadas mediante el cultivo con el anticuerpo bi-específico CD3.8) fueron infectados, en paralelo, con 4 cepas virales diferentes, todas de subtipo B: una cepa de laboratorio con tropismo X4 (NL4.3) y tres cepas virales obtenidas a partir de aislamientos primarios *Transmitted/founders (T/F)*, seleccionados del panel completo de virus primarios *T/F Infectious Molecular Clones* disponible en el *NIH AIDS Reagent Program (Division of AIDS, NIAID, NIH: catálogo número 11742 [virus T/F de tropismo X4, de ahora en más Virus 4, V4]; catálogo número 11746 [virus T/F de tropismo R5, obtenido a partir de un evento de transmisión heterosexual, de ahora en más Virus 8, V8]; y catálogo número 11749 [virus T/F de tropismo R5, obtenido a partir de un evento de transmisión homosexual, de ahora en más Virus 9, V9] del Dr. John Kappes [129, 130]).* Estos virus fueron pseudotipados y titulados en el laboratorio a partir de los

plásmidos correspondientes obtenidos del *NIH*, con el siguiente protocolo. En primer lugar los plásmidos se amplificaron transformando bacterias competentes de la cepa *Escherichia coli* DH5 α por electroporación (aplicando un pulso de 1,8kV y usando un electroporador *Micro Pulser™*, *Biorad*, EE.UU.), se purificaron mediante el kit comercial *NucleoBond Xtra Midi Plus* (*Macherey-Nagel*, Alemania) y se cuantificaron mediante espectrofotometría (*Multiskan GO, uplate spectrophotometer*, *Thermo Scientific*). Luego, para la obtención de los *stocks* virales, se co-transfectaron células de la línea celular 293T con los plásmidos antes mencionados y un plásmido que expresa la proteína G del virus Virus de la Estomatitis Vesicular (VSV) con el objetivo de obtener partículas virales que expresen la proteína G en membrana y posteriormente lograr una mayor eficiencia de infección. La línea 293T es una línea celular de tipo epitelial derivada de riñón humano y presenta una alta eficiencia de transfección. Esta línea se cultivó en medio *Dulbecco's modified Eagle* (DMEM, Gibco BRL) suplementado con 10% de SFB (Gibco BRL), 2 mM L-glutamina (Gibco BRL), 100 U/ml penicilina (Gibco BRL) y 100 μ g/ml estreptomina (Gibco BRL). La transfección transitoria de la línea celular 293T se llevó a cabo utilizando el reactivo comercial *X-treme GENE 9 DNA transfection reagent* (*Roche*, Suiza), siguiendo las instrucciones del fabricante y utilizando una relación de ADN plasmídico 2HIV:1VSV-G. A las 48 horas post-transfección se cosecharon los sobrenadantes, se clarificaron por centrifugación (600g durante 15 minutos a 4°C) y por último se alicuotaron y se guardaron a -80°C hasta su utilización. Cada *stock* viral se cuantificó mediante la determinación del antígeno p24 en sobrenadante de cultivo utilizando un ensayo comercial de ELISA (*Sino Biological Inc.*, China), incluyendo una curva de calibración.

III.7.1.2. Infección y co-cultivo

Obtenidos los *stocks* virales, se procedió a infectar los LT CD4⁺ *target*. Para ello, las células fueron resuspendidas en RPMI completo y se plaqueron a una densidad de 1x10⁵ LT CD4⁺ en placas de 96 pocillos con fondo en U. Luego se añadieron los virus a los pocillos correspondientes a una concentración final de 15 ng de p24 cada 100.000 células *target*. Para obtener una mejor eficiencia de infección, las placas fueron centrifugadas para favorecer el contacto célula-célula (*espinoculación*) a 3.150 rpm, una hora a 22°C. Luego, se procedió con la adsorción viral durante una hora más a 37°C en atmosfera húmeda con 5% de CO₂. Finalizada la adsorción, se realizaron dos lavados, se resuspendieron las células en 100 μ l de RPMI completo suplementado con 10 U/ml de IL-2hr y se co-cultivaron junto a 100 μ l de células efectoras CD8⁺ Nef-específicas o p24-específicas, en relación 1:1 (*Figura 17*). Para cada sujeto se evaluó un control de infectividad (100% infección, LT CD4⁺ infectados sin el agregado de células efectoras CD8⁺)

y un control negativo (LT CD4⁺ sin infectar y sin efectoras), para corroborar que no se hubiera producido una reactivación viral en las células durante la expansión de los LT CD4⁺ con el anticuerpo bi-específico. Todas las condiciones se ensayaron por triplicado. Las células se co-cultivaron durante 7 días a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂. Al día cuatro post-infección, se reemplazó la mitad del sobrenadante de los co-cultivos por medio fresco. Al día siete post-infección, se recolectaron los sobrenadantes y se evaluó la replicación viral mediante la cuantificación de antígeno p24 en sobrenadante por ELISA. La inhibición de la replicación viral se calculó con la siguiente fórmula:

$$\text{Log}_{10} \frac{\text{media de ng p24/ml (medido en el cultivo de células T CD4}^+ \text{ infectadas } \textit{in vitro})}{\text{media de ng p24/ml (medido en el co-cultivo de células T CD4}^+ \text{:CD8}^+ \text{ infectadas } \textit{in vitro} [1:1])}$$

La magnitud de VIA se expresó como el logaritmo en base 10 de la concentración de antígeno p24 que se pierde cuando las células CD8⁺ efectoras están presentes en el cultivo.

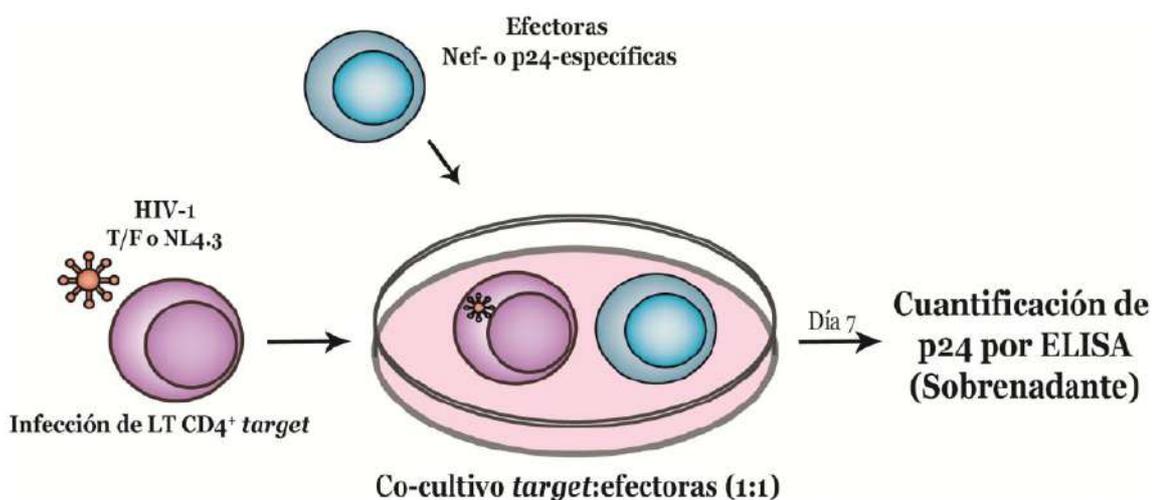


Figura 17: Esquema del ensayo de inhibición de la replicación viral utilizado (VIA), adaptado a nuestro sistema a partir del trabajo publicado por Sáez-Cirión y col. [127].

III. 7. 2. Evaluación de la citotoxicidad directa (Ensayo VITAL)

A partir de las células efectoras y *targets* obtenidas para cada individuo como se detalló en el apartado anterior, se realizó el ensayo VITAL (Figura 18) para evaluar la capacidad de los LT CD8⁺ Nef- y p24-específicos de ejercer citotoxicidad directa. Para ello, los LT CD4⁺ fueron resuspendidos a una densidad de 2x10⁶ células/ml en RPMI completo. Un mililitro (2x10⁶ LT CD4⁺) de esa suspensión se tiñó primero con 100 µl de una solución 1 µM de la molécula fluorescente éster de succinimidil-carboxifluoresceína

(*carboxyfluorescein succinimidyl ester*, CFSE) (*Molecular Probes*, EEUU) a 37°C durante 8 minutos. Esta molécula difunde pasivamente al interior de la célula, se une a aminas intracelulares y sus grupos acetato son clivados por esterasas transformándose en un compuesto altamente fluorescente. Luego de la incubación, se detuvo la reacción con el agregado de 200 µl de SFB y el exceso de reactivo no conjugado se eliminó mediante dos lavados sucesivos con PBS 1% SFB (1500 rpm por 5 minutos). Luego de la tinción, las células CD4⁺CFSE⁺ fueron fraccionadas en dos tubos e incubadas con 2 µg/ml del *pool* de péptidos correspondientes a las proteínas Nef o p24, respectivamente, en RPMI completo durante 2 horas a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂. Después de ser pulsadas con el *pool* de péptidos correspondiente, se lavaron exhaustivamente para eliminar el exceso no unido y se resuspendieron en RPMI completo suplementado de 10 U/ml IL2-hr. En paralelo, 2x10⁶ LT CD4⁺ se tiñeron con 2 µM PKH-26 *red fluorescent cell linker* (*Sigma-Aldrich*, EEUU), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se trata de una molécula fluorescente roja que se incorpora a regiones lipídicas de la membrana celular. Las células CD4⁺PKH-26⁺ se resuspendieron en el mismo medio. Una vez obtenidas las células CD4⁺CFSE⁺ (cargadas con péptidos) y CD4⁺PKH⁺ (sin péptidos), fueron plaqueadas en una relación 1:1 en placa de 96 pocillos con fondo en U (5x10⁴ células de cada población fluorescente por pocillo). Células efectoras Nef- o p24-específicas fueron añadidas a los pocillos correspondientes en distintas relaciones *target*:efectora (T:E, 1:1, 1:5, 1:10 y 1:1 ajustado [se ajustó la relación a la proporción de LT CD8⁺ HIV-específicos, es decir que expresan el marcador CD107A/B o producen citoquinas, determinados por citometría de flujo al día 13 como se especificó al inicio del capítulo]). Todas las condiciones fueron ensayadas por triplicado. Para cada péptido se incluyó un control negativo (LT CD4⁺ de ambas poblaciones fluorescentes, sin efectoras).

Las placas fueron incubadas durante toda la noche a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂, al siguiente día las células fueron lavadas, teñidas con el marcador *Zombie NIR*, y los anticuerpos anti-CD3-PE/Cy7, anti-CD4-PerCP y anti-CD8-BV510 (*Tabla 1*), fijadas con PFA 0,5% y analizadas en el citómetro BD *FACSCanto* utilizando el programa BD *FACSDiva*. Luego, los datos fueron analizados con el programa *FlowJo* v.10, de la siguiente manera (*Figura 19*): la selección inicial se realizó en un gráfico FSC-A *versus* FSC-H para excluir dobletes, seguido por la selección de los linfocitos en un gráfico FSC-H *vs* SSC-A. Sobre esta población, se excluyeron cuidadosamente las células muertas (*Zombie-NIR* positivas) y se construyó un citograma de CD3 (PE/Cy7) *versus* SSC-H (*side-scatter light-height*). Sobre éste, se seleccionaron los LT CD4⁺ en un gráfico de CD8 *versus* CD4 (PerCP *vs* BV510), y sobre esta población se realizó el análisis. Se graficó un citograma de CFSE *versus* PKH-26 y se determinó la supervivencia de los

LT CD4⁺ *target* cargados de antígeno (CFSE⁺) en presencia de las efectoras en las diferentes relaciones T:E, comparado con las condiciones que carecían de células efectoras. La supervivencia ajustada se calculó como el porcentaje medio de eventos CFSE⁺ en presencia de efectoras *versus* la condición sin efectoras. Finalmente, el porcentaje de lisis específica se calculó con la siguiente ecuación: %Lisis específica= 100 - %supervivencia ajustada.

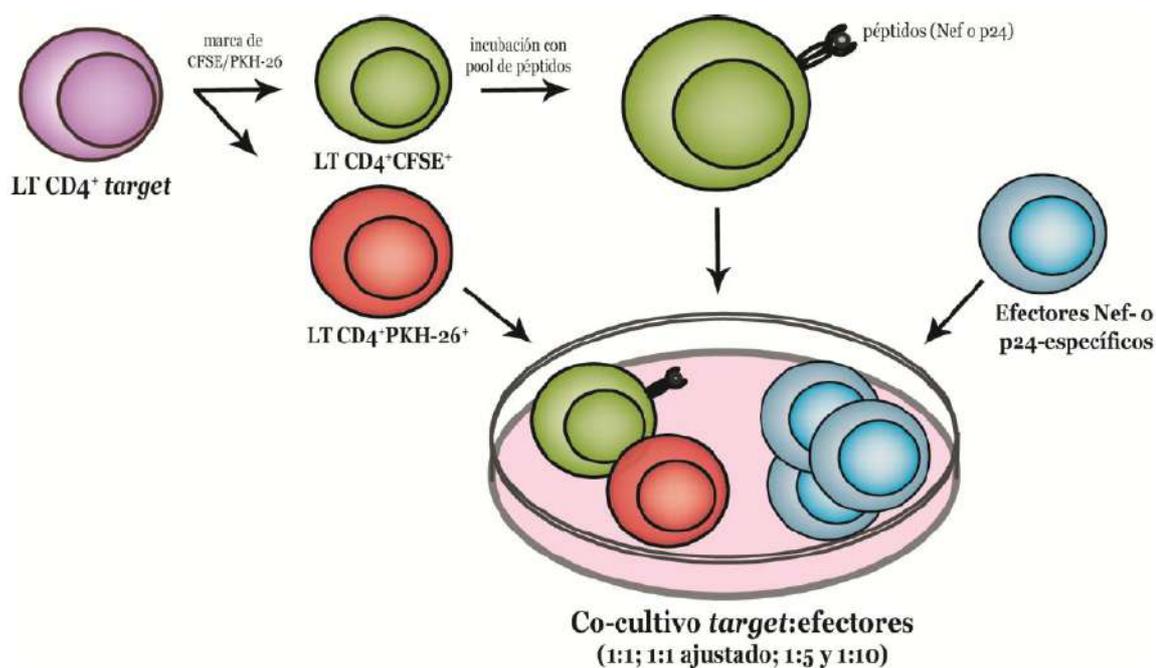


Figura 18: Esquema gráfico del ensayo VITAL (VITAL Assay), adaptado a nuestro sistema a partir del trabajo publicado por *Hermans* y col. de [128].

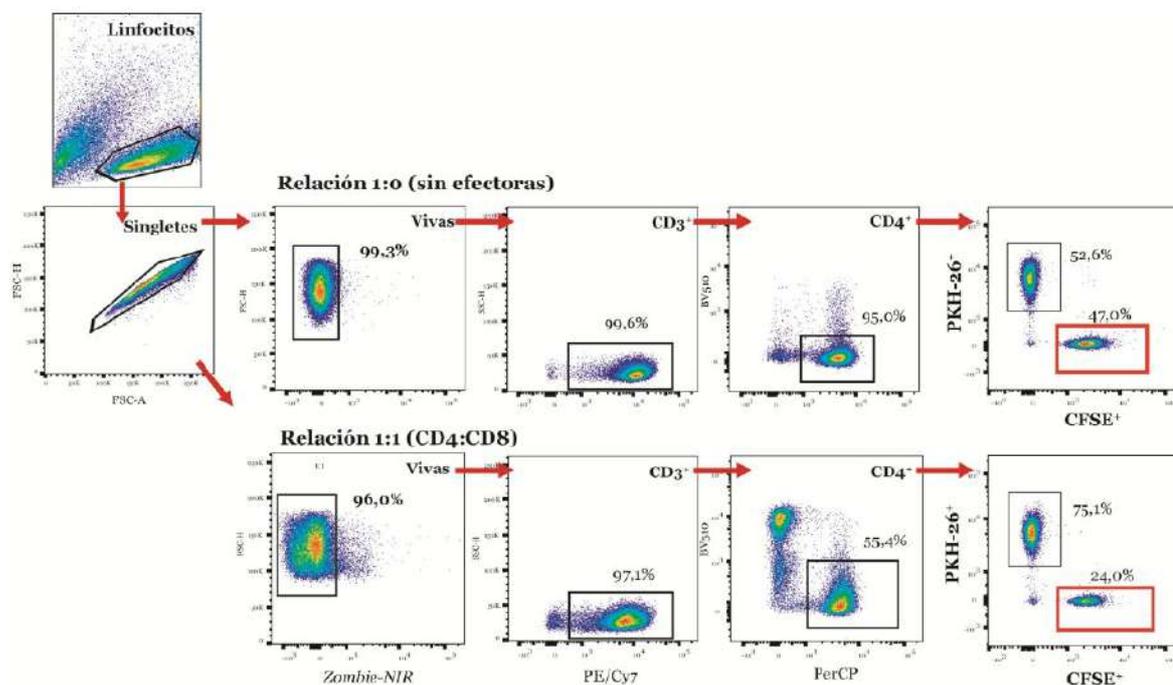


Figura 19: Estrategia de selección por citometría de flujo empleada en el ensayo VITAL para determinar el porcentaje de lisis específica. Citometría obtenida en el ensayo VITAL para un individuo representativo, donde se muestra la condición sin el agregado células efectoras CD8⁺ (panel superior) y la pérdida de células CD4⁺ al agregar las efectoras en una relación CD4:CD8 1 a 1 (panel inferior).

III. 8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La fecha probable de infección de los individuos reclutados se calculó en base al trabajo de *Socias* y colaboradores [116, 131]. La fecha de inicio del tratamiento fue informada por los médicos tratantes de la cohorte. Los datos obtenidos se expresaron como valores de mediana con rangos intercuartiles (25% a 75%, IQ25-75) a menos que se indique lo contrario. El análisis estadístico de los datos fue llevado a cabo utilizando el programa *GraphPad Prism 7* (*GraphPad Software*, EE.UU.) excepto aquellos donde se indica que se utilizó el programa *SPICE*. Todos los datos se analizaron mediante métodos no paramétricos. Las pruebas de *Wilcoxon* y *Mann-Whitney* se utilizaron para comparar diferencias intra- e inter-grupos, respectivamente. En el caso de las comparaciones entre más de dos grupos se utilizó la prueba de *Kruskal-Wallis* seguido del post *test* de *Dunn*. Las correlaciones estudiadas fueron analizadas mediante la prueba de *Spearman's*. Todas las pruebas fueron consideradas estadísticamente significativas cuando el valor de *p* obtenido fue menor de 0,05. En el caso de las correlaciones que involucraron múltiples parámetros, los valores de *p* fueron ajustados por comparaciones múltiples mediante el cálculo

de la tasa de descubrimientos falsos (FDR, *false discovery rate*), de acuerdo al método de *Benjamini & Hochberg*, utilizando el programa *GraphPad Prism 7*. Este método de ajuste evalúa la proporción esperada de falsos positivos entre las pruebas que fueron significativas. Las correlaciones ajustadas fueron consideradas estadísticamente significativas cuando el valor de p ajustado (p^*) resultó menor a 0,1. Para el análisis de los datos de polifuncionalidad y fenotipo de memoria generados por citometría de flujo, se usó el programa *SPICE* versión 6.0 (<https://niaid.github.io/spice/>) siguiendo las consideraciones experimentales y técnicas publicadas por los desarrolladores [132]. Particularmente, la prueba t de *Student* y pruebas de permutación parcial (incluidas en el paquete) se utilizaron para comparar los perfiles de distribución entre grupos.

III. 9. RESUMEN DE ENSAYOS REALIZADOS Y ESQUEMA GRÁFICO DE TRABAJO

A continuación se detallan en la *Tabla 2 y Figura 20* un resumen global de la estrategia experimental utilizada en las diferentes muestras objeto de estudio, como se explicó anteriormente.

<i>Ensayos</i>	<i>Muestras</i>		
	<i>Basal</i>	<i>Pre-cART</i>	<i>Post-cART</i>
Activación <i>ex vivo</i>	✓	✓	
ELISPOT pre-expansión			✓
ELISPOT post-expansión			✓
Polifuncionalidad <i>ex vivo</i>	✓	✓	
Polifuncionalidad post-expansión			✓
Perfil de Memoria y expresión de PD-1 <i>ex vivo</i>	✓	✓	
Perfil de Memoria y expresión de PD-1 post-expansión			✓
Ensayos VIA y VITAL			✓

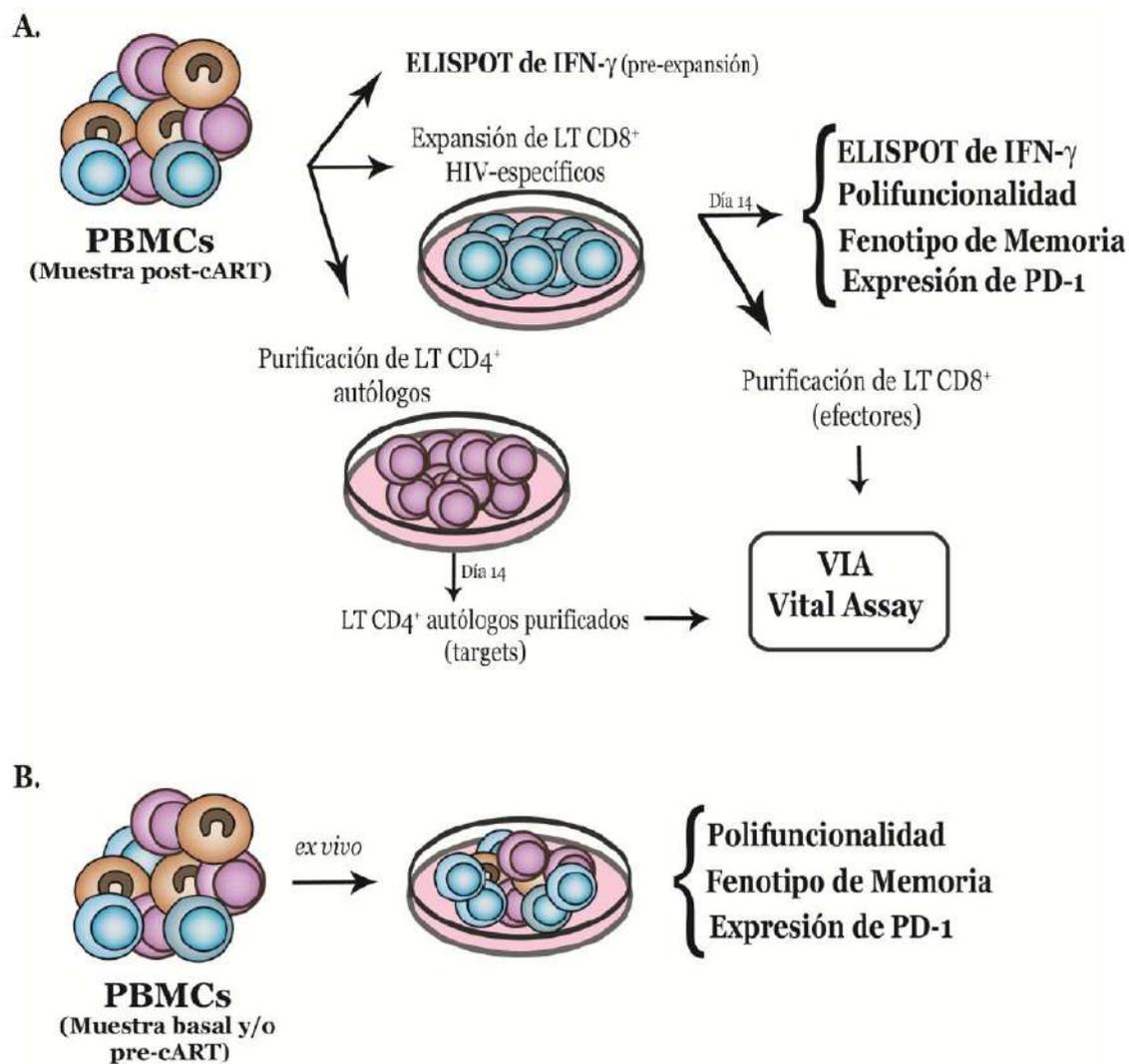


Figura 20: Esquema gráfico de la estrategia experimental. **(A)** Ensayos realizados en las muestras post-cART: expansión de LT CD8⁺, ELISPOT, evaluación del perfil polifuncional, evaluación del fenotipo de memoria y expresión de PD-1, y evaluación de la actividad antiviral (VIA y VITAL). **(B)** Ensayos realizados en las muestras basales y/o pre-cART: evaluación del perfil polifuncional, evaluación del fenotipo de memoria y expresión de PD-1.

IV. RESULTADOS

“En algún lugar, alguna cosa increíble aguarda a ser descubierta”

Carl Sagan

IV. 1. DESCRIPCIÓN DE LA POBLACIÓN EN ESTUDIO

Con el objetivo de estudiar las características fenotípicas y funcionales de los linfocitos T CD8⁺ (LT CD8⁺) que permanecen luego de iniciado el tratamiento se utilizaron muestras de veinticinco individuos seropositivos para la infección por HIV. Los individuos fueron inicialmente reclutados durante la seroconversión y/o dentro de los primeros seis meses luego de la fecha probable de infección, siguiendo los criterios definidos en *Materiales y Métodos (Capítulo III)*, y fueron seguidos durante, al menos, un año luego de iniciado el tratamiento. Basándonos en el hecho de que los LT CD8⁺ son claves en el establecimiento del *set-point* viral, es decir en la estabilización del nivel de CV luego de la infección aguda [133], y que el mismo es alcanzado alrededor de los cuatro meses luego de la infección [20, 134], se tomó ese criterio como punto de corte para definir los dos grupos de estudio: el grupo de inicio de **tratamiento tardío (TTa, n=12 individuos)**, formado por aquellos individuos que iniciaron el tratamiento antirretroviral después de cuatro meses de la fecha estimada de infección y el grupo de inicio de **tratamiento temprano (TTe, n=13 individuos)**, formado por sujetos que iniciaron el tratamiento dentro de los cuatro meses de la fecha estimada de infección. De esta manera, las respuestas evaluadas representan escenarios pre y post establecimiento del *set-point* viral. El grupo TTa presentó una mediana de tiempo hasta el inicio del tratamiento igual a 20 meses (Rango Intercuartilo [IQ25-75]: 9,50-24,25 meses) mientras que el grupo TTe presentó una mediana de tiempo hasta el inicio del tratamiento igual a 3 meses (IQ25-75: 2-3,50 meses; *Figura 14*). Para este trabajo, se utilizaron muestras obtenidas al momento del diagnóstico de la infección aguda (muestra basal para el grupo TTa y TTe), antes del inicio del tratamiento (muestra pre-tratamiento o pre-cART, sólo para el grupo TTa) y luego de un año de iniciado el tratamiento (muestra post-tratamiento o post-cART, para el grupo TTa y TTe). Para el grupo TTe sólo se contó con la muestra basal, ya que este grupo de individuos fue reclutado luego de la implementación de los nuevos lineamientos de la OMS que recomiendan iniciar el cART lo más tempranamente posible luego del diagnóstico de la infección, lineamientos que Argentina incorporó a las guías nacionales en 2015. La muestra post-cART fue la principal muestra objeto de estudio en este trabajo y sobre la cual se realizó el protocolo de expansión de LT CD8⁺. La mediana de tiempo desde el momento de inicio del tratamiento hasta la toma de la muestra post-cART fue de 13 meses [IQ25-75: 5,75-18 meses] para el grupo TTa y de 14 meses [IQ25-75: 12-16,50 meses] para el grupo TTe. La descripción detallada de los participantes del estudio se muestra en la *Tabla 3*.

Tabla 3: Datos clínicos correspondientes a los individuos HIV+ reclutados

Sujeto ^a	Sexo	Tiempo sin cART ^b (meses)	Tiempo en cART ^c (meses)	Carga Viral (copias ARN/ml plasma) ^d		Recuento de LT CD4 ⁺ (células/ μ l) ^e			Relación CD4/CDS ^d		
				Basal	Pre-cART ^f	Basal	Pre-cART ^f	Post-cART ^g	Basal	Pre-cART ^f	Post-cART ^g
TTa01	F	50	22	935	48.526	590	383	524	0,85	0,72	1,35
TTa02	M	22	18	53.303	132.317	393	324	297	0,72	0,46	0,52
TTa03	M	8	18	110.105	125.716	436	391	711	0,58	0,48	0,65
TTa04	M	11	5	1.093	27.244	1.012	465	535	0,87	0,45	0,74
TTa05	F	25	5	17.420	4.612	685	408	739	0,39	0,48	1,00
TTa06	M	19	15	37.169	66.929	505	246	501	0,36	0,24	0,62
TTa07	F	50	5	363.614	15.297	496	330	468	0,29	0,42	0,77
TTa08	M	5	12	332.928	>500.000	337	279	528	0,20	0,26	0,72
TTa09	M	21	14	15.553	28.288	493	184	579	0,35	0,30	0,88
TTa10	M	13	20	1.315	1.702	504	357	563	0,47	0,44	0,72
TTa11	M	22	12	661	10.033	ND	819	819	ND	0,88	1,36
TTa12	M	9	8	128.764	111.893	492	629	880	1,61	0,85	1,53
TTe01	M	2	14	>500.000	-	627	-	594	0,66	-	0,89
TTe02	M	4	18	283.441	-	187	-	522	0,20	-	0,88
TTe03	M	1	11	36.338	-	768	-	1099	1,18	-	1,83
TTe04	M	3	14	17.292	-	612	-	1342	0,33	-	1,32
TTe05	M	3	15	20.106	-	787	-	829	1,06	-	1,69
TTe06	M	2	18	>500.000	-	421	-	854	0,31	-	1,89
TTe07	M	1	13	>500.000	-	435	-	942	0,13	-	1,52
TTe08	M	3	12	172.468	-	435	-	657	0,59	-	1,16
TTe09	M	3	17	26.547	-	400	-	728	0,70	-	1,79
TTe10	M	3	11	231.360	-	330	-	1080	0,18	-	1,24
TTe11	M	2	12	>500.000	-	654	-	1026	0,42	-	1,47
TTe12	M	4	16	>500.000	-	339	-	691	0,08	-	0,66
TTe13	M	4	12	>500.000	-	213	-	386	0,19	-	0,81

^a TTA: grupo de inicio tardío del tratamiento, TTe: grupo de inicio temprano del tratamiento.

^b Tiempo desde la fecha estimada de infección hasta el momento de inicio del tratamiento (meses).

^c Tiempo transcurrido entre el momento de inicio del tratamiento y la toma de la muestra que se utilizó en este estudio (meses).

^d Ensayo *Versant HIV-1 RNA 3.0*, Siemens. Los límites de detección inferior y superior fueron de 50 y 500.000 copias de ARN/ml de plasma, respectivamente.

^e Citometría de flujo, BD Trucount, BD Biosciences.

^f Determinaciones evaluadas en la muestra inmediata anterior al momento de inicio del tratamiento.

^g Determinaciones evaluadas en la muestra tomada luego de un año de iniciado el tratamiento.

F: Femenino, M: Masculino, ND: No Disponible.

La CV plasmática evaluada en la muestra basal del grupo TTA (mediana 27.295 copias de RNA/ml de plasma [IQ25-75: 1.149-124.099]) fue significativamente diferente a la evaluada en la muestra basal del grupo TTe (mediana 283.441 copias de RNA/ml de plasma [IQ25-75: 31.443-500.000]; $p=0,0068$; *Tabla 4* y *Figura 21A*). Además, la CV plasmática evaluada en la muestra basal del grupo TTe fue

significativamente mayor a la evaluada en la muestra pre-cART del grupo TTa (mediana 38.407 copias de RNA/ml de plasma [IQ25-75: 11.349-122.260]; $p=0,029$). No se observaron diferencias entre la muestra basal y la muestra pre-cART del grupo TTa. Esto refleja el hecho de que los individuos del grupo TTa ya alcanzaron el *set-point* viral al momento del inicio del cART. En todas las muestras obtenidas luego de un año de iniciado el cART (post-cART), para ambos grupos de estudio, la CV plasmática fue indetectable (menor al límite inferior de detección= 50 copias de ARN/ml de plasma) (Tabla 4 y Figura 21A).

Tabla 4: Resumen datos clínicos de los grupos bajo estudio

Grupos y Muestras	CV (copias ARN/ml) Mediana (IQ25-75)^a	Recuento CD4⁺ (n° células/μl) Mediana (IQ25-75)^a	Relación CD4/CD8 Mediana (IQ25-75)^a
TTa Basal	27.295 (1.149-124.099)	496 (436-590)	0,40 (0,35-0,85)
TTa pre-cART	38.407 (11.349-122.260)	370 (290-450)	0,45 (0,33-0,66)
TTa post-cART	<50	549 (506-732)	0,76 (0,67-1,26)
TTe basal	283.441 (31.443-500.000)	435 (334-640)	0,33 (0,18-0,68)
TTe post-cART	<50	829 (625-1.053)	1,32 (0,89-1,74)

^aIQ25-75: Intercuartilo 25-75%.

Luego se evaluó el recuento de LT CD4⁺ y la relación CD4/CD8 en las diferentes muestras obtenidas. No se observaron diferencias entre ninguna de las muestras obtenidas antes del cART de ambos grupos (TTa Basal: mediana del recuento de LT CD4⁺= 496 células/μl [IQ25-75: 436-590] y mediana de la relación CD4/CD8 0,47 [IQ25-75: 0,35-0,85]; TTa pre-cART: mediana del recuento de LT CD4⁺= 370 células/μl [IQ25-75: 290-450] y mediana de la relación CD4/CD8 0,45 [IQ25-75: 0,33-0,66]; TTe Basal: mediana del recuento de LT CD4⁺= 435 células/μl [IQ25-75: 334-640], y mediana de la relación CD4/CD8 0,33 [IQ25-75: 0,18-0,68]) (Figura 21B y C, Tabla 4). Los dos grupos experimentaron una mejora significativa en ambos parámetros al año de haber iniciado el cART (post-cART). Dentro del grupo TTa, se observó una diferencia significativa, tanto en el recuento de LT CD4⁺ como en la relación CD4/CD8, entre la muestra pre-cART y post-cART (TTa post-cART: mediana del recuento de LT CD4⁺= 549 células/μl [IQ25-75: 506-732] y mediana de la relación CD4/CD8=0,76 [IQ25-75: 0,67-1,26]; $p=0,006$ y $p=0,0108$, respectivamente), pero sólo una pequeña tendencia sin significancia estadística, entre la muestra basal y la muestra post-cART en la relación CD4/CD8 ($p=0,0512$). De la misma manera, el recuento de LT CD4⁺ y la relación CD4/CD8 en la muestra basal del grupo TTe resultó significativamente menor que en la muestra post-cART (mediana del recuento de LT CD4⁺= 829 células/μl [IQ25-75: 625-1.053], y mediana de la relación CD4/CD8 1,32 [IQ25-75: 0,89-1,74]; $p=0,0005$ y $p=0,0002$,

respectivamente). Además, tanto el recuento de LT CD4⁺ como la relación CD4/CD8 evaluada en la muestra bajo tratamiento (post-cART) fueron significativamente mayores en los individuos TTe comparado a los TTa (p=0,025 y p=0,014, respectivamente), evidenciando un deterioro en la recuperación de LT CD4⁺ en los individuos TTa luego de un mayor período de tiempo transcurrido antes de iniciado el tratamiento.

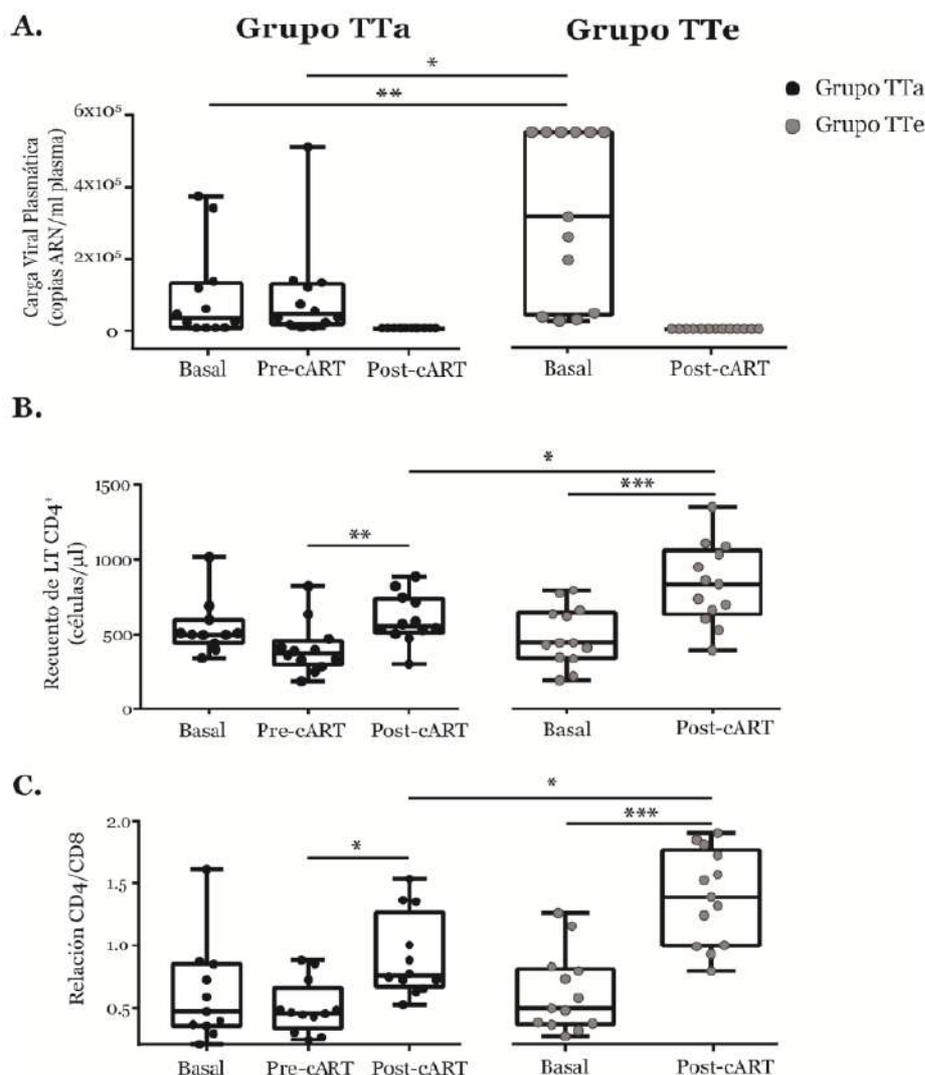


Figura 21: Parámetros clínicos evaluados en las muestras obtenidas de individuos pertenecientes al grupo TTa (muestra basal, pre-cART y post-cART) y al grupo TTe (muestra basal y post-cART). **(A)** CV plasmática. **(B)** Recuento absoluto de LT CD4⁺. **(C)** Relación CD4/CD8. La determinación del recuento de LT CD4⁺ y LT CD8⁺ se llevó a cabo por citometría de flujo. Las líneas horizontales muestran los valores de mediana. Los puntos negros representan al grupo TTa y los grises al grupo TTe. Los asteriscos denotan distintos valores de p: *, p<0,05; **, p<0,01 y ***, p<0,001, los cuales se calcularon utilizando la prueba de *Mann-Whitney* para los análisis intergrupo, *Wilcoxon* para los análisis intragrupo en el caso del grupo TTe y *Kruskal-Wallis*, seguido del *post test* de *Dunn* para los análisis intragrupo en el caso del grupo TTa.

Asimismo, en las muestras obtenidas antes del inicio del tratamiento (muestra basal en ambos grupos y muestra pre-cART en el grupo TTa), se evaluó la activación inmune celular, parámetro predictor de progresión a enfermedad [135]. Para ello se determinó, mediante citometría de flujo, el porcentaje de LT CD4⁺ y CD8⁺ que expresaron los marcadores de activación CD38 y HLA-DR, ya sea de manera individual o simultánea (*Figura 22A*). En el compartimento T CD4⁺ se observaron niveles elevados de expresión de la molécula CD38 (TTa basal mediana: 31,60% [IQ25-75= 9,45%-68,67%]; TTa pre-cART mediana: 53,80% [IQ25-75= 50,20%-69,30%]; TTe basal mediana: 41,65% [IQ25-75= 13,47%-56,65%]), y no se observaron diferencias entre las muestras y/o los grupos evaluados. El porcentaje de LT CD4⁺ que expresaron en superficie tanto la molécula HLA-DR por sí sola como junto a CD38, fueron de menor magnitud comparado al porcentaje de LT CD4⁺CD38⁺ (expresión de HLA-DR= TTa basal mediana: 2,46% [IQ25-75= 1,80%-9,21%], TTa pre-cART mediana: 25,30% [IQ25-75= 11,87%-33,55%], TTe basal mediana: 8,13% [IQ25-75= 4,58%-16,85%]; expresión simultánea de CD38/HLA-DR= TTa basal mediana: 1,66% [IQ25-75= 0,98%-3,31%], TTa pre-cART mediana: 11,00% [IQ25-75= 6,61%-17,85%], TTe basal mediana: 6,39% [IQ25-75= 2,16%-12,40%]). Dentro del grupo TTa, los porcentajes de LT CD4⁺ HLA-DR⁺ y CD38/HLA-DR⁺ fueron significativamente mayores en la muestra pre-cART *vs* la muestra basal ($p=0,0219$ y $p=0,0245$, respectivamente). En el compartimento T CD8⁺, también se encontraron elevados niveles de expresión de la molécula CD38 (TTa basal mediana: 45,20% [IQ25-75= 18,33%-94,10%]; TTa pre-cART mediana: 70,50% [IQ25-75= 52,95%-74,10%]; TTe basal mediana: 71% [IQ25-75= 58,83%-82,23%]), y no se observaron diferencias significativas entre las muestras y/o los grupos evaluados (*Figura 22B*). Tampoco se observaron diferencias en la expresión de HLA-DR (TTa basal mediana: 18,71% [IQ25-75= 13,33%-30,78%]; TTa pre-cART mediana: 57% [IQ25-75= 30,10%-65,20%]; TTe basal mediana: 40,15% [IQ25-75= 31,50%-67,85%]) en este compartimento. Al evaluar la expresión simultánea de ambos marcadores de activación, se observó una mayor proporción de LT CD8⁺ CD38/HLA-DR⁺ en la muestra basal del grupo TTa (mediana: 12,40% [IQ25-75= 9,70%-20,25%]) comparada con la muestra basal del grupo TTe (mediana: 36,20% [IQ25-75= 24,51%-61,60%]; $p=0,0143$) y, aunque no significativa, una leve tendencia en la muestra basal a poseer menores niveles de expresión comparado con la muestra pre-cART del grupo TTa (mediana: 41% [IQ25-75= 25,10%-49%]; $p=0,0653$).

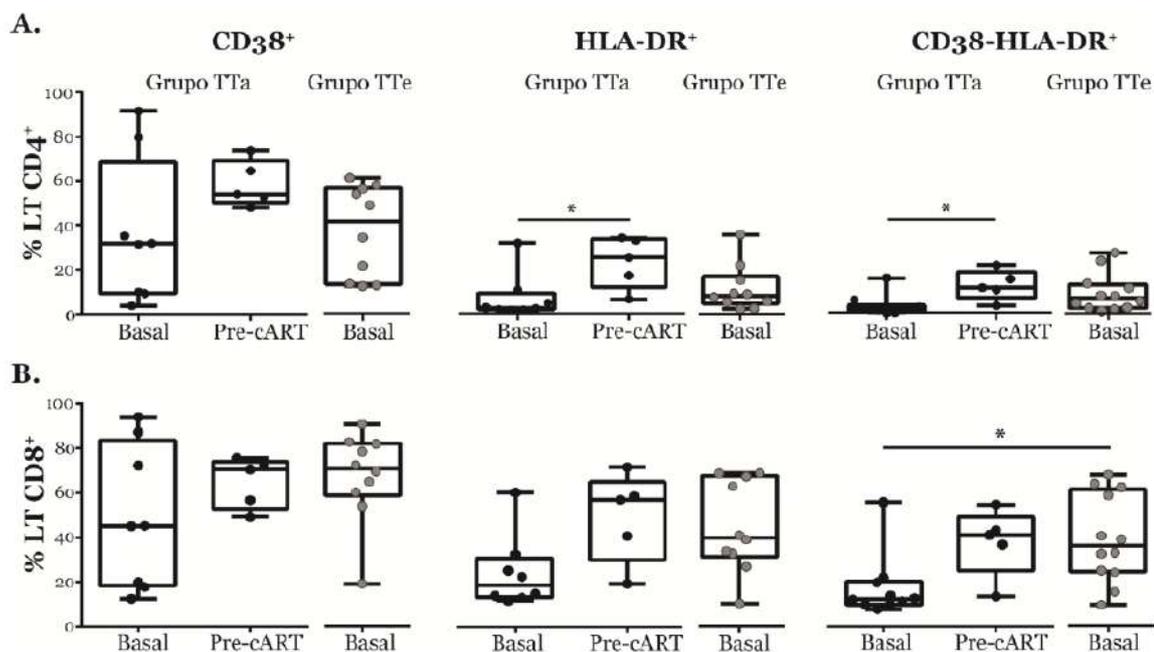


Figura 22: Expresión de marcadores de activación inmune celular evaluado en las muestras obtenidas antes de iniciar el cART. **(A)** Activación inmune en la población de LT CD4⁺. **(B)** Activación inmune en la población de LT CD8⁺. Para el grupo TTa (puntos negros) los valores corresponden a las muestras basal y pre-cART. En el caso del grupo TTe (puntos grises) los valores corresponden a la muestra basal. Las líneas horizontales muestran los valores de mediana. Las cajas representan el recorrido intercuartílico y los bigotes se extienden del mínimo al máximo. p: *, p < 0,05, prueba de *Kruskal-Wallis*, seguido del post test de *Dunn*.

En resumen, el inicio de manera temprana del tratamiento impacta fuertemente en la recuperación de los LT CD4⁺, permitiendo alcanzar, al año post-cART, mayores recuentos que en aquellos individuos que lo iniciaron de manera más tardía. Los individuos del grupo TTe presentaron mayores valores de CV plasmática y activación inmune basales que los individuos TTa. Esto estaría reflejando el hecho de que las muestras basales del grupo TTe se tomaron a tiempos más tempranos respecto de la fecha probable de infección y, por lo tanto, no habrían alcanzado el *set-point* viral [135, 136]. Además, la muestra pre-cART del grupo TTa mostró mayores niveles de activación inmune, particularmente en el compartimento T CD4⁺. Esto sería reflejo de una persistencia más prolongada de antígenos circulantes, lo cual retroalimenta los procesos de infección e inmunopatogenia [137].

IV. 2. ANÁLISIS DE LA RESPUESTA CELULAR T CD8⁺ HIV-ESPECÍFICA MEDIANTE ELISPOT EN LA MUESTRA POST-TRATAMIENTO (PRE- Y POST-EXPANSIÓN)

El primer objetivo específico planteado en este trabajo fue determinar la magnitud y calidad de la respuesta T CD8⁺ HIV-específica en individuos TTa y TTe. Teniendo en cuenta que la frecuencia de LT

CD8⁺ HIV-específicos decae significativamente luego del inicio del tratamiento, y que la tasa media de decaimiento es de aproximadamente 40 semanas [77], se evaluó en primer lugar si los LT CD8⁺ HIV-específicos en las muestras obtenidas luego de un año bajo cART podían ser expandidos en un modelo de expansión *in vitro*. Para ello, se estimularon PBMCs con péptidos de HIV correspondientes a las proteínas de Nef, p17 y p24, o con el *pool* de péptidos control CEF, en presencia de IL-2hr durante 14 días. La proporción de células específicas fue evaluada por ELISPOT y se realizó antes (*ex vivo*) y después de la expansión, con el objetivo de evidenciar la magnitud de la misma (ELISPOT pre- y post-expansión). Para simplificar ciertos análisis, las respuestas anti-p24 y anti-p17 se sumaron y se muestran como respuesta anti-Gag. El análisis de la respuesta hacia péptidos de CEF se incluyó en este estudio debido a que representa la respuesta dirigida contra patógenos que, al contrario de HIV, causan infecciones agudas autolimitadas (Influenza) o infecciones crónicas controladas (CMV y *Epstein-Barr*). En la *Figura 23* se muestran, a modo de ejemplo, los resultados obtenidos en un individuo representativo, cuyas células fueron estimuladas con el *pool* de péptidos de CEF durante el ensayo de ELISPOT: control negativo (DMSO) (*Figura 22A*), respuesta positiva obtenida antes de la expansión sembrando 100.000 células por pocillo (*ex vivo*, pre-expansión) (*Figura 22B*), y las respuestas positivas obtenidas luego de la expansión (post-expansión) al sembrar 25.000 células (*Figura 22C*) o 50.000 células por pocillo (*Figura 22D*).

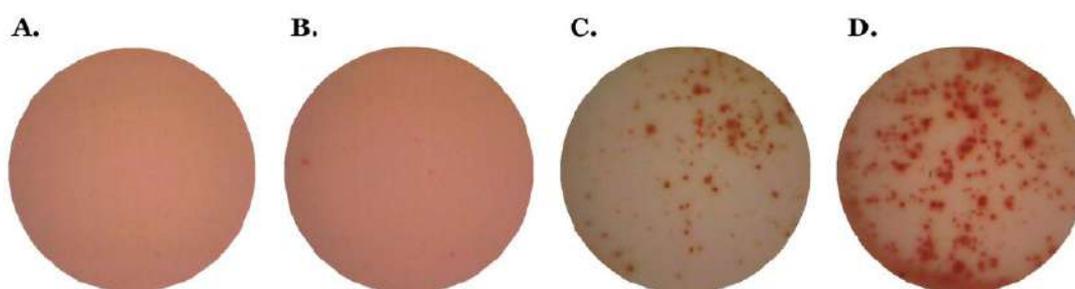


Figura 23: Evaluación de células productoras de IFN- γ mediante ELISPOT, pre- y post-expansión. Pocillos representativos obtenidos: **(A)** control negativo, **(B)** positivo obtenido pre-expansión (*ex vivo*), sembrando 100.000 células por pocillo, **(C)** positivo obtenido post-expansión luego de sembrar 25.000 células por pocillo y **(D)** positivo obtenido post-expansión luego de sembrar 50.000 células por pocillo.

IV. 2. 1. Magnitud de la respuesta HIV-específica evaluada luego de la expansión en los individuos reclutados

En el grupo TTA, la mediana de la magnitud de las respuestas HIV-específicas y CEF-específicas (expresadas como unidades formadoras de *spots* por millón de células o, en inglés, *spots forming units*

SFU/10⁶ PBMCs) pre-expansión fue de 30 SFU/10⁶ PBMCs (IQ25-75: 25-65) en el caso de la respuesta anti-Nef; 107,5 (IQ25-75: 58,75-257,5) en el caso de la respuesta anti-Gag y 147,5 (IQ25-75: 51,25-366,3) para la respuesta anti-CEF (*Figura 24A*). No se encontraron diferencias significativas con las respuestas halladas pre-expansión en el grupo TTe, cuyos valores fueron: 25 (IQ25-75: 25-55) para Nef; 40 (IQ25-75: 25-346,3) para Gag; y 117,5 SFU/10⁶ PBMCs (IQ25-75: 25-495) para CEF. Luego de la expansión *in vitro*, la magnitud de las respuestas dirigidas hacia todos los antígenos evaluados aumentó significativamente ($\approx 10^3$ veces) en ambos grupos estudiados y las mismas fueron predominantemente mediadas por LT CD8⁺, según se corroboró luego por citometría de flujo (ver la siguiente sección, *Capítulo IV.3*). Esto es consistente con una mayor representación de péptidos presentados en el contexto del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (CMH-I) dentro de los *pools* de péptidos evaluados. En el grupo TTa, los valores obtenidos fueron 9.390 SFU/10⁶ PBMCs (IQ25-75: 2.800-255.455) en el caso de la respuesta anti-Nef ($p=0,0039$, comparado a la condición pre-expansión), 7.700 (IQ25-75: 3.415-507.893) para Gag ($p=0,002$) y 253.155 (IQ25-75: 617,5-500.000) para CEF ($p=0,0176$). En el grupo TTe, los valores fueron 2.110 SFU/10⁶ PBMCs (IQ25-75: 441,3-5.900) en el caso de la respuesta anti-Nef ($p=0,0005$, comparado a la condición pre-expansión), 3.105 (IQ25-75: 1.365-4.578) para Gag ($p=0,0005$) y 8.740 (IQ25-75: 940-500.000) para CEF ($p=0,0005$; *Figura 24A*). No se observaron diferencias, para ningún antígeno evaluado, entre los grupos estudiados.

Luego, se evaluó la contribución relativa de cada antígeno a la respuesta HIV total antes y después de la expansión, de manera de proporcionar una imagen de la amplitud de la respuesta pre- y post-expansión para ambos grupos. Para esto, se analizó la proporción de células específicas para cada antígeno en relación al total de la respuesta HIV-específica (suma de la respuesta T frente a Nef, p17 y p24; *Figura 24B*). Al evaluar la contribución de cada antígeno a la respuesta HIV total antes de la expansión (pre-expansión, *ex vivo*) no se encontraron diferencias entre los grupos y se observó un patrón de contribución similar de cada antígeno al total de la respuesta (TTa pre-expansión: 34,80% respuesta anti-Nef, 31,50% anti-p17 y 33,70% anti-p24; TTe pre-expansión: 31,50% respuesta anti-Nef, 23,90% anti-p17 y 44,60% anti-p24). El patrón de inmunodominancia no se modificó luego de la expansión para el grupo TTa, mostrando una contribución similar de las respuestas anti-Nef, p17 y p24 a la respuesta HIV total (37,40% respuesta anti-Nef, 27,40% anti-p17 y 35,20% anti-p24). En cambio, en el grupo TTe se observó post-expansión una menor contribución de la respuesta anti-p17 (6,30%) a la respuesta total, tanto al compararla con la condición pre-expansión (análisis intragrupo; $p=0,001$) como con la condición post-

expansión del grupo TTa (análisis intergrupo, $p=0,009$), lo que resultó globalmente en una respuesta más acotada y dirigida principalmente hacia Nef y p24 (45,90% respuesta anti-Nef y 47,80% anti-p24).

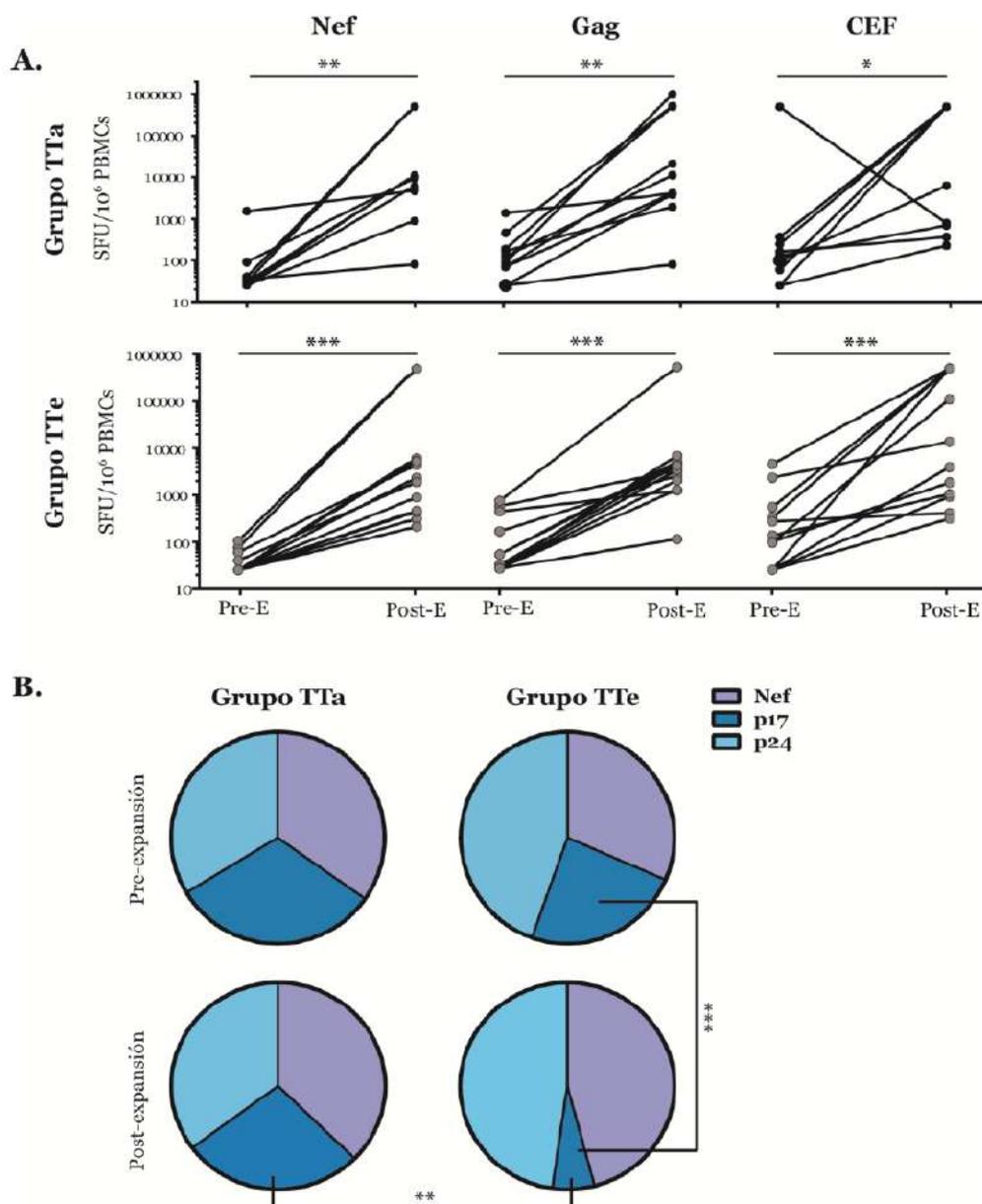


Figura 24: Análisis de la respuesta HIV específica por ELISPOT, pre- y post-expansión. **(A)** Magnitud de la respuesta total anti-Nef, anti-Gag y anti-CEF expresado como unidades formadoras de spots por millón de células (SFU/10⁶ PBMCs), antes (Pre-E) y después (Post-E) de la expansión *in vitro*. Los puntos negros representan al grupo TTa y los grises al grupo TTe. **(B)** Contribución relativa de cada antígeno al total de la respuesta HIV-específica expresado como el porcentaje de cada respuesta sobre la suma de las respuestas HIV-específicas. Las tortas superiores e inferiores reflejan los datos obtenidos pre y post-expansión, respectivamente, para cada grupo. Todos los datos corresponden a la muestra post-cART. Los asteriscos denotan distintos valores de p: *, $p<0,05$; **, $p<0,01$ y ***, $p<0,005$, los cuales se calcularon utilizando la prueba de *Mann-Whitney* para los análisis intergrupo, *Wilcoxon* para los análisis intragrupo. Pre-E=pre-expansión; Post-E=post-expansión.

Luego, se evaluó el tamaño de los *spots* obtenidos en el ensayo de ELISPOT, como una primera aproximación a la calidad de la respuesta HIV- y CEF-específicas, pre- y post-expansión. El tamaño promedio de los *spots* se correlaciona directamente con la cantidad de IFN- γ producido por cada célula T específica de manera individual (lo que, a su vez, se correlaciona de manera indirecta con la avidéz funcional de las células [138]). Se observó un aumento significativo post-expansión del tamaño promedio de los *spots* obtenidos en función de los distintos estímulos utilizados, para todos los antígenos evaluados y en ambos grupos (para el grupo TTa: respuesta anti-Nef $p=0,0039$, respuesta anti-Gag $p=0,0020$ y respuesta anti-CEF $p=0,0020$; para el grupo TTe: respuesta anti-Nef $p=0,0005$, respuesta anti-Gag $p=0,0029$ y respuesta anti-CEF $p=0,0010$; *Figura 25*). No se observaron diferencias significativas entre los grupos TTa y TTe.

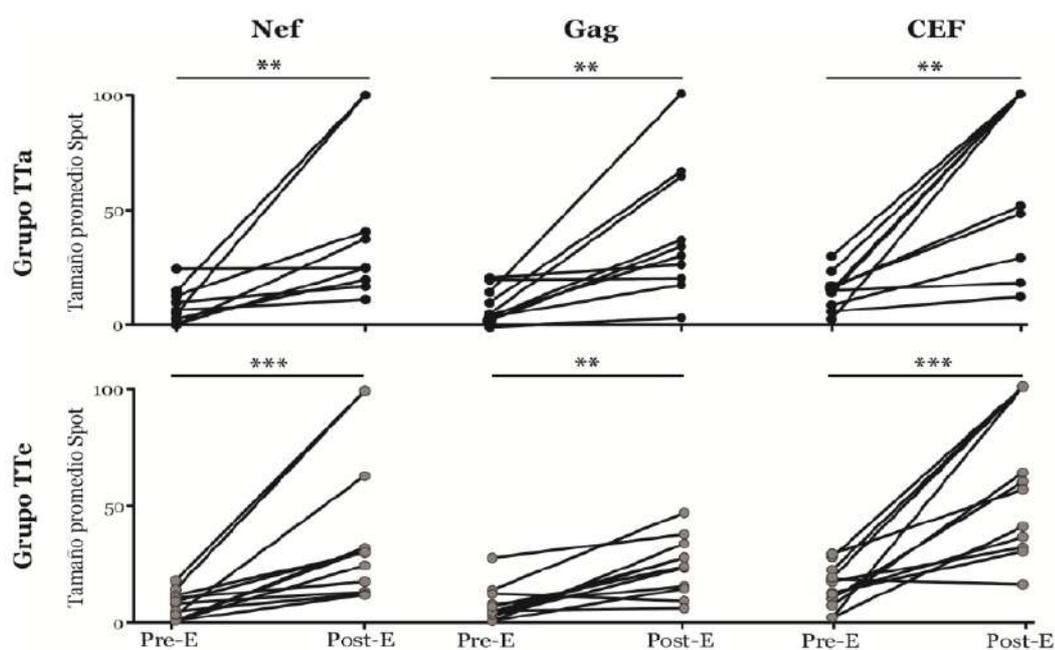


Figura 25: Análisis de la calidad de la respuesta específica por ELISPOT mediante la evaluación del tamaño promedio de los *spots* obtenidos para la respuesta anti-Nef, anti-p24 y anti-CEF, pre- y post-expansión. Los puntos negros representan al grupo TTa y los grises al grupo TTe. Los asteriscos denotan distintos valores de p : * $p<0,05$, ** $p<0,01$ y *** $p<0,005$; los cuales se calcularon utilizando la prueba de *Wilcoxon*. Pre-E=pre-expansión, Post-E=post-expansión.

En conjunto, estos resultados indican que las respuestas celulares tanto HIV-específicas como CEF-específicas pudieron ser expandidas *in vitro* y de igual manera para ambos grupos de individuos. Por otro lado, además de aumentar en número, las células mostraron una mayor capacidad de secretar IFN- γ luego de la expansión. Cabe destacar que, este parámetro fue reportado previamente como relacionado

con una mayor avidéz celular y un perfil más polifuncional [75, 138, 139]. Los sujetos del grupo T_{Ta} mostraron una respuesta anti-HIV más amplia en términos de especificidad luego de la expansión, comparado a los individuos del grupo T_{Te}, cuya respuesta anti-p17 mostró una menor capacidad de expansión.

IV. 3. ANÁLISIS DE LA POLIFUNCIONALIDAD DE LOS LT CD8⁺ HIV-ESPECÍFICOS POST-EXPANSIÓN

La polifuncionalidad de las células T se considera un parámetro importante que refleja la calidad de dicha respuesta [140]. Con el objetivo de profundizar la caracterización de los LT CD8⁺ HIV-específicos obtenidos luego de la expansión *in vitro*, se decidió analizar la funcionalidad de estas células en términos de su habilidad de degranular (evidenciada por la expresión transitoria en membrana de las moléculas CD107A y CD107B) y de secretar citoquinas (IFN- γ , IL-2 y TNF- α) y/o la quemoquina MIP-1 β , evaluada por citometría de flujo, al cabo de dos semanas post-expansión y luego de una corta re-estimulación. La estrategia utilizada para identificar las poblaciones linfocitarias y células específicas se encuentra detallada en la *Figura 15 (Ver Capítulo III.6.1)*. La metodología empleada permite evaluar células productoras de cada una de las funciones de manera individual (células monofuncionales) así como también células que expresan diferentes combinaciones: dos (bifuncionales), tres (trifuncionales), cuatro (tetrafuncionales) y cinco (pentafuncionales) funciones, simultáneamente.

Debido al limitado potencial de expansión que exhibieron las células frente al *pool* de péptidos correspondiente a la proteína p17, principalmente en el grupo T_{Te}, las células p17-específicas fueron excluidas de los análisis subsiguientes. De este punto en adelante, se analizó únicamente los LT CD8⁺ expandidos con *pools* de péptidos correspondientes a las proteínas Nef y p24, antígenos que resultaron los más potentes en nuestro sistema.

En primer lugar, se observó que, como ya fue mencionado, la población de LT CD8⁺ expandió de manera preferencial frente a la de LT CD4⁺, población que resultó muy poco representada en nuestro modelo post-expansión. Al analizar los LT CD8⁺ que expresan una única función o las diferentes combinaciones de ellas, se observó que la proporción de células respondedoras a los diferentes estímulos fue mucho mayor a lo esperado, según nuestra experiencia, comparado con el mismo análisis realizado directamente *ex vivo* (sin expansión) [75, 112, 141]. Esto es consistente con los resultados obtenidos por ELISPOT. En primer lugar se analizó el perfil polifuncional de la respuesta HIV-específica (sumando las respuestas

anti-Nef y anti-24), esto es, la capacidad de las células de producir citoquinas y/o degranular de manera individual (células monofuncionales) o en distintas combinaciones (células bi-, tri-, tetra- y pentafuncionales), donde no se observaron diferencias entre ambos grupos (*Figura 26A*). En la *Figura 26B* se muestra el gráfico de barras del análisis desglosado en las 31 posibles combinaciones de funciones, donde, como es de esperar por el resultado obtenido en el análisis de permutación, no se observan diferencias significativas.

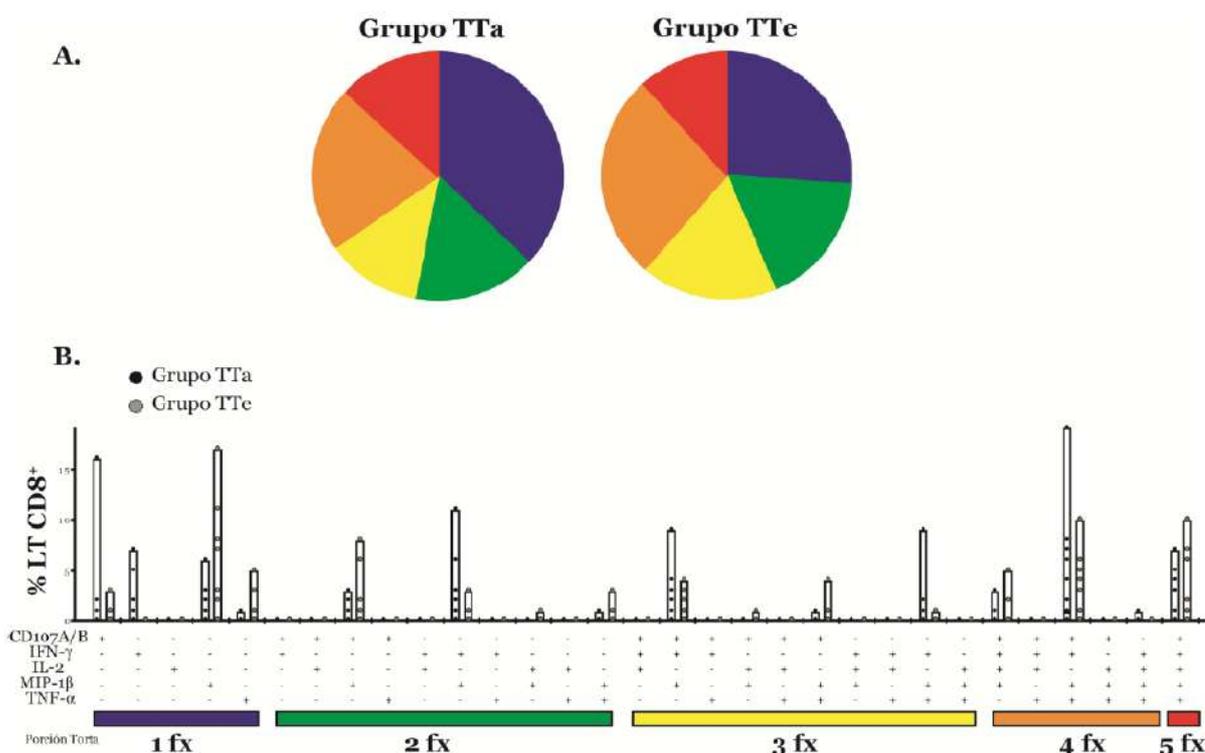


Figura 26: Perfil de polifuncionalidad de los LT CD8⁺ HIV-específicos post-expansión *in vitro* con *pools* de péptidos específicos (anti-Nef y anti-p24). **(A)** Gráficos de tortas, representan la distribución de las células monofuncionales (1 fx, azul), bifuncionales (2 fx, verde), trifuncionales (3 fx, amarillo), tetrafuncionales (4 fx, naranja) y pentafuncionales (5 fx, rojo) dentro de la población HIV-específica, para los grupos TTa y TTc. **(B)** Gráfico de barras, representa la proporción de LT CD8⁺ productores de cada función particular o combinación de funciones (resultando 31 combinaciones posibles de respuestas positivas al realizar el análisis aplicando una estrategia *booleana*). El signo “+” indica la función evaluada. Los colores que se muestran en la base del gráfico de barras reflejan aquellos representados en las tortas. Las barras se extienden de mínimo a máximo. Los puntos negros representan a los sujetos del grupo TTa y los grises a los del grupo TTc. Los análisis se realizaron con el programa *SPICE* (ver *MyM*). Cuando se analizó la distribución global (tortas) se aplicó el test de permutación y para el análisis de los gráficos de barra se usó la prueba *t* de *Student*. Para el grupo TTa se analizaron: N=11 respuestas HIV-específicas y para el grupo TTc N=12 respuestas HIV-específicas.

Luego, se realizó el mismo análisis pero subdividiendo la respuesta en los antígenos de HIV evaluados (Nef y p24) y se incluyó el análisis de la respuesta frente a péptidos de CEF (*Figura 27*). En este caso, la

proporción total de células mono-, bi-, tri-, tetra- y pentafuncionales se analizaron como un todo, independientemente de cada función en particular (análisis en bloque). Se hizo de esta manera debido al bajo número de respuestas positivas obtenido cuando se fragmentó el análisis en las 31 opciones posibles. Dentro del grupo TTa, se observó una diferencia significativa en la distribución de los bloques de células entre las células Nef y p24-específicas ($p=0,045$; *Figura 27A*), dado por un enriquecimiento de células monofuncionales dentro de los LT CD8⁺ p24-específicos ($p=0,042$, *Figura 27B*) comparado con las células Nef-específicas. Se vio una tendencia similar frente a las células CEF-específicas, aunque en este caso no fue significativa ($p=0,16$; *Figura 27A*). Cuando se analizó el perfil de polifuncionalidad dentro del grupo TTe, no se observaron diferencias entre las células Nef-, p24-, o aún, CEF-específicas. Sólo se observó una menor proporción, no significativa, de células pentafuncionales Nef-específicas y también p24-específicas respecto a las células CEF-específicas.

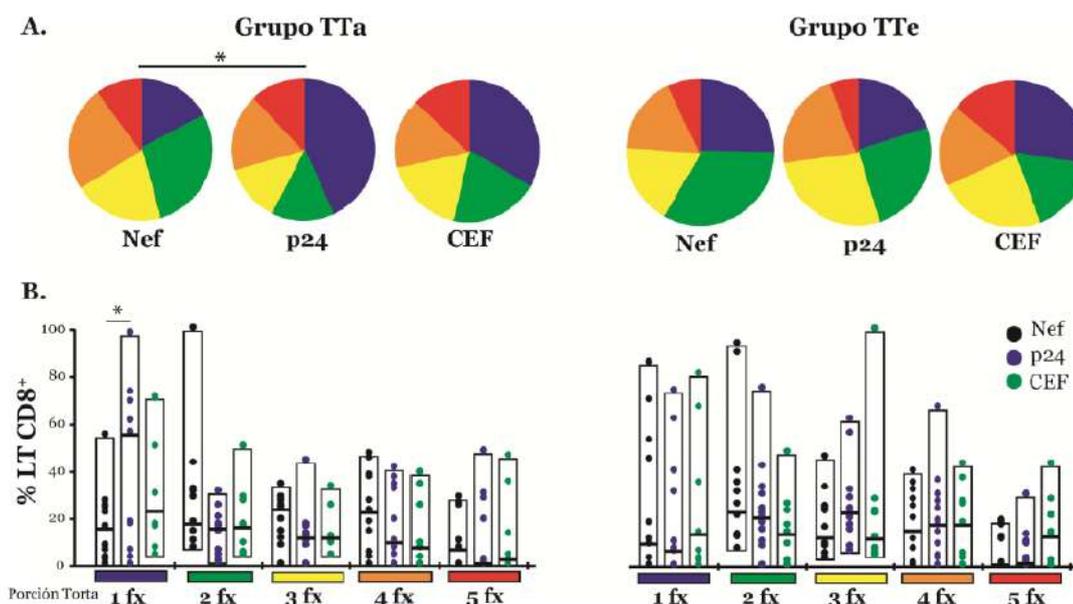


Figura 27: Perfil de polifuncionalidad de los LT CD8⁺ con diferente especificidad antigénica (Nef, p24 o CEF), dentro del grupo TTa (panel izquierdo) y TTe (panel derecho). **(A)** Gráficos de torta, representan la distribución de las células monofuncionales (1 fx, azul), bifuncionales (2 fx, verde), trifuncionales (3 fx, amarillo), tetrafuncionales (4 fx, naranja) y pentafuncionales (5 fx, rojo) para el grupo TTa y TTe. **(B)** Gráficos de barras. Para realizar este análisis se consideró la proporción de células capaces de mediar una, dos, tres, cuatro o cinco funciones simultáneamente, independientemente de cada función particular o combinación de funciones (análisis en bloque). Los análisis se realizaron con el programa *SPICE* (ver *MyM*). Cuando se analizó la distribución global (tortas) se aplicó el test de permutación y para el análisis de los gráficos de barra se usó la prueba *t* de *Student*. El asterisco denota $p: * p < 0,05$. Para el grupo TTa se analizaron: N=11 respuestas específicas anti-Nef y anti-p24, N=8 respuestas específicas anti-CEF. Para el grupo TTe se analizaron: N=12 respuestas específicas anti-Nef y anti-p24, N=9 respuestas específicas anti-CEF.

En conjunto, los LT CD8⁺ HIV-específicos expandidos *in vitro* mostraron una respuesta polifuncional con un perfil diverso de funciones que incluyó una gran proporción de células tetra- y pentafuncionales, y que

fue incluso comparable al obtenido para las células CEF-específicas. A pesar de la diferencia en el momento de inicio del tratamiento, no se observaron diferencias en el perfil polifuncional de las células expandidas entre ambos grupos de estudio.

IV. 4. ANÁLISIS DEL FENOTIPO DE MEMORIA EN LOS LT CD8⁺ POST-EXPANSIÓN

Luego, se estudió si diferencias en el momento de inicio del tratamiento (y por lo tanto, en el tiempo de estimulación antigénica) entre los dos grupos estudiados en este trabajo impactarían en la distribución del fenotipo de memoria de los LT CD8⁺, luego de la expansión. Para ello, se realizó un análisis inmunofenotípico de las células T CD8⁺ por citometría de flujo valiéndonos de tres marcadores (CD45RO, CCR7 y CD95), lo que nos permitió definir cinco sub-poblaciones (*Figura 15 y Capítulo III.6.1*): células *Naïve* (T_N CCR7⁺CD45RO⁻CD95⁻), células *stem cell* de memoria (T_{SCM} CCR7⁺CD45RO⁻CD95⁺), células de memoria central (T_{MC} CCR7⁻CD45RO⁺CD95⁺), células de memoria efectora (T_{ME}, CCR7⁻CD45RO⁻CD95⁺) y células efectoras terminales (T_{ET} CCR7⁻CD45RO⁻CD95⁺). La distribución de estas subpoblaciones se analizó tanto en el total de la población de LT CD8⁺ como en las células HIV-específicas. Estas últimas se identificaron por su capacidad de degranular (expresión de CD107A/B) y/o de secretar citoquinas (IFN- γ , IL-2 y TNF- α) y/o la quemoquina MIP-1 β , luego de la re-estimulación con el correspondiente *pool* de péptidos. Todas las moléculas utilizadas para seleccionar las células T CD8⁺ HIV-específicas (CD107A/B, IFN- γ , IL-2, MIP-1 β y TNF- α) fueron identificadas utilizando anticuerpos conjugados al mismo fluorocromo (FITC) con el objetivo de poder detectar las células respondedoras luego de la estimulación, independientemente de su función particular. Además, el perfil de diferenciación de memoria se estudió en aquellas células CD8⁺ que expresaron la molécula PD-1.

IV. 4. 1. Distribución de las subpoblaciones de memoria en la población de LT CD8⁺ totales post-expansión

Como se esperaba, la distribución de las distintas subpoblaciones de memoria en el compartimento T CD8⁺ total estuvo considerablemente diferenciada hacia un fenotipo efector post-expansión (*Figura 28*). Dentro de este compartimento, se encontró la siguiente jerarquía en ambos grupos de estudio: T_{ET}>T_{ME}>T_{SCM}>T_{MC}>T_N. Si bien esta jerarquía fue idéntica en ambos grupos, se encontraron diferencias en las proporciones de las diferentes subpoblaciones, resultando en distribuciones significativamente diferentes ($p=0,0051$; *Figura 28A*): los individuos TTe mostraron mayores proporciones de LT_{SCM} CD8⁺ (mediana 11,93% *versus* 4,21%; $p=0,003$) y LT_{MC} CD8⁺ (mediana 1,90% *versus* 1,00%; $p=0,016$), y

menores proporciones de $LT_{ET} CD8^+$ (mediana 44,35% versus 73,70%; $p=0,003$). El porcentaje de células $T_N CD8^+$ fue mínimo en ambos grupos (0,22% y 0,64% en los grupos de TTa y TTe, respectivamente, *Figura 28B*).

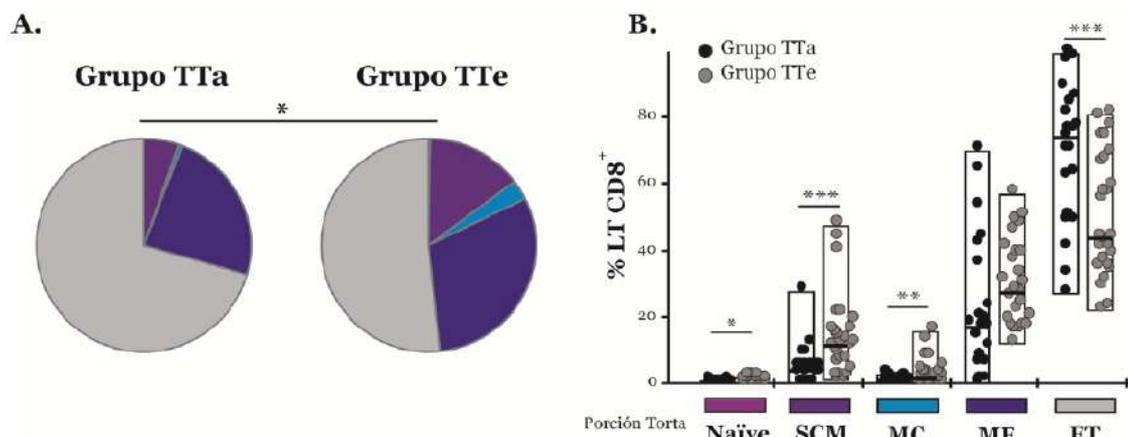


Figura 28: Distribución de las subpoblaciones de memoria en los $LT CD8^+$ totales post-expansión a partir de muestras de individuos TTa y TTe. **(A)** Gráficos de torta para cada grupo estudiado. **(B)** Gráfico de barras mostrando el porcentaje de las distintas subpoblaciones dentro del compartimento $CD8^+$ total. Los colores en la base se corresponden con aquellos mostrados en las tortas. Las cajas se extienden desde el valor mínimo al máximo y las líneas horizontales dentro de las cajas muestran el valor de la mediana. Los puntos negros representan a los individuos del grupo TTa y los grises a los TTe. El análisis se realizó con el programa *SPICE*. Cuando se analizó la distribución global (tortas) se aplicó el test de permutación y para el análisis de los gráficos de barra se usó la prueba *t* de Student. Los asteriscos denotan distintos valores de p : *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,005$. SCM: *stem cell* de memoria; MC: memoria central; ME: memoria efectora, ET: efectoras terminales. Grupo TTa: $N=11$ individuos, 22 respuestas totales analizadas; Grupo TTe: $N=13$ individuos, 26 respuestas totales analizadas.

IV. 4. 2. Distribución de las subpoblaciones de memoria en la población de $LT CD8^+$ HIV-específicos post-expansión

Luego, se analizó la distribución de las subpoblaciones de memoria en las células HIV-específicas. En el grupo TTa, las células Nef- y p24-específicas mostraron, casi exclusivamente, un fenotipo LT_{ME} y T_{ET} . Contrariamente, los individuos del grupo TTe mostraron mayores proporciones de las subpoblaciones T_{SCM} y T_{MC} dentro del compartimento HIV-específico (*Figura 29A y B*). Este mismo patrón se mantuvo para las respuestas CEF-específicas, en ambos grupos. Si bien se observaron estas tendencias, las diferencias observadas no fueron estadísticamente significativas, probablemente debido al reducido número de respuestas positivas al analizar los antígenos por separado.

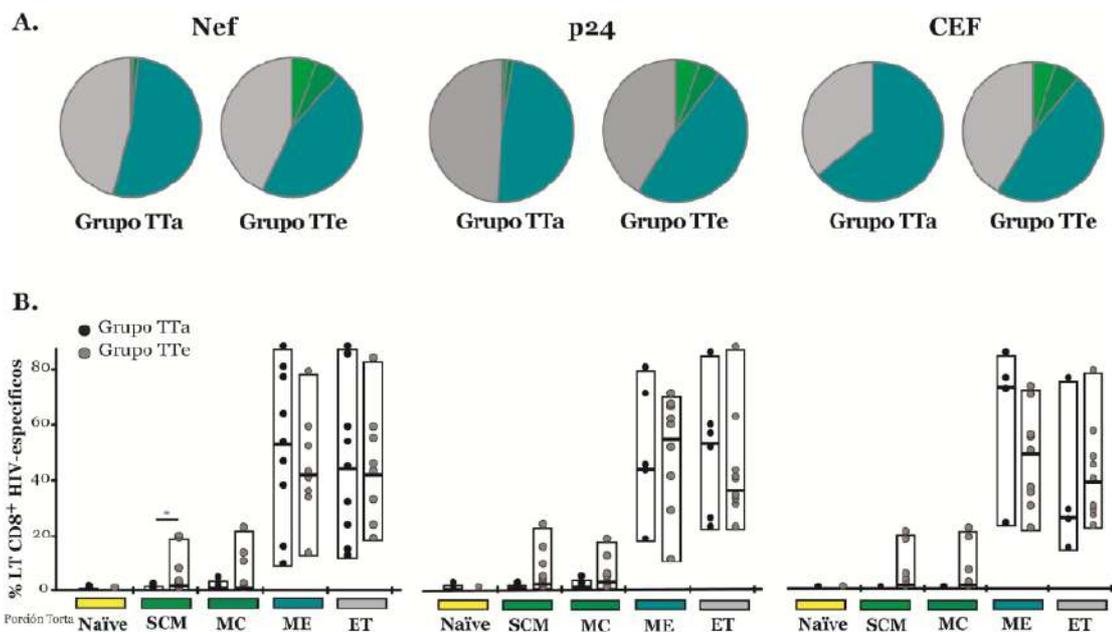


Figura 29: Distribución de las subpoblaciones de memoria en los LT CD8⁺ Nef-, p24- y CEF-específicos, identificados en base a la producción de citoquinas y/o capacidad de degranulación. **(A)** Gráficos de torta para cada grupo estudiado. **(B)** Gráficos de barras mostrando el porcentaje de las distintas subpoblaciones dentro del compartimento de LT CD8⁺ HIV-específicos. Los colores en la base se corresponden con aquellos mostrados en las tortas. Las cajas se extienden desde el valor mínimo al máximo y las líneas horizontales dentro de las cajas muestran el valor de la mediana. Los puntos negros representan a los individuos del grupo TTA y los grises a los TTe. El análisis se realizó con el programa *SPICE*. Cuando se analizó la distribución global (tortas) se aplicó el test de permutación y para el análisis de los gráficos de barra se usó la prueba *t* de *Student*. El asterisco denota un valor de *p*: * *p*<0,05. SCM: *stem cell* de memoria; MC: memoria central; ME: memoria efectora, ET: efectoras terminales. Grupo TTA: N= 10 respuestas específicas anti-Nef; N= 8 respuestas específicas anti-p24 y N= 5 respuestas específicas anti-CEF. Grupo TTe: N= 12 respuestas específicas anti-Nef y 12 anti-p24, y N= 10 respuestas específicas anti-CEF.

IV. 4. 3. Análisis de la expresión del marcador de muerte celular programada PD-1 y distribución de las subpoblaciones de memoria en la población de LT CD8⁺PD-1⁺ post-expansión

Con el objetivo de profundizar el análisis del fenotipo de los LT CD8⁺ obtenidos post-expansión se analizó, tanto en la población de LT CD8⁺ totales como HIV-específicos, la expresión de PD-1, una molécula comúnmente asociada al agotamiento funcional de las células T. La mediana de células que expresaron PD-1 en la población de LT CD8⁺ totales fue, para el grupo TTA 4,18% (IQ25-75: 0,12%-9,53%) y para el grupo TTe 5,83% (IQ25-75: 3,01%-10,68%; *Figura 30*). Dentro de la población de LT CD8⁺ HIV-específicos, se obtuvieron los siguientes valores: para el grupo TTA la mediana fue 5,80% (IQ25-75: 1,28%-17,45%) y para el grupo TTe fue 7,67% (IQ25-75: 1,85%-23,80%). Los valores obtenidos

fueron significativamente menores que aquellos reportados en otros estudios (incluyendo trabajos previos de nuestro grupo) realizados en poblaciones similares, pero determinados directamente *ex vivo* [112, 114, 142, 143]. Esto podría ser consecuencia de la desaparición (muerte) de las células PD-1⁺ o de una modulación negativa de esta molécula en la superficie de las células durante la expansión *in vitro*. No se observaron diferencias significativas en la expresión de PD-1 entre los grupos TTa y TTe, ya sea en el compartimento T CD8⁺ total (grupo TTa mediana 5,57% [IQ25-75: 1,75%-9,72%] y grupo TTe mediana 5,80% [IQ25-75: 4,00%-11,53%]) como en el compartimento HIV-específico (grupo TTa mediana 14,20% [IQ25-75: 4,13%-19,55%] y grupo TTe mediana 11,00 % [IQ25-75: 4,49%-26,60%]; *Figura 30*). En cambio, la expresión de PD-1 en las células HIV-específicas fue significativamente mayor comparado con la expresión de PD-1 en el compartimento de LT CD8⁺ totales, tanto dentro del grupo TTa ($p=0,0268$) como dentro del grupo TTe ($p<0,0001$). Esto coincide con observaciones previas en otros escenarios [112, 144, 145] donde se demostró la mayor expresión del marcador de agotamiento PD-1 en aquellas células específicas para el virus.

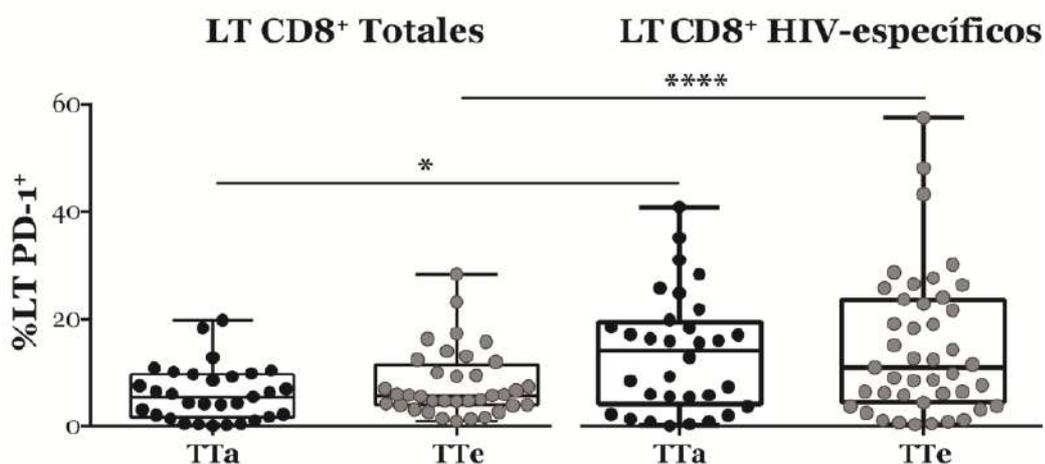


Figura 30: Expresión de PD-1 en LT CD8⁺ totales y HIV-específicos post-expansión en la muestra post-cART de individuos TTa y TTe. Las cajas se extienden desde el valor mínimo al máximo y las líneas horizontales dentro de las cajas representan la mediana. Los puntos negros representan al grupo TTa y los grises al grupo TTe. Los asteriscos denotan valores de p : * $p \leq 0,05$ y **** $p \leq 0,0001$, obtenidos con la prueba de Wilcoxon.

Luego, se evaluó la distribución del fenotipo de memoria dentro de las células que expresaron el marcador PD-1, en el compartimento de LT CD8⁺ totales (*Figura 31*). Este análisis no se llevó a cabo en el

compartimento de LT CD8⁺ HIV-específicos debido al bajo número de eventos resultante al seleccionar dicha población. La distribución global de las subpoblaciones resultó significativamente diferente entre los grupos ($p=0,0339$; *Figura 31A*), ya que los individuos del grupo TTa mostraron una mayor representación de LT_{ET} CD8⁺ dentro de los eventos PD-1⁺ comparado con los sujetos del grupo TTe ($p=0,026$) quienes, en cambio, mostraron mayores proporciones de células T_{SCM} y T_{MC} ($p=0,023$ y $p=0,013$, respectivamente; *Figura 31B*).

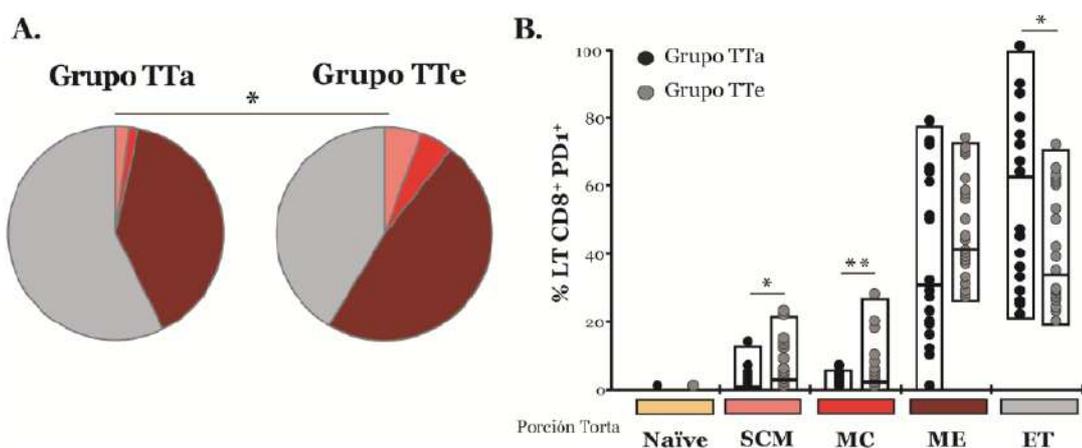


Figura 31: Distribución de las subpoblaciones de memoria en los LT CD8⁺PD-1⁺ totales analizada post-expansión, en los individuos TTa y TTe. **(A)** Gráficos de torta para cada grupo estudiado. **(B)** Gráfico de barras mostrando el porcentaje de las distintas subpoblaciones dentro del compartimento de LT CD8⁺PD-1⁺. Los colores en la base se corresponden con aquellos mostrados en las tortas. Las cajas se extienden del valor mínimo al máximo y las líneas horizontales dentro de las cajas muestran el valor de la mediana. Los puntos negros representan a los individuos del grupo TTa y los de color gris a los TTe. El análisis se realizó con el programa *SPICE*. Cuando se analizó la distribución global (tortas) se aplicó el test de permutación y para el análisis de los gráficos de barra se usó la prueba *t* de Student. Los asteriscos denotan distintos valores de p : *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$. SCM: *stem cell* de memoria; MC: memoria central; ME: memoria efectora, ET: efectoras terminales. TTa: N= 11 individuos, 21 respuestas totales analizadas; TTe: N=13 individuos, 26 respuestas totales analizadas.

Seguidamente, se realizó el análisis complementario, es decir, se estudió la expresión de PD-1 en las diferentes subpoblaciones de memoria en el compartimento T CD8⁺ total. Debido al reducido número de eventos en las subpoblaciones de linfocitos T_N, T_{SCM} y T_{MC}, este análisis solo pudo llevarse a cabo en las subpoblaciones T_{ME} y T_{ET}. Tanto en el grupo TTa como TTe, la expresión de PD-1 fue significativamente mayor en el compartimento de células T_{ME} (grupo TTa mediana 9,20% [IQ25-75: 2,50%-17,10%] y grupo TTe mediana 9,54% [IQ25-75: 4,96%-18,88%]) comparado a las células T_{ET} (grupo TTa mediana 4,60%

[IQ25-75: 1,76%-9,12%], $p < 0,0001$; y grupo TTe mediana 4,93% [IQ25-75: 3,18%-8,82%], $p < 0,0001$; *Figura 32*).

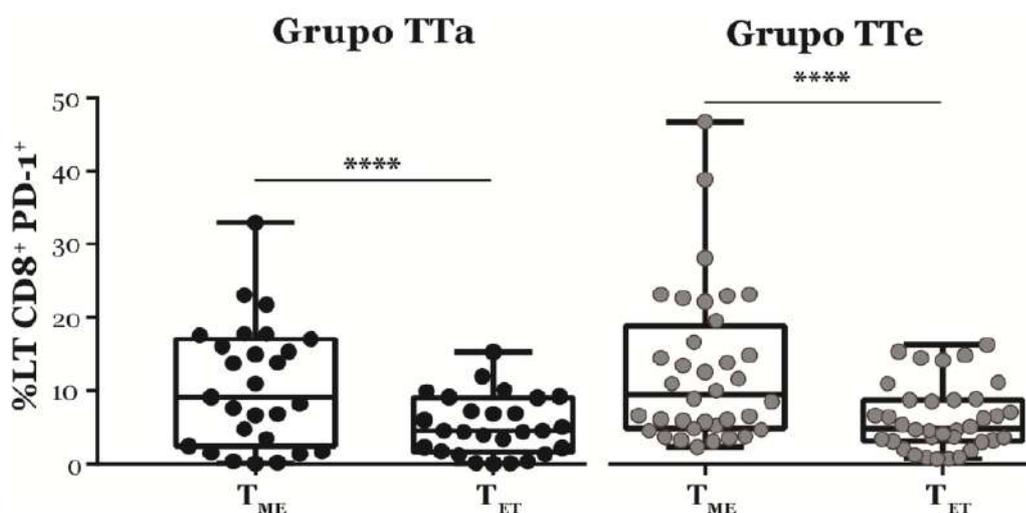


Figura 32: Proporción de células PD-1⁺ observadas post-expansión en las subpoblaciones de memoria T_{ME} y T_{ET}, dentro del compartimento T CD8⁺ total, en individuos del grupo TTa y TTe. Las cajas se extienden del mínimo al máximo y las líneas horizontales representan la mediana. El análisis se realizó con la prueba de *Wilcoxon* y los asteriscos denotan valores de p : **** $p \leq 0,0001$. ME: memoria efectora y ET: efectoras terminales.

Por otro lado, en ambos grupos, las células T_{ME} (grupo TTa mediana 20,21% [IQ25-75: 3,71%-36,10%] y grupo TTe mediana 16,48% [IQ25-75: 3,19%-36,13%]) mostraron una proporción significativamente mayor de células respondedoras a la re-estimulación (es decir, capaces de degranular y/o producir citoquinas) comparado a las células T_{ET} (grupo TTa mediana 2,60% [IQ25-75: 0,74%-9,90%], $p < 0,0001$; y grupo TTe mediana 3,80% [IQ25-75: 1,29%-17,87%], $p < 0,0001$; *Figura 33*), sugiriendo que la molécula PD-1 actuaría como un reóstato más que como únicamente un simple marcador de agotamiento celular.

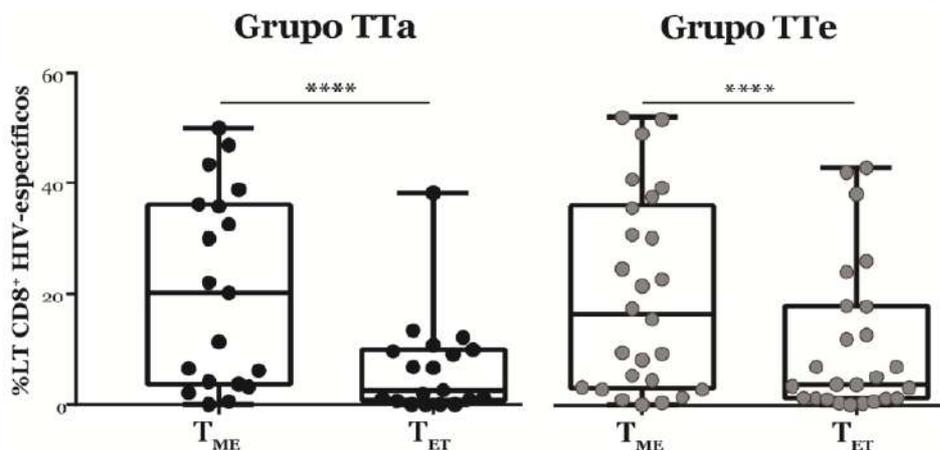


Figura 33: Proporción de LT CD8⁺ HIV-específicos (Nef o p24-específicos), identificados en base a la producción de citoquinas y/o capacidad de degranular, observados post-expansión en las subpoblaciones de memoria total T_{ME} y T_{ET}, en individuos del grupo TTA y TTe. Las cajas se extienden del mínimo al máximo y las líneas horizontales representan la mediana. El análisis se realizó con la prueba de Wilcoxon y los asteriscos denotan valores de p : **** $p \leq 0,0001$. ME: memoria efectora y ET: efectoras terminales.

En resumen, los resultados observados indican que los individuos TTe mostraron una preservación de células con fenotipo de diferenciación temprana (T_{SCM} y T_{MC}), tanto en el compartimento de LT CD8⁺ totales como HIV-específicos. Además, esto se vio reflejado como una mayor proporción de células T_{SCM} y T_{MC} dentro del compartimento de LT CD8⁺ PD-1⁺. En cambio, los individuos del grupo TTA mostraron un perfil más diferenciado, con una mayor representación de células con fenotipo efector (T_{ME} y T_{ET}) en todos los compartimentos evaluados (CD8⁺ total, CD8⁺ HIV-específico y CD8⁺PD-1⁺). En ambos grupos, la expresión de PD-1 estuvo concentrada en los LT_{ME} CD8⁺ HIV-específicos, los cuales también fueron capaces de degranular y secretar citoquinas en mayor proporción.

IV. 5. ANÁLISIS DE LA CAPACIDAD DE MEDIAR ACTIVIDAD ANTIVIRAL DE LOS LT CD8⁺ HIV-ESPECÍFICOS POST-EXPANSIÓN

El objetivo último de las estrategias de cura para la infección por HIV es lograr el control de la replicación viral y la eliminación de las células infectadas. Por ello, nos propusimos evaluar la capacidad de los LT CD8⁺ HIV-específicos, generados mediante este modelo de expansión *in vitro*, de ejercer actividad antiviral. Para lograr una caracterización más profunda y determinar la capacidad de mediar actividad antiviral tanto por mecanismos citolíticos como no citolíticos, se decidió implementar dos ensayos diferentes en paralelo (Figura 17 y 18, Capítulo III.7). Por un lado, se implementó el ensayo de VIA (Viral

Inhibition Assay) [127], el cual es un reflejo de la potencia antiviral total de las células expandidas, ya que evalúa simultáneamente ambos tipos de mecanismos (citolíticos y no citolíticos). Mediante este ensayo se puso en evidencia la capacidad de los LT CD8⁺ expandidos de suprimir *in vitro* la replicación viral en LT CD4⁺ autólogos infectados con diferentes cepas virales: una cepa de laboratorio (NL4-3) o tres cepas de aislamientos primarios *T/F (Transmitted/founder)* (V4, V8 y V9). Simultáneamente, se realizó el ensayo VITAL, el cual es un reflejo de la capacidad de los LT CD8⁺ de mediar exclusivamente citotoxicidad directa, es decir mecanismos citolíticos. Para ambos ensayos, se obtuvieron LT CD8⁺ expandidos con *pooles* de péptidos correspondientes a las proteínas Nef y p24 con el protocolo de expansión ya expuesto (es decir, LT CD8⁺ expandidos Nef- y p24-específicos), los cuales actuaron como células efectoras. La principal diferencia metodológica entre los ensayos estuvo dada por las células *target* o blanco que se emplearon. Para el ensayo VIA se emplearon LT CD4⁺ autólogos purificados, los cuales fueron infectados (como se detalló en el *Capítulo III.7.1.2*) y cultivados tanto solos como en combinación con la población de LT CD8⁺ Nef y p24-específicos efectoras (relación *target*:efectoras 1:1). Al cabo de 7 días se evaluó la inhibición de la replicación viral mediante la determinación del antígeno p24 en sobrenadante de los cocultivos por ELISA. Para el ensayo VITAL se emplearon LT CD4⁺ autólogos, purificados, cargados con *pooles* de péptidos correspondientes a las proteínas Nef o p24 y teñidos de manera diferencial (CFSE⁺) para poder distinguirlos de aquellos LT CD4⁺ no cargados (PKH-26⁺) (como se detalló en el *Capítulo III.7.2*). Luego, se realizó el cultivo en las diferentes condiciones (tanto LT CD4⁺ cargados y no cargados de péptidos solos como en combinación con células efectoras Nef- o p24-específicas). El resultado se reveló al día siguiente mediante citometría de flujo. De esta manera, se logró proporcionar un panorama más completo de la actividad antiviral mediada por las células expandidas *in vitro*.

IV. 5. 1. Capacidad de los LT CD8⁺ HIV-específicos expandidos de inhibir la replicación viral *in vitro* (VIA) en los grupos TTA y TTe

Como se explicó anteriormente, el ensayo de VIA permite evaluar la actividad antiviral global de las células expandidas. Con el objetivo de incorporar al estudio cepas virales que se asemejaran a las encontradas en individuos infectados, además de utilizar una cepa viral de laboratorio, se generaron y emplearon virus transmitidos/fundadores o *T/F (Transmitted/Founders)*, es decir virus obtenidos a partir de aislamientos primarios de infecciones recientes a través de la vía sexual. Los plásmidos codificantes para estos aislamientos fueron obtenidos a través del *NIH*, amplificados en nuestro laboratorio y utilizados para generar los *stocks* virales en líneas celulares eucariotas. En una instancia

siguiente, se determinó la capacidad que tenían los virus obtenidos de infectar LT CD4⁺ purificados a partir de muestras de individuos crónicamente infectados (no incluidos en este trabajo) y, posteriormente la factibilidad de utilizarlos en el ensayo de VIA. A continuación, se ilustra como ejemplo el resultado obtenido en un sujeto representativo durante la puesta a punto del ensayo. En este caso, PBMCs fueron expandidas con *pools* de péptidos correspondientes a Nef o p24 para generar las células efectoras Nef- y p24-específicas efectoras. Luego de 14 días, los LT CD8⁺ fueron purificados y co-cultivados con LT CD4⁺ autólogos purificados, activados e infectados con los tres *stocks* de virus generados, V4, V8 y V9, en paralelo. El sobrenadante del co-cultivo de cada condición se recolectó al día 4 y 7 post-infección, para así determinar el momento ideal para revelar del ensayo (Figura 34). De esta forma, se confirmó que los virus obtenidos estaban en óptimas condiciones para ser empleados en el ensayo de VIA, que el co-cultivo con células específicas expandidas fehacientemente inhibía la replicación viral (disminución de la concentración del antígeno p24 en sobrenadante) y que el sobrenadante debía colectarse al día siete para realizar una correcta interpretación del experimento. Una vez finalizada la puesta a punto del ensayo, se procedió a la evaluación en las muestras de los grupos de estudio.

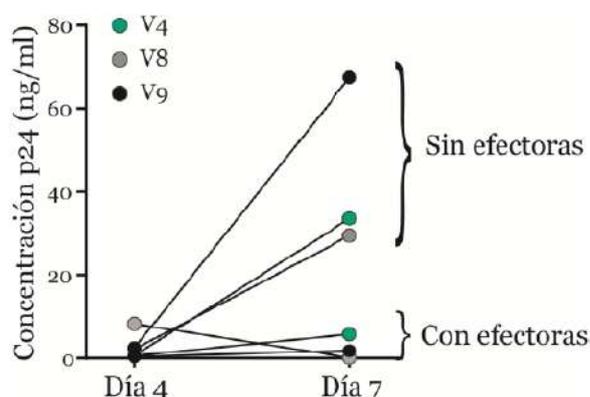


Figura 34: Concentración del antígeno p24 (ng/ml) en sobrenadante del cultivo de células *target* (LT CD4⁺ purificados e infectados con los diferentes virus evaluados) y células efectoras (LT CD8⁺ autólogos expandidos con *pools* de péptidos correspondientes a Nef o p24), determinado a los días 4 y 7 post-infección. Se muestran los resultados obtenidos en un sujeto representativo durante la puesta a punto del ensayo. Las condiciones fueron: LT CD4⁺ infectados con los virus 4 (verde), 8 (gris) y 9 (negro) y sin efectoras; y LT CD4⁺ infectados con los diferentes virus y co-cultivados con efectoras Nef-específicas en este ejemplo (con células efectoras p24-específicas se obtuvo un resultado similar).

Tanto para las células expandidas con péptidos correspondientes a Nef como a p24 se observó una gran capacidad de mediar actividad antiviral en ambos grupos de individuos, y frente a todos los virus

ensayados (Figura 35). No se observaron diferencias al analizar la capacidad de mediar VIA frente a las cuatro cepas virales ensayadas, por lo tanto, los datos fueron agrupados para los análisis subsiguientes. Los resultados obtenidos para el grupo TTa fueron los siguientes: para la condición con el agregado de células efectoras Nef-específicas la mediana del \log_{10} de la reducción de p24 (VIA \log_{10}) fue 1,108 (IQ25-75: 0,666-2,116) y para las células p24-específicas 1,111 (IQ25-75: 0,699-1,329). En el grupo TTe la mediana del VIA \log_{10} fue 0,738 (IQ25-75: 0,378-1,047) para la condición con el agregado de efectoras Nef-específicas y 0,539 (IQ25-75: 0,286-1,030) para las células p24-específicas. En el caso de los LT CD8⁺ Nef-específicos, no se observaron diferencias entre los grupos en su capacidad de mediar VIA, aunque los individuos del grupo TTa mostraron una tendencia hacia una mayor capacidad antiviral ($p=0,0616$) (Figura 35). Por el contrario, los LT CD8⁺ p24-específicos de los individuos TTa mostraron una actividad antiviral de mayor magnitud ($p=0,005$) cuando se comparó con los LT CD8⁺ p24-específicos de los individuos TTe. No se observaron diferencias intragrupo al analizar la respuesta antiviral de los LT CD8⁺ Nef y p24-específicos.

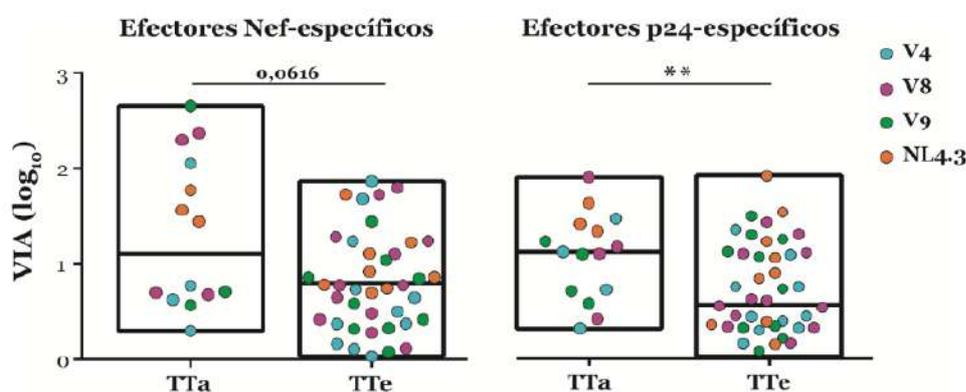


Figura 35: Ensayo de inhibición viral *in vitro* (VIA) mediado por los LT CD8⁺ Nef-específicos (panel izquierdo) y p24-específicos (panel derecho). La magnitud del ensayo de VIA se expresa como el \log_{10} de la proporción de antígeno p24 perdido cuando los LT CD8⁺ se encontraban presentes en el cultivo, comparado con el cultivo de LT CD4⁺ infectados y sin efectoras. Cada punto representa un individuo y las cepas virales usadas en el experimento se muestran cada una en un color diferente. En todos los gráficos: las líneas horizontales dentro de las cajas muestran el valor de la mediana y las cajas se extienden del mínimo al máximo. Los análisis intergrupo e intragrupo se realizaron con los test *Mann-Whitney* y *Wilcoxon* respectivamente. El asterisco denota valor de p : **, $p \leq 0,005$. TTa: N=4 individuos, 14 respuestas evaluadas para Nef y 15 para p24. TTe: N=12 individuos, 40 respuestas evaluadas para Nef y 41 para p24.

En conjunto, los LT CD8⁺ HIV-específicos, obtenidos post-expansión, tanto en los individuos TTa como TTe, fueron capaces de suprimir la replicación viral en LT CD4⁺ autólogos, frente a todos los virus

evaluados. Existe una tendencia que indica que los individuos que iniciaron el tratamiento tardíamente poseen una mayor habilidad para mediar VIA *in vitro* frente a las cepas virales evaluadas en este sistema.

IV. 5. 2. Capacidad de los LT CD8⁺ HIV-específicos expandidos de mediar actividad citotóxica directa *in vitro* (VITAL) en los grupos TTA y TTe

En paralelo, se realizó el ensayo VITAL, el cual es un reflejo de la capacidad de las células efectoras de mediar citotoxicidad directa. En la *Figura 36* se muestra un citograma obtenido en un ensayo representativo donde se observa la pérdida específica y progresiva de LT CD4⁺ CFSE⁺ (cargados de antígeno) a medida que se incrementa la proporción de LT CD8⁺ efectores expandidos (relación T:E 1:1, 1:1 ajustado [ajustado a la proporción de LT CD8⁺ HIV-específicos efectores determinado por marcado intracelular y citometría de flujo], 1:5 y 1:10).

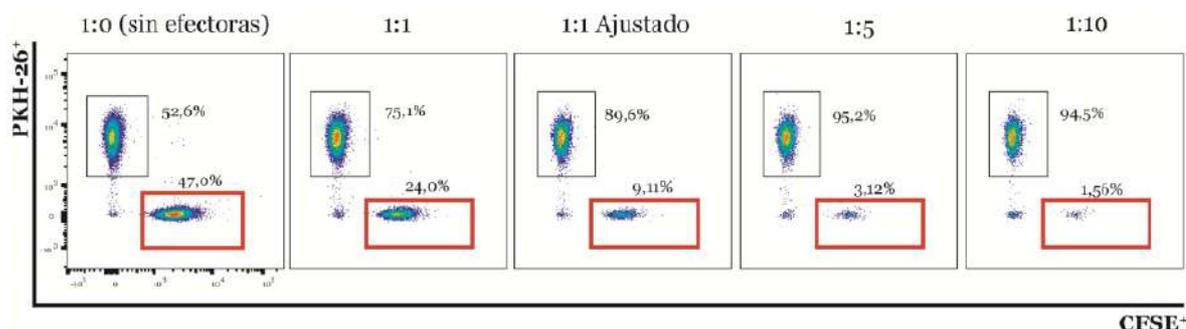


Figura 36: Citogramas obtenidos de un ensayo VITAL representativo. En la relación T:E 1:0, es decir sin efectoras, (primer panel desde la izquierda) se observa un porcentaje similar de LT CD4⁺ *target* cargados de péptido (CFSE⁺PKH26⁺) y LT CD4⁺ *target* no cargados (CFSE⁺PKH26⁻). A medida que se avanza de izquierda a derecha en los citogramas, y la relación T:E se incrementa (1:1, 1:1 ajustado, 1:5 y 1:10) se observa una pérdida progresiva específica de LT CD4⁺ *target* cargados con péptidos (recuadro rojo).

Los resultados obtenidos para el grupo TTA fueron los siguientes: para la condición con el agregado de efectoras Nef-específicas, la mediana del porcentaje de lisis para la relación 1:1 fue 23,53% (IQ25-75: 9,67%-38,98%), para la relación 1:5 fue 61,45% (IQ25-75: 32,40%-85,11%), para la relación 1:10 fue 83,85% (IQ25-75: 54,72%-99,38%) y para la relación 1:1 ajustado fue 70,53% (IQ25-75: 32,33%-92,97%). Dentro de este mismo grupo, para las condiciones con el agregado de LT CD8⁺ p24-específicos, la mediana del %lisis específica fue: 16,47% para la relación 1:1 (IQ25-75: 2,84%-32,64%), 9,25% para la

relación 1:5 (IQ25-75: 6,53%-58,37%), 51,54% para la relación 1:10 (IQ25-75: 5,95%-97,13%) y 60,24% para la relación 1:1 ajustado (IQ25-75: 16,21%-87,09%) (Figura 37, puntos negros, Grupo TTa).

Dentro del grupo TTe, para la condición con el agregado de LT CD8⁺ Nef-específicos, la mediana para la relación 1:1 fue 17,03% (IQ25-75: 3,39%-47,74%), para la relación 1:5 fue 42,77% (IQ25-75: 15,87%-84,73%), para la relación 1:10 fue 61,44% (IQ25-75: 22,47%-91,27%) y para la relación 1:1 ajustado fue 68,35% (IQ25-75: 21,22%-83,54%). En el caso del agregado de LT CD8⁺ p24-específicos, la mediana fue 6,91% para la relación 1:1 (IQ25-75: 3,45%-11,57%), 20,04% para la relación 1:5 (IQ25-75: 7,23%-40,90%), 12,84% para la relación 1:10 (IQ25-75: 7,20%-55,13%) y 26,13% para la relación 1:1 ajustado (IQ25-75: 6,69%-49,74%) (Figura 37, puntos grises, Grupo TTe).

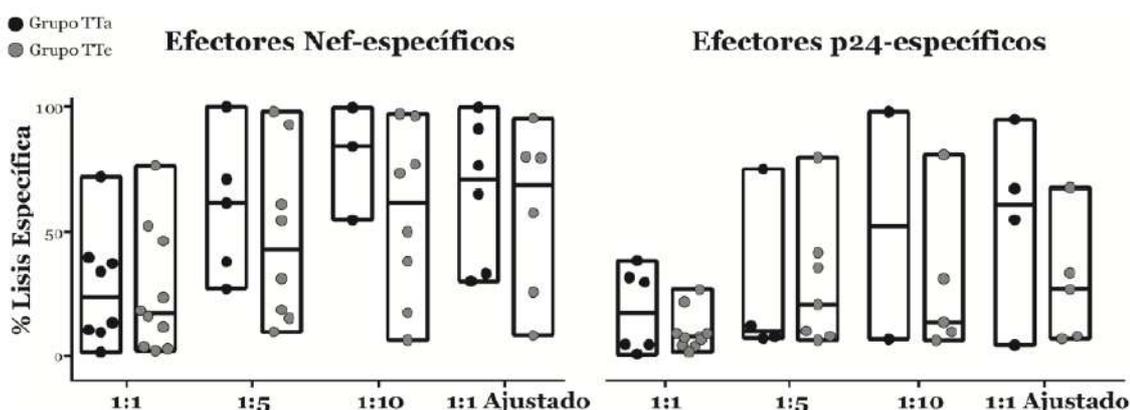


Figura 37: Porcentaje de lisis específica mediado por los LT CD8⁺ Nef-específicos (panel izquierdo) y p24-específicos (panel derecho), determinado por el ensayo VITAL. Los resultados para los sujetos TTa y TTe se muestran a las diferentes relaciones T:E. Los puntos negros representan al grupo TTa y los grises al TTe. Las cajas se extienden del mínimo al máximo y las líneas horizontales dentro de las cajas representan los valores de mediana. Los análisis intergrupo e intragrupo se realizaron con los test *Mann-Whitney* y *Wilcoxon*, respectivamente. TTa: N=7 individuos para las respuestas Nef-específicas y N= 6 individuos para las respuestas p24-específicas. TTe: N=10 individuos para ambas respuestas Nef- y p24-específicas.

No se observaron diferencias significativas entre los individuos TTa y TTe, en ninguna relación T:E, en cuanto a su capacidad de mediar citólisis de LT CD4⁺ cargados con los péptidos correspondientes, independientemente de la especificidad de los LT CD8⁺ evaluados (Figura 37). Al realizar el análisis de la respuesta intragrupo, es decir al comparar las respuestas de LT CD8⁺ Nef- o p24-específicos dentro de cada grupo particular, no se encontraron diferencias (*Wilcoxon* $p > 0,05$). Sólo se observó que los LT CD8⁺

Nef-específicos mostraron una tendencia a mediar citotoxicidad directa con mayor potencia al compararse a los LT CD8⁺ p24-específicos, en ambos grupos.

En resumen, los LT CD8⁺ HIV-específicos expandidos de ambos grupos de estudio fueron capaces de mediar actividad citotóxica directa, y se observó una tendencia de las células Nef-específicas a ejercer una mayor citotoxicidad.

IV. 6. RELACIÓN ENTRE LA POLIFUNCIONALIDAD Y LA DISTRIBUCIÓN DE LAS SUBPOBLACIONES DE MEMORIA EN LA POBLACIÓN T CD8⁺ CON LA CAPACIDAD DE MEDIAR ACTIVIDAD ANTIVIRAL POST-EXPANSIÓN

Luego se investigó la relación existente entre la funcionalidad (en términos de producción de citoquinas y/o capacidad de degranulación) y el fenotipo de los LT CD8⁺ obtenidos post-expansión *in vitro*, con la magnitud de la actividad antiviral medida por los ensayos VIA y VITAL, de manera de encontrar aspectos favorables de la respuesta inmune que se asocien a un mejor control viral y que pudieran ser estimulados en el contexto de terapias de remisión virológica. Para realizar estos análisis, los resultados obtenidos para las células efectoras Nef- y p24-específicas fueron agrupados, debido a que no se hallaron diferencias intragrupo entre ambas condiciones, es decir dentro del grupo T_{Ta} y T_{Te}, ni en el ensayo de VIA ni en el VITAL.

IV. 6. 1. Relación entre la capacidad de inhibir la replicación viral *in vitro* (VIA) y la frecuencia de las subpoblaciones de memoria observadas en las muestras post-expansión

Primero, se investigó la presencia de correlaciones con los resultados obtenidos para el ensayo de VIA. Para esto, se evaluó en conjunto la actividad antiviral ejercida por las células efectoras frente a todos los virus, debido a que no se encontraron diferencias entre las distintas cepas virales ensayadas. Los análisis de correlaciones revelaron que, la magnitud del ensayo de VIA se relacionó de manera inversa con la proporción de LT_{SCM} CD8⁺ totales ($r=-0,2634$, $p=0,0054$; *Figura 38A*), con los LT_{MC} CD8⁺ totales ($r=-0,2058$, $p=0,031$; *Figura 38B*) y de manera directa con la proporción de LT_{ET} CD8⁺ totales ($r=0,1878$, $p=0,0495$; *Figura 38C*). Los resultados fueron ajustados por comparaciones múltiples y, luego de hacerlo, las correlaciones siguieron conservando la significancia estadística (p ajustado= $0,0270$, p ajustado= $0,0775$ y p ajustado= $0,0825$, respectivamente). Además, se encontró que la proporción de

LT_{SCM} CD8⁺ HIV-específicos se correlacionó de manera inversa con el VIA ($r=-0,2529$, $p=0,0195$, p ajustado= $0,0713$; *Figura 38D*). Por otro lado, no se encontraron correlaciones significativas entre la capacidad de las células de mediar degranulación o secretar citoquinas y los valores del ensayo de VIA.

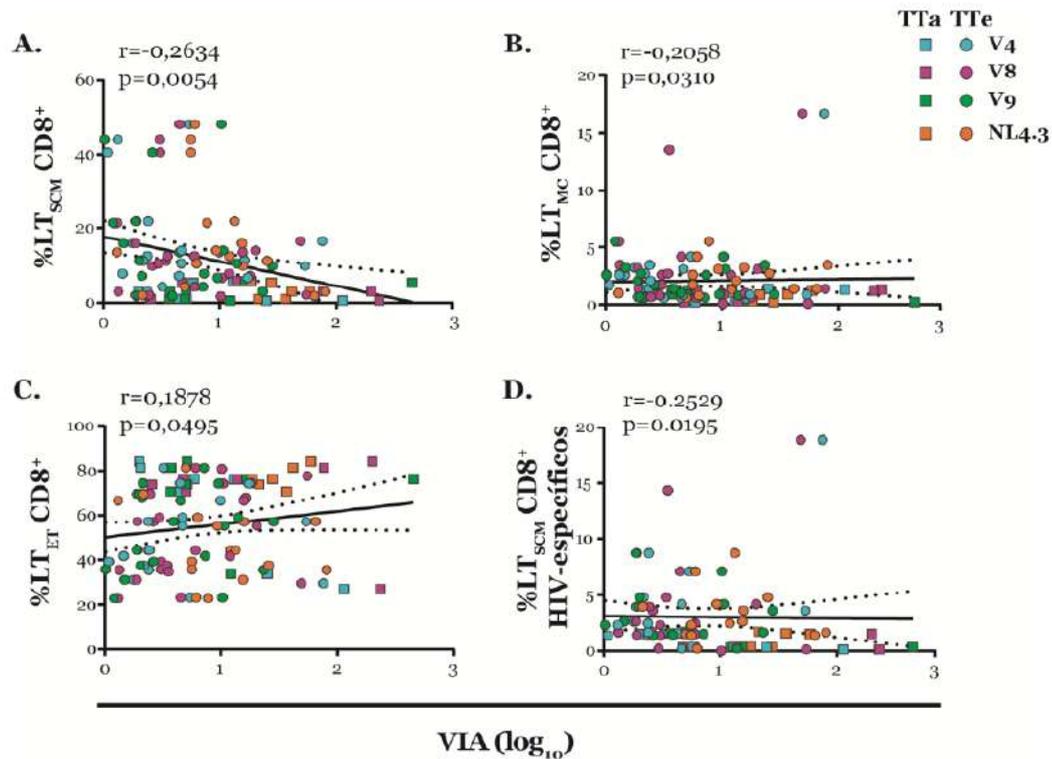


Figura 38: Correlaciones entre la capacidad de inhibir la replicación viral *in vitro* (VIA) de los LT CD8⁺ y el porcentaje de las subpoblaciones de memoria total y HIV-específicas post-expansión. Magnitud de VIA *versus* (A) el porcentaje de LT_{SCM} CD8⁺ totales; (B) el porcentaje de LT_{MC} CD8⁺ totales; (C) el porcentaje de LT_{ET} CD8⁺ totales y (D) el porcentaje de LT_{SCM} CD8⁺ HIV-específicos. Los cuadrados representan a los sujetos del grupo TTa y los puntos a los TTe. Cada cepa viral empleada en el experimento de VIA se muestra en un color diferente. Los valores de r y p corresponden a la prueba de *Spearman*'s.

IV. 6. 2. Relación entre la capacidad de mediar citotoxicidad directa *in vitro* (VITAL) y la frecuencia de subpoblaciones de memoria y células polifuncionales observadas en las muestras post-expansión

En segunda instancia, se evaluó la existencia de correlaciones entre la capacidad de ejercer citotoxicidad y los parámetros de memoria y polifuncionalidad en las muestras post-expansión. Se observó que, la magnitud del ensayo VITAL (porcentaje de lisis específica a una relación T:E de 1:5) correlacionó inversamente con la proporción de LT_{SCM} CD8⁺ HIV-específicos ($r=-0,4677$, $p=0,0376$, p

ajustado=0,0627; *Figura 39A*), con la proporción de LT_{MC} CD8⁺ HIV-específicos ($r=-0,7228$, $p=0,0003$, p ajustado=0,015; *Figura 39B*) y directamente con la proporción LT_{ET} CD8⁺ HIV-específicos ($r=0,5035$, $p=0,0280$, p ajustado=0,0627; *Figura 39C*).

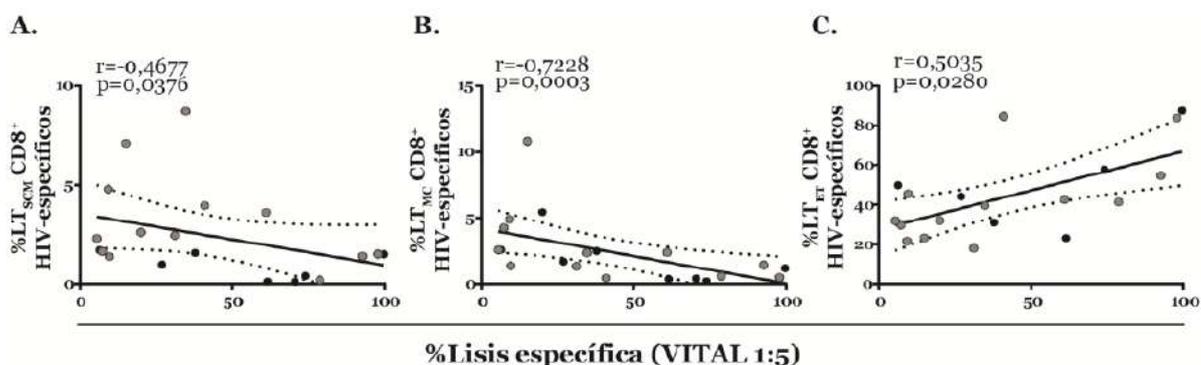


Figura 39: Correlaciones entre la magnitud del ensayo VITAL relación 1:5 (T:E) y las proporciones de LT CD8⁺ HIV-específicos de memoria post-expansión. Porcentaje de lisis específica (VITAL 1:5) *versus* (A) el porcentaje de LT_{SCM} CD8⁺ HIV-específicos; (B) el porcentaje de LT_{MC} CD8⁺ HIV-específicos; (C) el porcentaje de LT_{ET} CD8⁺ HIV-específicos. Los puntos negros representan al grupo TTA y los grises al grupo TTe. Los valores de r y p corresponden a la prueba de Spearman's.

Adicionalmente, se encontraron correlaciones entre la magnitud del ensayo VITAL y la funcionalidad de los LT CD8⁺ post-expansión (*Figura 40*): correlaciones directas con la proporción de LT CD8⁺ capaces de degranular ($r=0,5065$, $p=0,0162$, p ajustado=0,0432; *Figura 40A*), con LT CD8⁺ productores de IFN- γ ($r=0,563$, $p=0,0064$, p ajustado=0,0259; *Figura 40B*), con LT CD8⁺ productores de MIP-1 β ($r=0,5957$, $p=0,0034$, p ajustado=0,0259; *Figura 40C*) y con LT CD8⁺ productores de TNF- α ($r=0,5494$, $p=0,0081$, p ajustado=0,0259; *Figura 40D*), así como con la proporción de células capaces de degranular y secretar IFN- γ ya sea como funciones únicas (células bifuncionales CD107A-B/IFN- γ , $r=0,4652$, $p=0,0291$, p ajustado=0,0582; *Figura 40E*), o en asociación con una o dos funciones extras (células CD107A-B/IFN- γ tri- y tetrafuncionales), independientemente de la función evaluada ($r=0,5671$, $p=0,0059$, p ajustado=0,0259; $r=0,549$, $p=0,0081$, p ajustado=0,0259, respectivamente; *Figura 40F y G*). Asimismo, la magnitud del ensayo VITAL correlacionó directamente con la proporción de LT CD8⁺ tetrafuncionales capaces de degranular, secretar IFN- γ y TNF- α más una función extra ($r=0,4767$, $p=0,0249$, p ajustado=0,0569; *Figura 40H*).

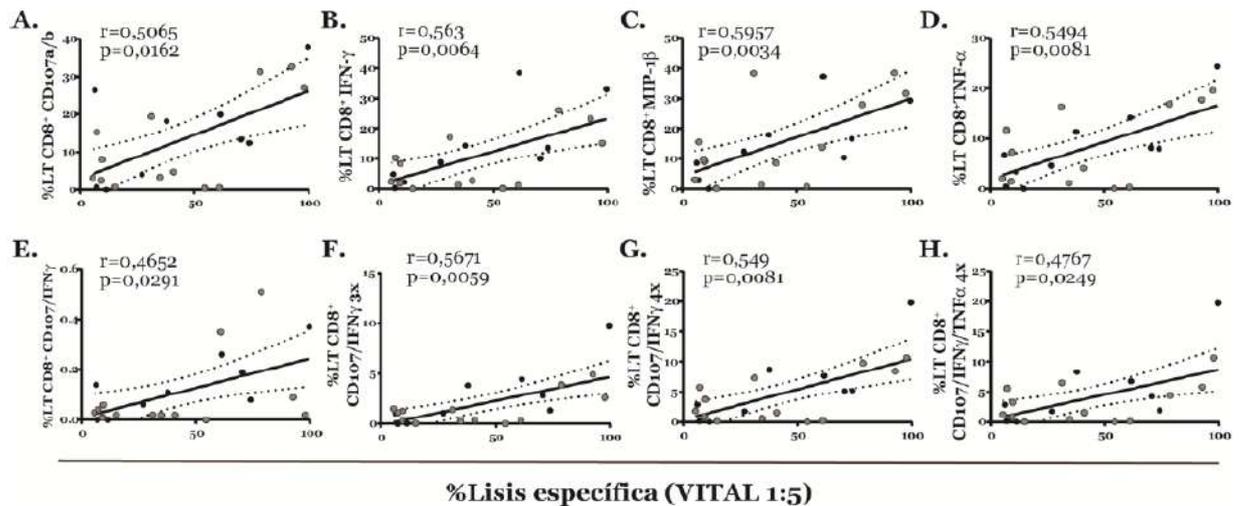


Figura 40: Correlaciones entre la magnitud del ensayo VITAL relación 1:5 (T:E) y la polifuncionalidad de los LT CD8⁺ HIV-específicos post-expansión. Porcentaje de lisis específica (VITAL 1:5) versus (A) el porcentaje de LT CD8⁺CD107A/B⁺; (B) el porcentaje de LT CD8⁺IFN-γ⁺; (C) el porcentaje de LT CD8⁺MIP-1β⁺; (D) el porcentaje de LT CD8⁺TNF-α⁺; (E) el porcentaje de LT CD8⁺ CD107A/B/IFN-γ⁺ bifuncionales; (F) el porcentaje de LT CD8⁺ CD107A/B/IFN-γ⁺ trifuncionales; (G) el porcentaje de LT CD8⁺ CD107A/B/IFN-γ⁺ tetrafuncionales y (H) el porcentaje de LT CD8⁺ CD107A/B/IFN-γ⁺ TNF-α⁺ tetrafuncionales. Los puntos negros representan al grupo TTa y los grises al grupo TTe. Los valores de *r* y *p* corresponden a la prueba de Spearman's.

IV. 6. 3. Análisis de la expresión del factor de muerte celular programada 1 (PD-1) y su asociación con la polifuncionalidad y la actividad antiviral de los LT CD8⁺ post-expansión

Finalmente, se evaluó la asociación entre la expresión de PD-1 y la funcionalidad de las células post-expansión. Se obtuvieron correlaciones directas entre la expresión de PD-1 en la población de LT CD8⁺ HIV-específicos con la capacidad de mediar citotoxicidad (ensayo VITAL relación 1:5; $r=0,4861$, $p=0,0160$, p ajustado= $0,032$; Figura 41A), con la proporción de LT CD8⁺ que degranulan ($r=0,699$, $p=0,0012$, p ajustado= $0,0063$; Figura 41B), con LT CD8⁺ productores de IFN-γ ($r=0,7647$, $p=0,0002$, p ajustado= $0,0014$; Figura 41C), con LT CD8⁺ productores de MIP-1β ($r=0,7661$, $p=0,0002$, p ajustado= $0,0014$; Figura 41D) y con LT CD8⁺ productores de TNF-α ($r=0,8493$, $p<0,0001$, p ajustado= $0,0014$; Figura 41E). Resultó interesante que, la expresión de PD-1 dentro de la población de células HIV-específicas también correlacionó directamente con la proporción de células polifuncionales que degranulan y que son capaces de secretar, concomitantemente, IFN-γ y TNF-α sumado a una función extra (tetrafuncionales) ($r=0,6809$, $p=0,0019$, p ajustado= $0,008$; Figura 41F).

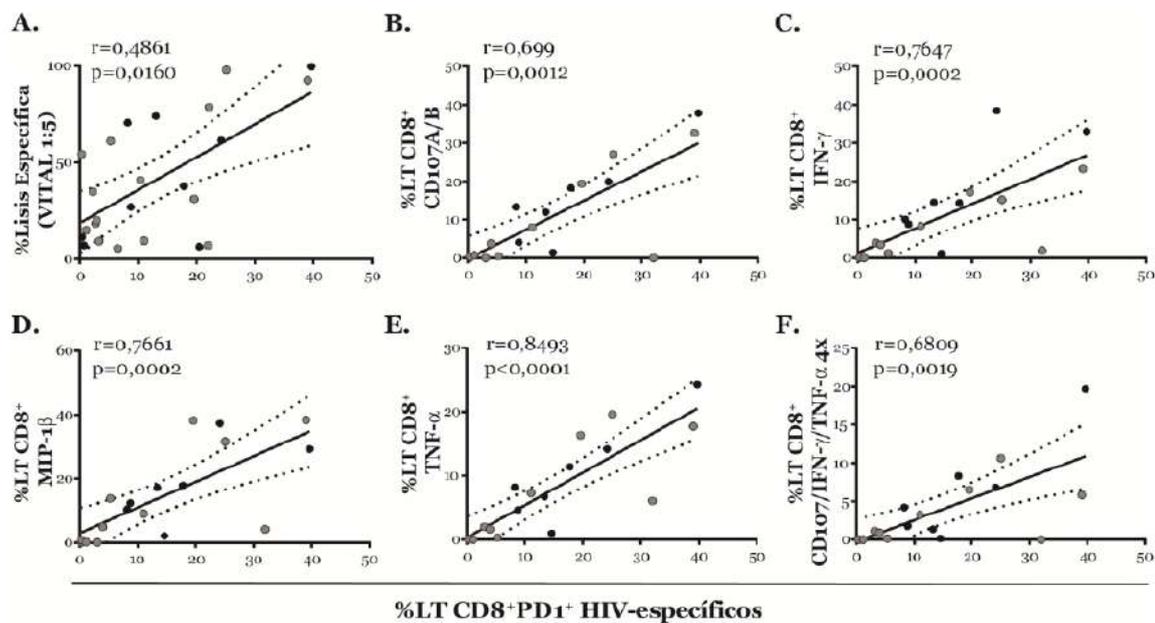


Figura 41: Correlaciones entre el porcentaje de LT CD8⁺ PD1⁺ HIV-específicos y el porcentaje de células con distintos perfiles funcionales post-expansión. Porcentaje de LT CD8⁺ PD1⁺ HIV-específicos *versus* (A) el porcentaje de lisis específica (VITAL relación 1:5); (B) el porcentaje de LT CD8⁺ capaces de degranular; (C) el porcentaje de LT CD8⁺ productores de IFN- γ ; (D) el porcentaje de LT CD8⁺ productores de MIP-1 β ; (E) el porcentaje de LT CD8⁺ productores de TNF- α ; (F) el porcentaje de LT CD8⁺ tetrafuncionales, que degranulan y producen IFN- γ y TNF- α más una función extra. Los puntos negros representan al grupo TTA y los grises al grupo TTe. Los valores de r y p corresponden a la prueba de Spearman's.

En conjunto, los resultados de los análisis de correlaciones ponen de manifiesto la necesidad de lograr una diferenciación hacia un fenotipo de memoria efector para así alcanzar una actividad antiviral máxima en ambos ensayos. El ensayo VITAL correlacionó mejor con subpoblaciones celulares con distintos perfiles funcionales pero siendo todas capaces de degranular, lo que refleja la naturaleza del ensayo. Cabe destacar, que la aparición de correlaciones con la proporción de LT CD8⁺ productores de IFN- γ y TNF- α puede estar siendo forzada por la alta co-expresión del marcador CD107A/B. Resulta interesante que la molécula PD-1 se presentó como un marcador de polifuncionalidad en las células expandidas y, además, se correlacionó de manera directa con la capacidad de mediar citólisis directa.

IV. 7. CALIDAD DE LA RESPUESTA INMUNE ANTES DEL INICIO DEL TRATAMIENTO Y SU RELACIÓN CON LAS CARACTERÍSTICAS DE LA RESPUESTA T CD8⁺ HIV-ESPECÍFICA EVALUADA EN MUESTRAS POST-TRATAMIENTO Y LUEGO DE LA EXPANSIÓN *IN VITRO*

El siguiente objetivo de este trabajo consistió en determinar la existencia de relaciones entre la calidad de la respuesta T CD8⁺ HIV-específica evaluada durante la fase aguda de la infección (individuos pertenecientes a ambos grupos, TTA y TTe) o antes del inicio del cART (individuos grupo TTA), y la respuesta T CD8⁺ HIV-específica evaluada en muestras post-cART y expandidas *in vitro*. Nuestra hipótesis de trabajo es que, las características de las células que persisten una vez iniciado el cART y que son luego expandidas, están condicionadas por aspectos observados antes de iniciado el cART y, que esto se relaciona con aspectos propios de la infección y del hospedador. Para el grupo TTA, se obtuvieron muestras en dos estadios previos al inicio del cART: **muestra basal** (tomada al momento del diagnóstico de la infección por HIV) y **muestra pre-cART** (tomada inmediatamente antes del inicio del cART). En cambio, para el grupo TTe sólo se contó con la **muestra basal**. Esto es porque este grupo de individuos fue reclutado luego de la implementación de los nuevos lineamientos de la OMS que recomiendan iniciar el cART inmediatamente luego del diagnóstico de la infección, lineamientos que Argentina incorporó a las guías nacionales en 2015. Sobre éstos tres puntos muestrales se evaluaron la CV plasmática, el recuento de poblaciones linfocitarias y la activación inmune (ya descrito en *Sección IV.1, Tablas 3 y 4*). A continuación se describen, en primer lugar, los hallazgos observados a partir de la evaluación de la polifuncionalidad y la distribución de las diferentes subpoblaciones de memoria *ex vivo*. Cabe resaltar que los resultados que se mostraran a continuación se centrarán en el análisis de las muestras basales y pre-cART, y su relación con las correspondientes muestras post-cART. Los análisis detallados de las muestras post-cART fueron descritos en las secciones precedentes (Perfil polifuncional *Capítulo IV.3*; Distribución de las subpoblaciones de Memoria y expresión de PD-1 *Capítulo IV.4*).

IV. 7. 1. Perfil polifuncional de los LT CD8⁺ HIV-específicos evaluado *ex vivo* en las muestras obtenidas antes del inicio del cART

Empleando el protocolo de estimulación corta (ver *Capítulo III.6*), se evaluó en las muestras obtenidas antes de iniciado el cART (basal y pre-cART), la capacidad *ex vivo* (es decir, sin expandir) de los LT CD8⁺ de mediar degranulación (movilización de CD107A/B) y secreción de citoquinas (IFN- γ , IL-2 y TNF- α) y

quemoquina (MIP-1 β). Debido a que el análisis, en este caso, se realizó sin expansión de la respuesta específica y al bajo número de respuestas positivas obtenido cuando se fragmentaba la respuesta en las 31 opciones posibles, los análisis se realizaron en bloques de funcionalidad (células mono-, bi-, tri-, tetra- y pentafuncionales), independientemente de cada función en particular. En primer lugar, no se observaron diferencias significativas en el perfil polifuncional entre las muestras basales de los grupos TTa y TTe (*Figura 42A*). Tampoco se observaron diferencias entre la muestra basal y la muestra pre-cART dentro del grupo TTa, posiblemente debido al bajo número de respuestas analizadas en la muestra basal de este grupo (n=4 individuos, 7 respuestas HIV-específicas evaluadas).

Luego, se comparó el perfil de polifuncionalidad entre las muestras basales de ambos grupos y lo observado en las muestras post-cART post-expansión (*Figura 42A*). Tanto para el grupo TTa como TTe, los perfiles resultaron significativamente diferentes (Grupo TTa: $p < 0,0001$ y Grupo TTe: $p < 0,0001$). Lo mismo se observó entre la muestra pre-cART y la muestra post-cART post-expansión en el grupo TTa ($p < 0,0001$). En el grupo TTa, las diferencias estuvieron dadas por un mayor porcentaje de células monofuncionales y un menor porcentaje de células tri-, tetra- y pentafuncionales en las muestras basales y pre-cART *versus* la muestra post-cART (post-expansión) (1 fx: $p = 0,0001$ y $p = 0,0001$; 3 fx: $p = 0,007$ y $p = 0,0001$; 4 fx: $p = 0,0001$ y $p = 0,0001$; 5 fx: $p = 0,0001$ y $p = 0,0001$; al comparar con las muestras basales y pre-cART, respectivamente; *Figura 42B*). En el grupo TTe, las diferencias fueron similares a las observadas para el grupo TTa, es decir mayores porcentajes de células monofuncionales ($p = 0,0001$) y menores proporciones de células bi- ($p = 0,001$), tri- ($p = 0,0001$), tetra- ($p = 0,0001$) y pentafuncionales ($p = 0,001$) en la muestra basal comparado con su respectiva muestra post-cART (*Figura 42B*).

En resumen, a tiempos tempranos post-infección se observó una gran proporción de células monofuncionales, aunque fue posible encontrar células polifuncionales pero en muy baja frecuencia. Este patrón se modificó en las muestras post-cART post-expansión, observando un significativo enriquecimiento en células polifuncionales en igual medida en ambos grupos. Independientemente de las diferencias observadas en cuanto a la polifuncionalidad antes de iniciar el cART, la expansión *in vitro* lograría contrarrestar esas diferencias e igualar la capacidad funcional en los dos grupos estudiados.

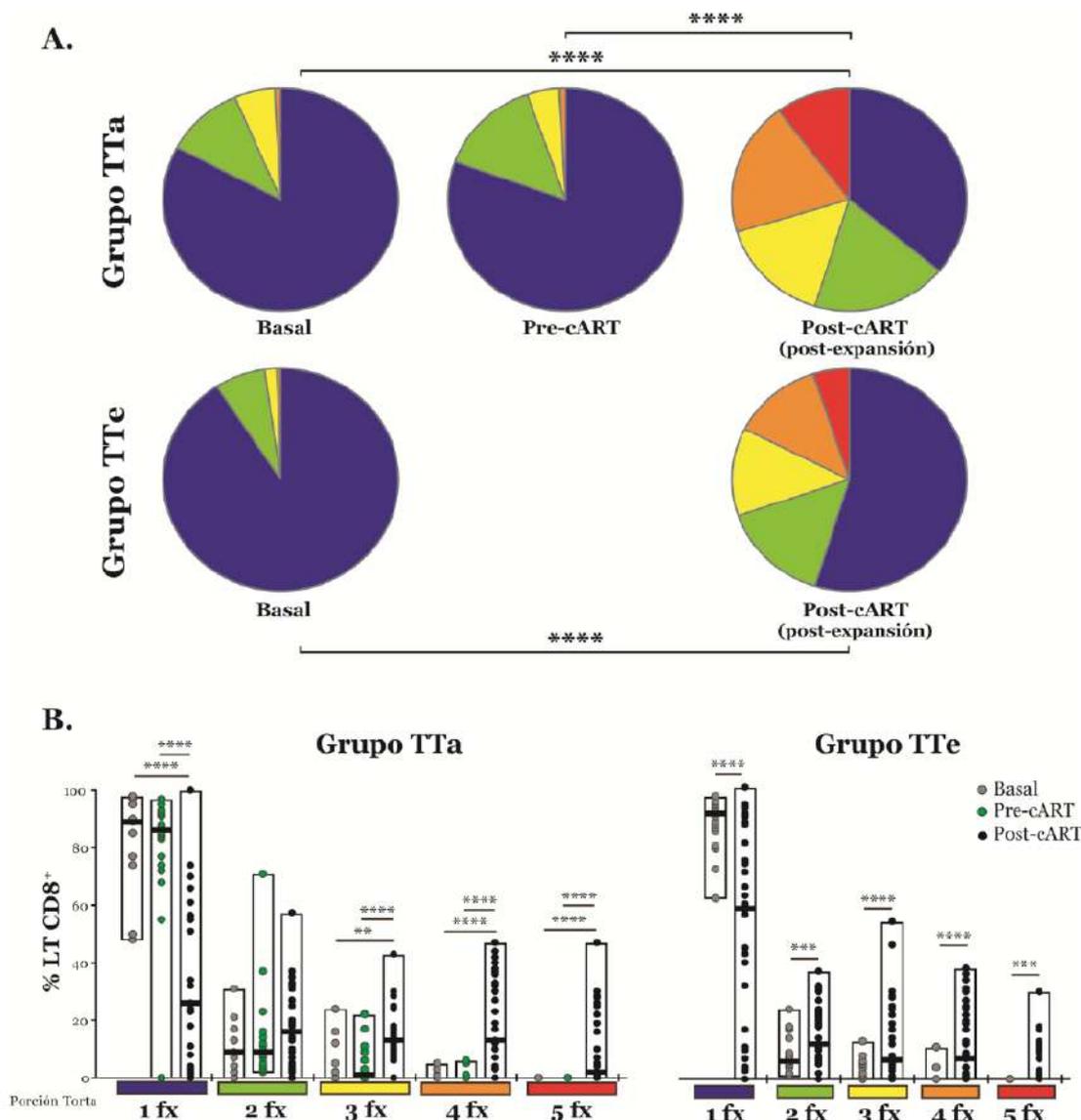


Figura 42: Perfil de polifuncionalidad de los LT CD8⁺ HIV-específicos, observado en las muestras obtenidas de individuos TTa (muestras basal, pre-cART y post-cART post-expansión) y TTe (muestras basal y post-cART post-expansión). **(A)** Gráficos de torta para cada muestra evaluada en cada grupo estudiado. Para realizar este análisis se consideró la proporción de células capaces de mediar una (1 fx, azul), dos (2 fx, verde), tres (3 fx, amarillo), cuatro (4 fx, naranja) o cinco (5 fx, rojo) funciones simultáneamente, independientemente de cada función particular o combinación de funciones (análisis en bloque). **(B)** Gráficos de barras, el panel izquierdo corresponde al grupo TTa y el derecho al grupo TTe, los colores en la base se corresponden con aquellos mostrados en las tortas. Las cajas se extienden del mínimo al máximo y las líneas horizontales dentro de las cajas muestran el valor de la mediana. Los puntos grises representan las muestras basales (de ambos grupos), los puntos verdes la muestra pre-cART (grupo TTa) y los de color negro las muestras post-cART post-expansión (de ambos grupos). Los análisis se realizaron con el programa SPICE. Cuando se analizó la distribución global (tortas) se aplicó el test de permutación y para el análisis de los gráficos de barra se usó la prueba *t* de Student. Los asteriscos denotan valores de *p*: * < 0,05; ** *p* ≤ 0,005; *** *p* ≤ 0,001; **** *p* ≤ 0,0001. Para el grupo TTa se analizaron: en la muestra basal N=4 sujetos, 7 respuestas HIV-específicas; en la muestra pre-cART =9 sujetos, 18 respuestas HIV-específicas. Para el grupo TTe se analizaron en la muestra basal: N=13 sujetos, 24 respuestas HIV-específicas.

IV. 7. 2. Análisis del perfil de diferenciación de memoria en los LT CD8⁺ totales, HIV-específicos y PD-1⁺, evaluados *ex vivo* en las muestras obtenidas antes del inicio del cART

Luego se analizó, *ex vivo*, el patrón de diferenciación de memoria en las muestras obtenidas antes de iniciado el cART (basales y pre-cART). En primer lugar, el análisis se realizó sobre la población de LT CD8⁺ totales. Al comparar la distribución de las distintas subpoblaciones se observó una diferencia significativa entre las muestras basales de ambos grupos ($p=0,0005$; *Figura 43A*). Dicha diferencia se debió a una mayor proporción de las subpoblaciones T_N ($p=0,0001$), T_{SCM} ($p=0,012$), T_{MC} ($p=0,001$) y T_{ME} ($p=0,023$) y una menor proporción de T_{ET} ($p=0,0001$) en la muestra basal del grupo TTe comparado con su contraparte en el grupo TTa (*Figura 43B*; las diferencias mencionadas entre los grupos no se encuentran señaladas en el gráfico de barras con el fin de simplificar la figura). Luego, dentro del grupo TTa se observó una diferencia estadísticamente significativa entre la muestra basal y su respectiva muestra pre-cART ($p<0,0001$; *Figura 43A*). En este caso, las diferencias observadas se debieron a una menor proporción de T_N ($p=0,0001$), T_{MC} ($p=0,004$) y T_{ME} ($p=0,0001$), y una mayor proporción de T_{ET} ($p=0,0001$) en la muestra basal (*Figura 43B*). Resultó llamativo haber encontrado diferencias significativas en la distribución de las subpoblaciones de memoria entre las muestras basales de ambos grupos, ya que los individuos se encontraban en un estadio similar de la infección al momento del muestreo basal. Esto podría deberse a diversos factores: i) sólo se contó con muestras basales de 4 individuos del grupo TTa, el bajo N podría estar sesgando los resultados; ii) la media de días post-infección en la toma de la muestra basal para el grupo TTa fue mayor que en el grupo TTe (112 días vs 54 días, respectivamente); siendo que la etapa aguda de la infección es muy dinámica ciertos parámetros pueden variar considerablemente dependiendo del momento de toma de la muestra; iii) los individuos del grupo TTa no recibieron cART según las directrices previas al año 2015, por ende, constituyen un grupo considerado como de buen *status* clínico por su buena evolución inmune y clínica según esas normas. Este aspecto no puede ser evaluado en el grupo TTe.

Luego, se comparó lo observado en las muestras previas al inicio del tratamiento (basal y pre-cART) con los datos correspondientes a las muestras post-cART obtenidos luego de la expansión. Se encontraron diferencias significativas entre las muestras previas al cART y las post-cART en ambos grupos de estudio (*Figura 43A*). En el grupo TTa, tanto la muestra basal como la muestra pre-cART mostraron un perfil significativamente diferente al observado en la muestra post-cART (post-expansión) ($p=0,0296$ y

$p=0,0003$; respectivamente). La muestra basal presentó un mayor porcentaje de T_N ($p=0,012$) y T_{ET} ($p=0,007$), y una menor proporciones de T_{SCM} ($p=0,006$), de T_{MC} ($p=0,026$) y T_{ME} ($p=0,021$) comparado con su respectiva muestra post-cART (*Figura 43B*). A su vez, la muestra pre-cART presentó una mayor proporción de T_N ($p=0,0001$), T_{MC} ($p=0,012$) y T_{ME} ($p=0,009$), y una menor proporción de T_{ET} ($p=0,0001$), con respecto a su respectiva muestra post-cART. Dentro del grupo TTe, el perfil de diferenciación de memoria fue significativamente diferente entre la muestra basal y post-cART ($p<0,0001$; *Figura 43A*); como resultado de una mayor proporción de T_N ($p=0,0001$) y T_{ET} ($p=0,0001$), y un menor porcentaje de T_{SCM} ($p=0,0001$) y T_{ME} ($p=0,0001$) al compararse con el perfil post-cART (*Figura 43B*).

Seguidamente, se realizó el mismo análisis del perfil de diferenciación pero en el compartimento de LT_{CD8^+} HIV-específicos. Se encontraron diferencias en la distribución de las subpoblaciones de memoria en las muestras basales de ambos grupos ($p=0,0159$; *Figura 44A*). Dichas diferencias surgieron por una menor proporción de T_{SCM} ($p=0,001$) y T_{MC} ($p=0,006$), y un mayor porcentaje de T_{ME} ($p=0,035$) en el grupo TTa comparado con su contraparte TTe (*Figura 44B*).

Cuando se realizó la comparación entre las muestras basales y sus respectivas muestras post-cART expandidas *in vitro*, se obtuvieron diferencias significativas en el perfil de diferenciación de memoria en ambos grupos (TTa, $p=0,0311$ y TTe, $p=0,0001$; *Figura 44A*). Más específicamente, para el grupo TTa las diferencias estuvieron dadas por una menor proporción de T_{ME} y una mayor proporción de células T_{ET} en la muestra basal comparado con su respectiva muestra post-cART ($p=0,012$ y $p=0,034$, respectivamente; *Figura 44B*). En cuanto al grupo TTe, se observó el mismo patrón, es decir un menor porcentaje de T_{ME} y un mayor porcentaje de T_{ET} ($p=0,0001$ y $p=0,015$; respectivamente), pero además se observó un mayor porcentaje de T_{SCM} ($p=0,002$) en la muestra basal comparado con su respectiva muestra post-cART (*Figura 44B*). Contrario a lo que se hubiese esperado luego de una estimulación potente en las muestras post-cART, éstas mostraron una mayor proporción de LT_{ME} $CD8^+$ HIV-específicos y menor proporción de LT_{ET} $CD8^+$ HIV-específicos que las muestras basales, en ambos grupos de individuos.

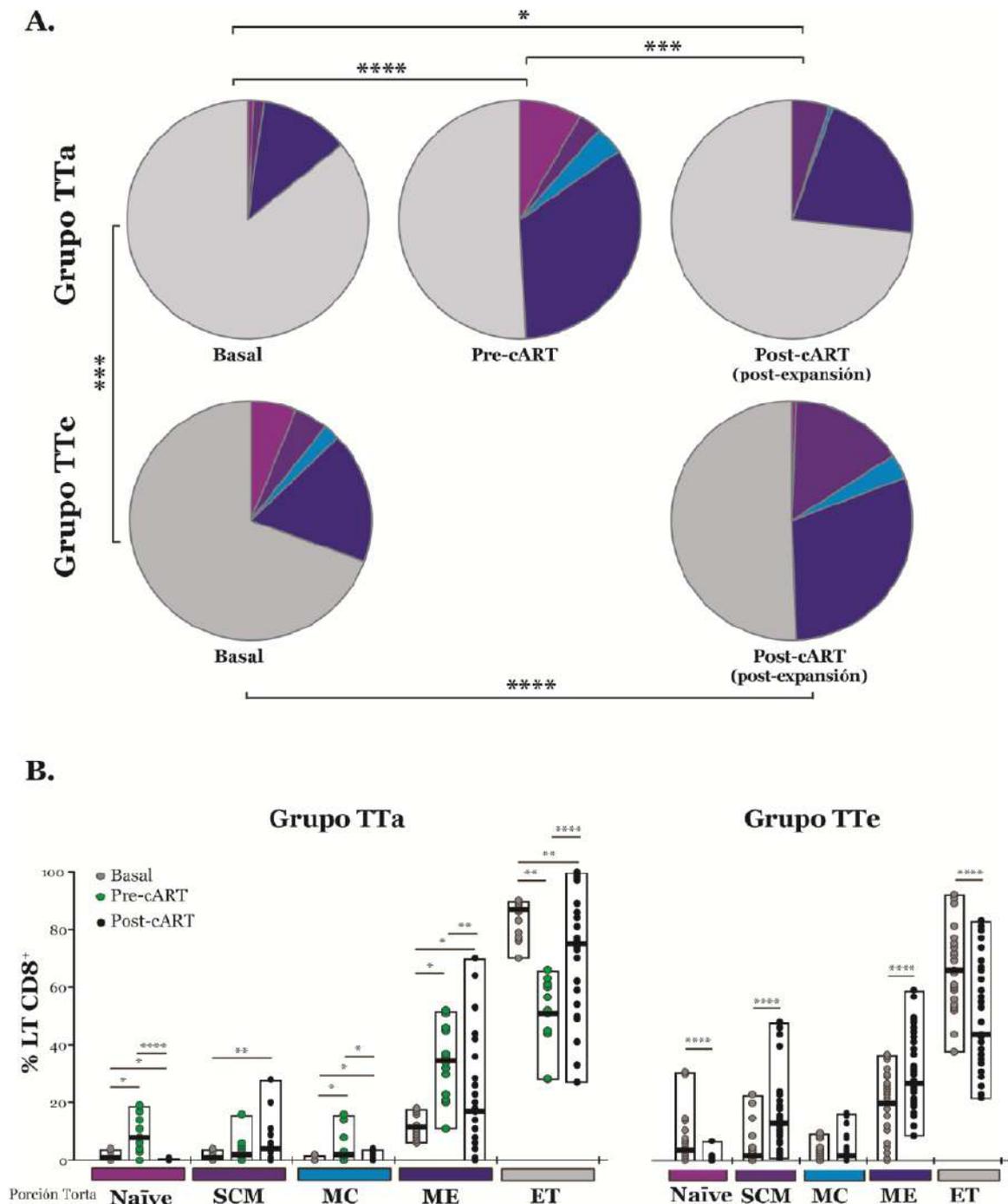


Figura 43: Distribución de las subpoblaciones de memoria en los LT CD8⁺ totales observado en las muestras obtenidas para el grupo TTa (muestras basal, pre-cART y post-cART) y TTe (muestras basal y post-cART). **(A)** Gráficos de torta para cada muestra evaluada en cada grupo estudiado. **(B)** Gráficos de barras mostrando el porcentaje de las distintas subpoblaciones dentro del compartimento CD8⁺ total. El panel de la izquierda corresponde al grupo TTa y el de la derecha al grupo TTe y los colores en la base se corresponden con aquellos mostrados en las tortas. Las cajas se extienden del mínimo al máximo y las líneas horizontales dentro de las cajas muestran el valor de la mediana. Los puntos grises representan las muestras basales (de ambos grupos), los puntos verdes la muestra pre-cART (grupo TTa) y los de color negro las muestras post-cART post-expansión (en ambos grupos). Los análisis se realizaron con el programa *SPICE*. Cuando se analizó la distribución global (tortas) se aplicó el test de permutación y para el análisis de

los gráficos de barra se usó la prueba *t* de Student. Los asteriscos denotan valores de *p*: * $p < 0,05$; ** $p \leq 0,005$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$. SCM: *stem cell* de memoria; MC: memoria central; ME: memoria efectora, ET: efectoras terminales. Para el grupo T_{Ta} se analizaron: en la muestra basal $N=4$ sujetos, 7 respuestas totales; en la muestra pre-cART =9 sujetos, 18 respuestas totales. Para el grupo T_{Te} se analizaron en la muestra basal: $N=13$ sujetos, 25 respuestas totales.

Continuando con la caracterización inmunofenotípica de las células T CD8⁺ en las muestras previas al inicio del cART (basales y pre-cART), se analizó la expresión del marcador PD-1. En primer lugar, se encontraron diferencias entre las muestras basales de ambos grupos ($p < 0,0007$), siendo mayor la expresión de PD-1 en el grupo T_{Ta} (Figura 45). También, se observaron diferencias al comparar las muestras basales de ambos grupos con la muestra pre-cART del grupo T_{Ta}, debido a una mayor proporción de LT CD8⁺PD-1⁺ en ésta última ($p < 0,0001$ y $p = 0,0212$; respectivamente). Y, finalmente, al comparar las muestras basales con sus respectivas muestras post-cART post-expansión, se observó que la expresión de PD-1 disminuyó significativamente en ambos grupos luego de la expansión. Para el grupo T_{Ta}, tanto la muestra basal como la pre-cART mostraron una mayor expresión de PD-1 al compararlas con la muestra post-cART ($p = 0,0063$ y $p < 0,0001$; respectivamente). De igual manera para el grupo T_{Te}, la muestra basal mostró una mayor expresión que su respectiva muestra post-cART ($p < 0,0001$). Independientemente de los elevados niveles de expresión de PD-1 encontrados tanto en las muestras basales como pre-cART, estos se reducen drásticamente post-expansión e, incluso, no se aprecian diferencias en el porcentaje de LT CD8⁺PD-1⁺ entre los grupos T_{Ta} y T_{Te}.

Por último, y de manera análoga a lo realizado sobre las muestras post-cART post-expansión (Capítulo IV.4.3), se estudió el perfil de diferenciación de memoria dentro de la población de LT CD8⁺PD-1⁺ totales. Se observaron diferencias significativas en la distribución de las subpoblaciones entre las muestras basales de ambos grupos ($p = 0,0107$; Figura 46A). Dichas diferencias se debieron a una mayor proporción de las subpoblaciones T_N ($p = 0,011$), T_{SCM} ($p = 0,020$), T_{MC} ($p = 0,001$) y T_{ME} ($p = 0,026$) y una menor proporción de T_{ET} ($p = 0,0001$) en la muestra basal del grupo T_{Te} frente a su contraparte T_{Ta} (Figura 46B). Además, dentro del grupo T_{Ta}, la muestra basal difirió significativamente de su respectiva muestra pre-cART ($p < 0,0001$; Figura 46A). En este caso, las diferencias se debieron a una menor proporción de T_{MC} ($p = 0,002$) y T_{ME} ($p = 0,0001$) y una mayor porcentaje de T_{ET} ($p = 0,0001$) en la muestra basal comparado con su respectiva muestra pre-cART (Figura 46B).

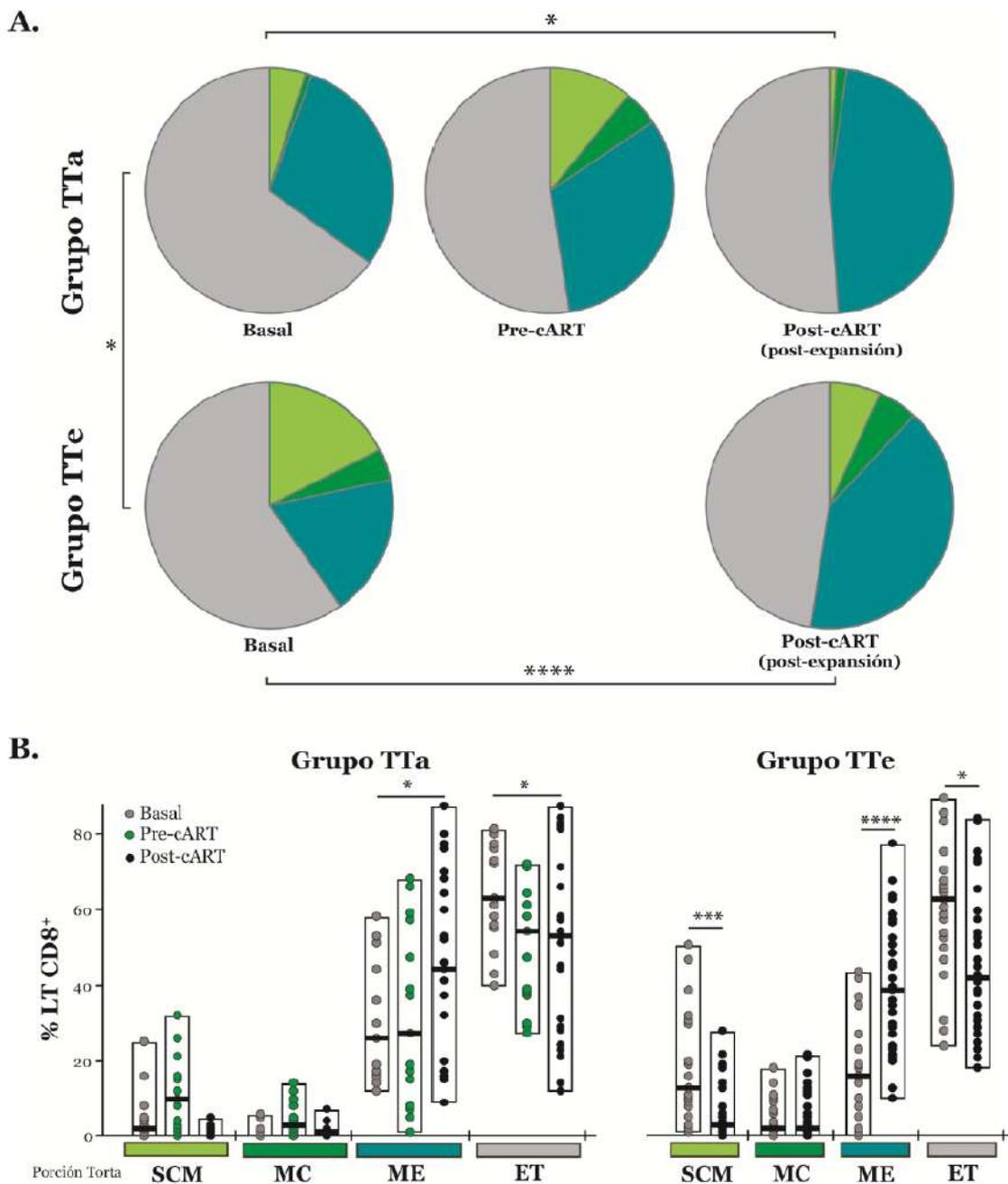


Figura 44: Distribución de las subpoblaciones de memoria en los LT CD8⁺ HIV-específicos observado en las muestras obtenidas para el grupo TTa (muestras basal, pre-cART y post-cART) y TTe (muestras basal y post-cART), identificadas en base a la producción de citoquinas o capacidad de degranulación. **(A)** Gráficos de torta para cada muestra evaluada en cada grupo estudiado. **(B)** Gráficos de barras mostrando el porcentaje de las distintas subpoblaciones dentro del compartimento CD8⁺ HIV-específico. El panel izquierdo corresponde al grupo TTa y el derecho al grupo TTe, los colores en la base se corresponden con aquellos mostrados en las tortas. Las cajas se extienden del mínimo al máximo y las líneas horizontales dentro de las cajas muestran el valor de la mediana. Los puntos grises representan las muestras basales (de ambos grupos), los puntos verdes la muestra pre-cART (grupo TTa) y los de color negro las muestras post-cART (en ambos grupos). Los análisis se realizaron con el programa *SPICE*. Cuando se analizó la distribución global (tortas) se aplicó el test de permutación y para el análisis de los gráficos de barra se usó la prueba *t* de Student. Los asteriscos denotan valores de *p*: * $p < 0,05$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$. SCM: *stem cell* de memoria; MC: memoria

central; ME: memoria efectora, ET: efectoras terminales. Para el grupo TTa se analizaron, en la muestra basal N=4 sujetos, 7 respuestas HIV-específicas; en la muestra pre-cART =9 sujetos, 18 respuestas HIV-específicas. Para el grupo TTe se analizaron en la muestra basal: N=13 sujetos, 25 respuestas HIV-específicas.

Cuando este mismo patrón se comparó con el perfil obtenido en las muestras post-cART (post-expansión) se observó que: para el grupo TTa, la muestra pre-cART difirió significativamente de la muestra post-cART ($p=0,0004$), debido a mayores proporciones de las subpoblaciones T_{MC} ($p= 0,007$), T_{ME} ($p= 0,001$) y menores proporciones de T_{ET} ($p= 0,0001$) en la muestra pre-cART. Para el grupo TTe, la muestra basal fue significativamente diferente a su respectiva muestra post-cART ($p=0,0005$), lo cual se debió a una mayor representación de las subpoblaciones T_N ($p= 0,001$) y T_{ET} ($p= 0,002$), y a una menor representación de T_{ME} ($p= 0,002$) en la muestra basal.

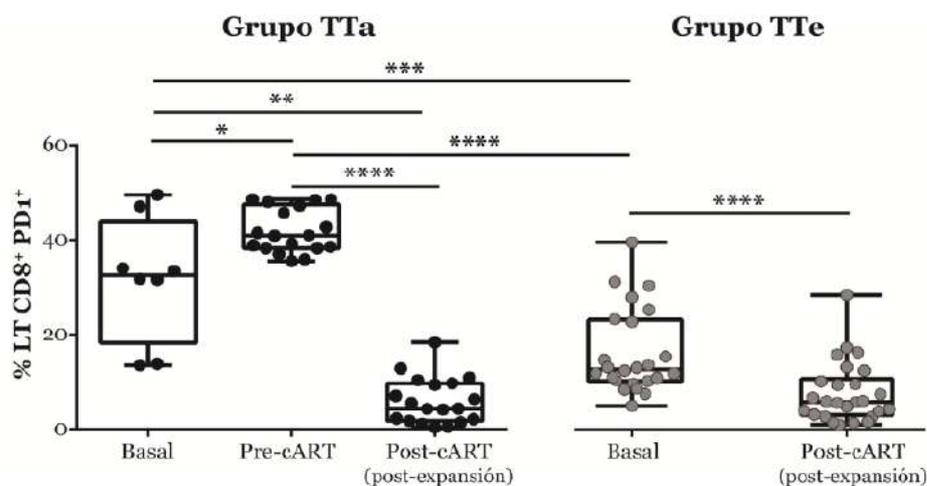


Figura 45: Expresión de PD-1 en LT CD8⁺ en las muestras obtenidas para el grupo TTa (muestras basal, pre-cART y post-cART) y TTe (muestras basal y post-cART). La evaluación en las muestras basales y pre-cART corresponde a la condición *ex vivo* mientras que en la muestra post-cART corresponde a la condición post-expansión. Las cajas se extienden del mínimo al máximo y las líneas horizontales dentro de las cajas representan la mediana. Los puntos negros representan al grupo TTa y los grises al grupo TTe. Los asteriscos denotan valores de p : * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$ y **** $p \leq 0,0001$, los cuales se calcularon utilizando la prueba de *Mann-Whitney* para los análisis intergrupo y *Wilcoxon* para los análisis intragrupo.

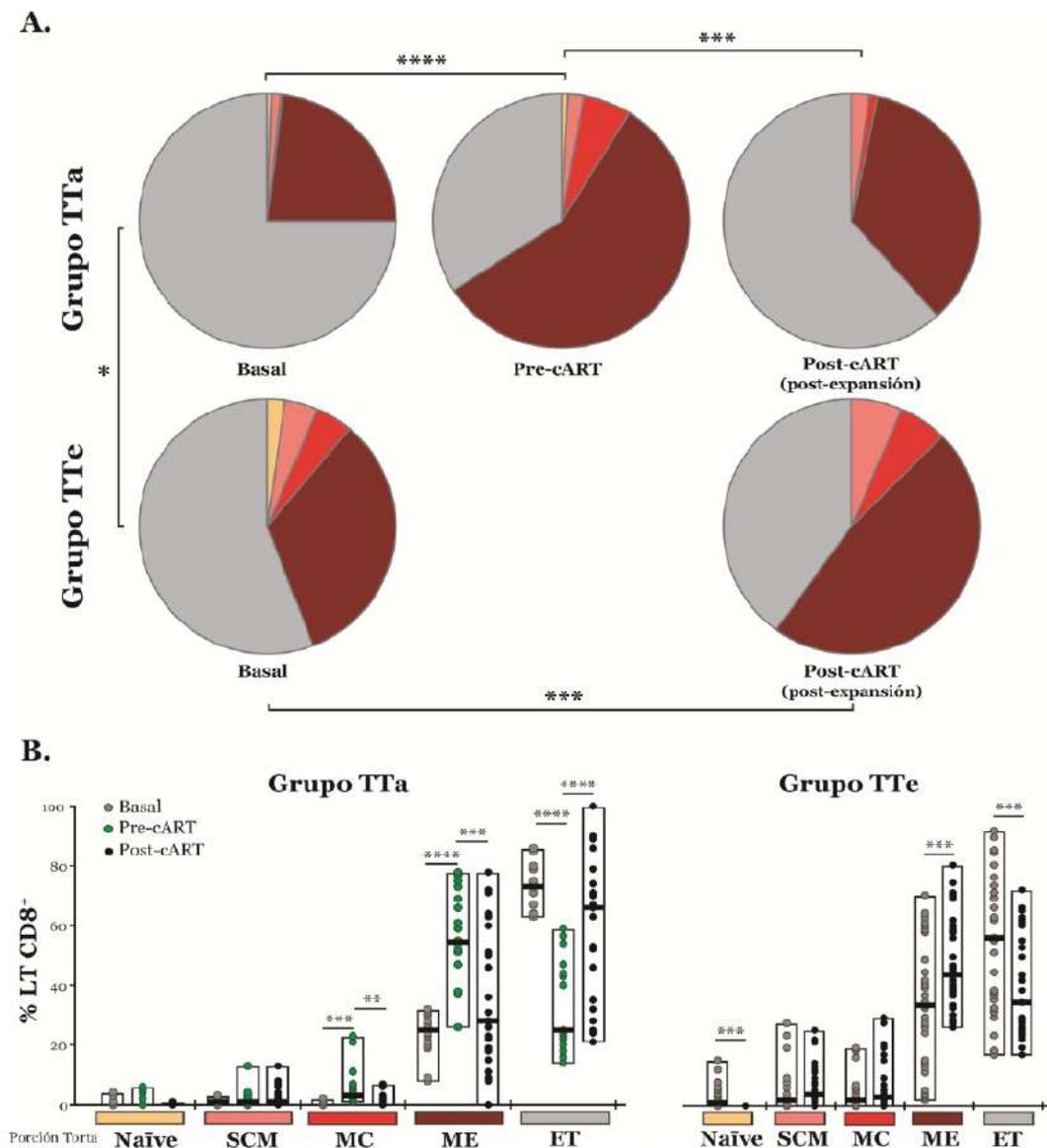


Figura 46: Distribución de las subpoblaciones de memoria en los LT CD8⁺PD-1⁺ totales analizado en las muestras obtenidas para el grupo TTa (muestras basal, pre-cART y post-cART) y TTe (muestras basal y post-cART). **(A)** Gráficos de torta para cada muestra evaluada en cada grupo estudiado. **(B)** Gráficos de barras mostrando el porcentaje de las distintas subpoblaciones dentro del compartimento CD8⁺PD-1⁺. El panel de la izquierda corresponde al grupo TTa y el de la derecha al grupo TTe y los colores en la base se corresponden con aquellos mostrados en las tortas. Las cajas se extienden del mínimo al máximo y las líneas horizontales dentro de las cajas muestran el valor de la mediana. Los puntos grises representan las muestras basales (de ambos grupos), los puntos verdes la muestra pre-cART (grupo TTa) y los de color negro las muestras post-cART (en ambos grupos). Los análisis se realizaron con el programa *SPICE*. Cuando se analizó la distribución global (tortas) se aplicó el test de permutación y para el análisis de los gráficos de barra se usó la prueba *t* de Student. Los asteriscos denotan valores de *p*: * < 0,05; ** *p* ≤ 0,01; *** *p* ≤ 0,001; **** *p* ≤ 0,0001. SCM: *stem cell* de memoria; MC: memoria central; ME: memoria efectora, ET: efectoras terminales. Para el grupo TTa se analizaron: en la muestra basal N=4 sujetos, 7 respuestas totales; en la muestra pre-cART =9 sujetos, 18 respuestas totales. Para el grupo TTe se analizaron en la muestra basal: N=13 sujetos, 25 respuestas totales.

En resumen, el análisis del perfil memoria evaluada en los distintos compartimentos (LT CD8⁺ totales, LT CD8⁺ HIV-específicos y LT CD8⁺PD-1⁺) demostró que existen diferencias significativas entre los distintos tiempos y condiciones evaluados. Entre las muestras basales de ambos grupos, las diferencias que surgieron se deberían a variaciones sutiles producto del momento del diagnóstico de la infección aguda y por lo tanto del muestreo basal (siendo más tardío en los individuos del grupo TTa). A pesar de esto, se observó la misma jerarquía en todos los compartimentos evaluados en las muestras basales, siendo los LT_{ET} CD8⁺ la subpoblación más representada.

Llamativamente, en la muestra pre-cART del grupo TTa se observó, en todos los compartimentos estudiados, una acumulación de LT_{ME} CD8⁺, comparado con las muestras basales. Trabajos previos, incluyendo un reporte de nuestro grupo, han demostrado en el contexto de la infección por HIV una alteración en la diferenciación de LT_{ME} a LT_{ET}, lo cual se traduce en una mayor disfunción inmune y una acelerada progresión a la enfermedad [112, 146]. Por este motivo, se decidió analizar si existía tal arresto de la diferenciación de LT_{ME} a LT_{ET} en las muestras obtenidas antes del tratamiento, en los tres compartimentos estudiados: LT CD8⁺ totales, LT CD8⁺ HIV-específicos y LT CD8⁺ PD-1⁺. Para ello, se calculó el coeficiente $T_{ME}/(T_{ME}+T_{ET})$ en las muestras tomadas antes de iniciado el cART (basal y pre-cART; *Figura 47*). Se observó que, efectivamente, el coeficiente resultó mayor en la muestra pre-cART del grupo TTa comparado a los valores obtenidos para las muestras basales de ambos grupos, tanto para el compartimento de LT CD8⁺ totales ($p=0,0002$ y $p=0,0005$; respectivamente) como para el compartimento de LT CD8⁺PD-1⁺ ($p=0,0002$ y $p=0,0026$; respectivamente). En el caso del compartimento HIV-específico, aunque las diferencias no resultaron estadísticamente significativas, se observó una tendencia similar. En consonancia con la bibliografía publicada, se observó una alteración en la capacidad de diferenciación hacia un fenotipo efector en aquellos individuos que se vieron sometidos a estimulación antigénica durante períodos más prolongados.

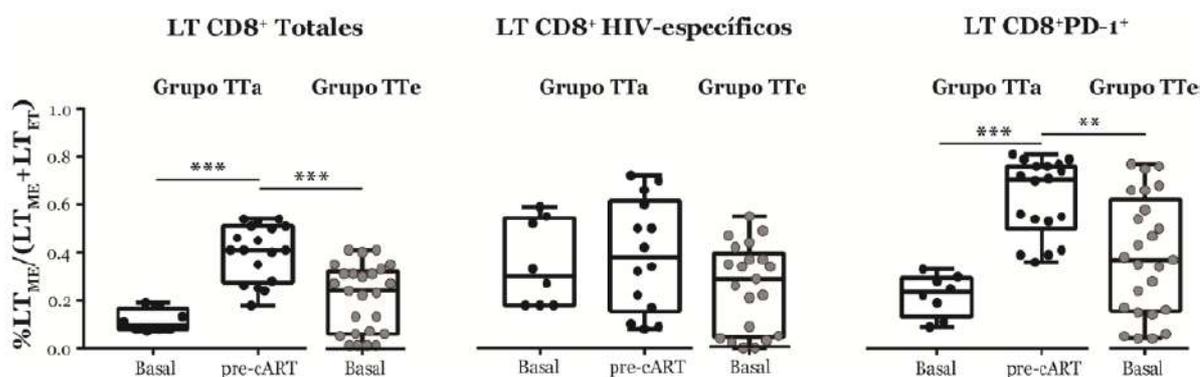


Figura 47: Arresto en la diferenciación del perfil de memoria de LT CD8⁺ desde memoria efectora (T_{ME}) hacia efectoras terminales (T_{ET}), calculado como el coeficiente $LT_{ME}/(LT_{ME}+LT_{ET})$ en las muestras tomadas previo al inicio del cART. Los paneles de izquierda a derecha muestran los resultados obtenidos para los compartimentos de LT CD8⁺ Totales, LT CD8⁺ HIV-específicos y LT CD8⁺ PD-1⁺, respectivamente. Las cajas se extienden del mínimo al máximo y las líneas horizontales dentro de las cajas representan la mediana. Los puntos negros representan al grupo T_{Ta} y los grises al grupo T_{Te}. Los asteriscos denotan valores de *p*: ** *p* < 0,01 y **** *p* < 0,0001, los cuales se calcularon utilizando la prueba de *Kruskal-Wallis*, seguido del *post test* de *Dunn*.

IV. 7. 3. Relaciones entre la calidad de la respuesta T CD8⁺ evaluada en las muestras tomadas previo al inicio del cART, y la progresión clínica y funcionalidad inmune en las muestras post-cART

Por último, se evaluó la existencia de relaciones entre la calidad de la respuesta T CD8⁺ evaluada durante la fase aguda de la infección o antes del inicio del cART, en relación con los parámetros clínicos, inmunológicos y marcadores de progresión evaluados en la muestra post-cART. Asimismo, se evaluó la existencia de correlaciones entre los parámetros de la respuesta inmune planteados (*ex vivo*) con los parámetros de la respuesta T CD8⁺ observados en las muestras post-cART y expandidas *in vitro*.

Para llevar a cabo este análisis, consideramos dos momentos importantes en la infección. Primero, nos propusimos evaluar la presencia de relaciones entre lo observado al momento del diagnóstico de la infección (**muestra basal**) y los parámetros observados en la muestra post-cART, para ello se analizaron en conjunto los datos obtenidos para las muestras basales tanto del grupo T_{Ta} como T_{Te}. En una segunda instancia, evaluamos el impacto del *status* inmune previo a la instauración del cART (**muestra pre-cART**) sobre la reconstitución de la respuesta inmune al año de iniciado el cART, ya que sería un reflejo más fidedigno del impacto de la infección viral sobre los diferentes aspectos evaluados. Para ello se analizaron en conjunto los datos obtenidos en la muestra pre-cART en el grupo T_{Ta} y la muestra basal del grupo T_{Te} (que en este grupo de individuos también se comportaría como muestra pre-cART). A continuación se detallan los diferentes hallazgos.

IV.7.3.1. Relación entre la calidad de la respuesta inmune evaluada en las muestras basal y pre-cART y los aspectos clínicos evaluados en las muestras tomadas luego de un año de iniciado el tratamiento (post-cART)

Con el objeto de encontrar parámetros basales o previos al cART que nos permitieran predecir el *status* clínico observado en los individuos al año de haber iniciado el tratamiento, se realizó un análisis de correlaciones con las características evaluadas tanto en las muestras tomadas al momento del diagnóstico (basales) como pre-cART.

En primer lugar no se encontraron correlaciones significativas entre los parámetros clínicos observados post-cART y los hallazgos en la muestra basal. En cambio, tanto los niveles de activación en LT CD4⁺ y CD8⁺, como el fenotipo y la funcionalidad de los LT CD8⁺ en la muestra pre-cART (muestra basal para el grupo TTe y muestra pre-cART para TTa) se correlacionaron con la recuperación de LT CD4⁺ absolutos y la relación CD4/CD8 evaluados un año post-cART, como se describe a continuación.

Se observó una correlación indirecta entre el porcentaje de LT_{ME} CD8⁺ ($p=0,0004$, $r=-0,5143$, p ajustado= $0,0068$; *Figura 48A*) y una correlación directa con el porcentaje de LT_{ET} CD8⁺ ($p=0,0015$, $r=0,4686$, p ajustado= $0,0115$; *Figura 48B*) en la muestra pre-cART con la recuperación del recuento absoluto de LT CD4⁺ logrado al año de iniciar el cART. Esto indicaría que una mayor diferenciación en el perfil de memoria pre-cART resulta en una mejor restitución del recuento de LT CD4⁺ al año de iniciado el tratamiento. Este aspecto va de la mano con resultados previos, incluyendo resultados de nuestro grupo, que indican que un perfil de memoria con mayor diferenciación y menos activado correlacionaría con una menor tasa de progresión a la enfermedad [112, 147]. En consonancia con esto, se observó que la relación $T_{ME}/(T_{ME}+T_{ET})$ se correlacionó negativamente con la reconstitución de la población de LT CD4⁺ post-cART ($p=0,0009$, $r=-0,4873$, p ajustado= $0,0081$; *Figura 48C*). De igual manera, también resultó negativa la correlación con la expresión de PD-1 en la muestra pre-cART ($p=0,0222$, $r=-0,3522$, p ajustado= $0,0666$; *Figura 48D*). Y, por último, se observó que un mayor nivel de activación inmune en los LT CD4⁺ pre-cART, se correlacionó de manera negativa con la recuperación de CD4⁺ post-cART, tanto al evaluar la expresión de HLA-DR ($p=0,0027$, $r=-0,5286$, p ajustado= $0,0097$; *Figura 48E*) como la expresión simultánea de las moléculas CD38 y HLA-DR ($p=0,0023$, $r=-0,5049$, p ajustado= $0,0097$; *Figura 48F*).

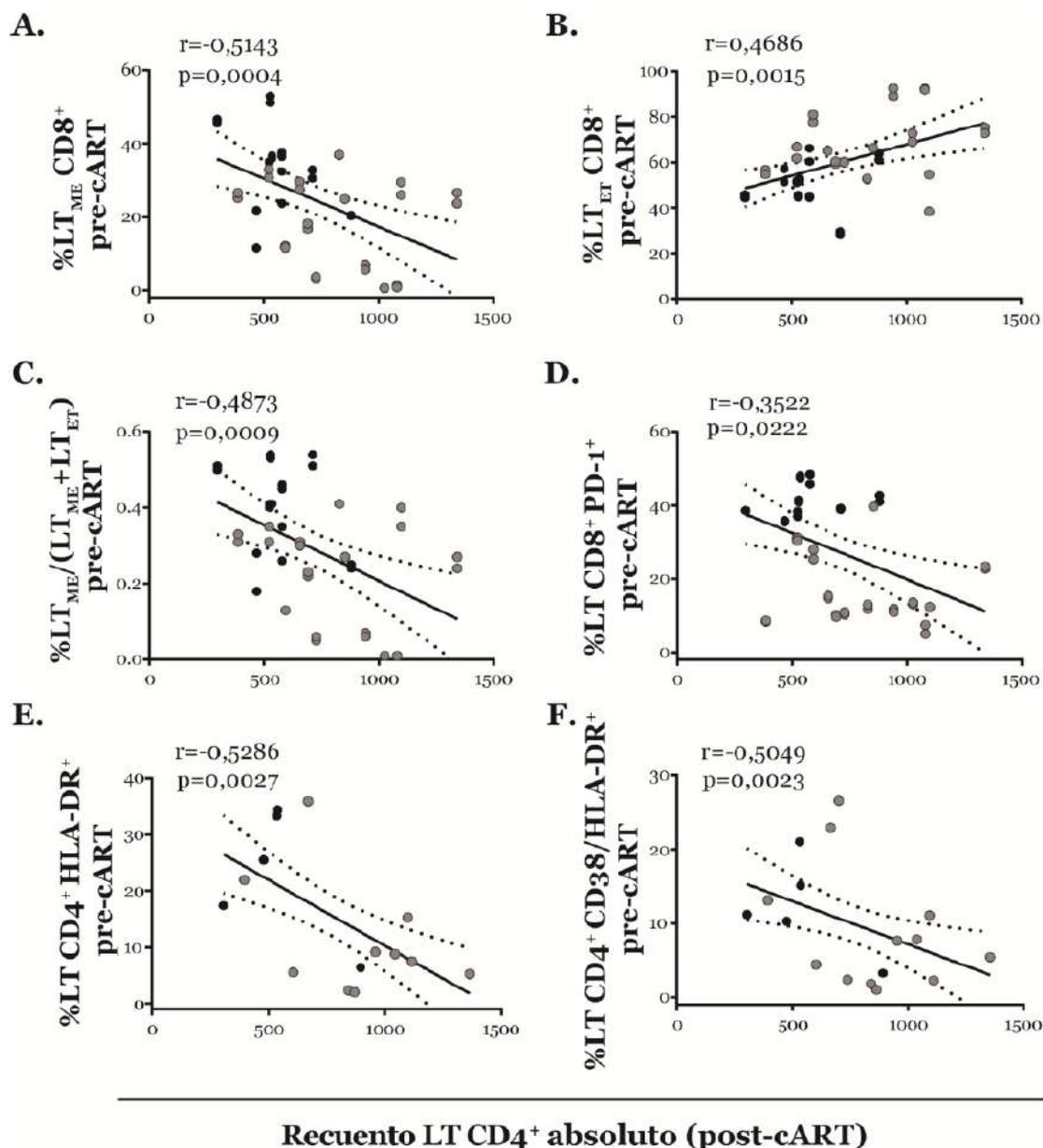
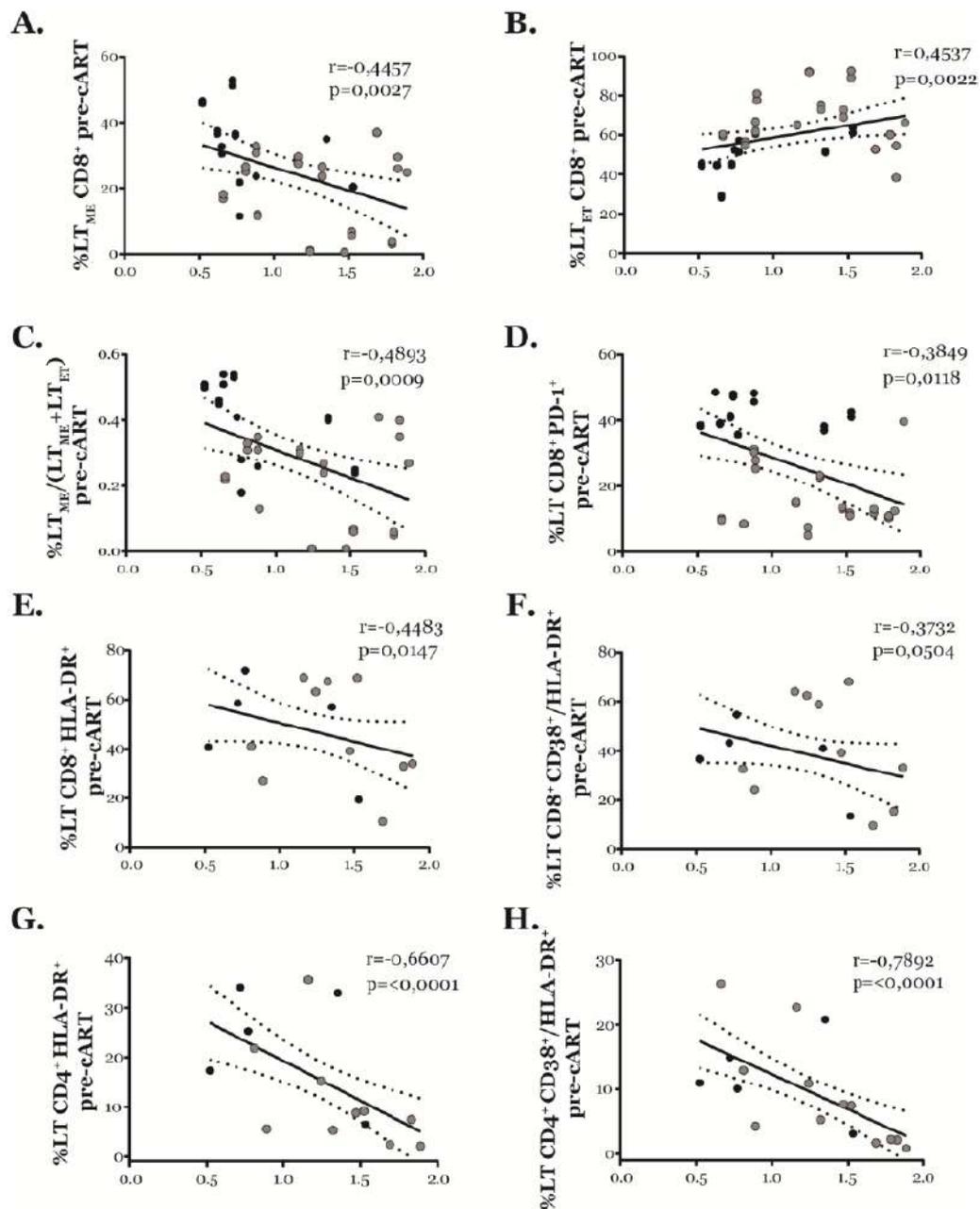


Figura 48: Correlaciones entre diferentes aspectos evaluados en la muestra pre-cART *ex vivo* (basal grupo TTe + pre-cART grupo TTa) y el recuento de LT CD4⁺ luego de un año de tratamiento (muestra post-cART). Correlaciones entre el recuento absoluto de CD4⁺ post-cART *versus* (A) el porcentaje de LT_{ME} CD8⁺; (B) el porcentaje de LT_{ET} CD8⁺; (C) el arresto en la diferenciación de memoria de los LT CD8⁺ desde memoria efectora (T_{ME}) hacia efectoras terminales (T_{ET}); (D) el porcentaje de LT CD8⁺ PD-1⁺; (E) el porcentaje de LT CD4⁺ HLA-DR⁺ y (F) el porcentaje de LT CD4⁺ CD38/HLA-DR⁺, en la muestra pre-cART. Los puntos negros representan al grupo TTa y los grises al grupo TTe. Los valores de *r* y *p* corresponden a la prueba de Spearman's.

Otro aspecto clínico importante para evaluar la reconstitución inmune lo constituye la relación CD4/CD8. Al instaurar el cART, los individuos que logran mejores valores de CD4⁺ y una mayor relación CD4/CD8 se encuentran en mejor estado clínico que aquellos que no logran recuperar estos parámetros. De igual manera que con el recuento absoluto de LT CD4⁺, se observó una relación negativa entre la relación

CD4/CD8 post-cART y el porcentaje de LT_{ME} CD8⁺ ($p=0,0027$, $r=-0,4457$, p ajustado= $0,0115$; *Figura 49A*) y una correlación positiva con los LT_{ET} CD8⁺ en la muestra pre-cART ($p=0,0022$, $r=0,4537$, p ajustado= $0,0115$; *Figura 49B*). En consonancia, al analizar el arresto en la diferenciación de memoria pre-cART, se observó una correlación negativa con la recuperación de la relación CD4/CD8 ($p=0,0009$, $r=-0,4893$, p ajustado= $0,0135$; *Figura 49C*). Asimismo, el nivel de agotamiento de las células T CD8⁺ (PD-1) en la muestra previa al cART se correlacionó con una menor recuperación en la relación CD4/CD8 post-cART ($p=0,0118$, $r=-0,3849$, p ajustado= $0,0401$; *Figura 49D*). Por último, se analizó si existían correlaciones entre los niveles de activación inmune pre-cART y la relación CD4/CD8 post-cART, se encontraron correlaciones negativas con el porcentaje de LT CD8⁺HLA-DR⁺ ($p=0,0147$, $r=-0,4483$, p ajustado= $0,0417$; *Figura 49E*) y una tendencia similar, no significativa, con el porcentaje LT CD8⁺ CD38/HLA-DR⁺ ($p=0,0504$, $r=-0,3732$, p ajustado= $0,1071$; *Figura 49F*). De igual manera, se encontraron correlaciones negativas con la proporción de LT CD4⁺HLA-DR⁺ ($p<0,0001$, $r=-0,6607$, p ajustado= $0,0009$; *Figura 49G*) y LT CD4⁺ CD38/HLA-DR⁺ pre-cART ($p<0,0001$, $r=-0,7892$, p ajustado= $0,0009$; *Figura 49H*).

En resumen, aquellos individuos que en la muestra previa al inicio del cART (pre-cART) presentaron un patrón de diferenciación del compartimento CD8⁺ conservado, menor expresión de PD-1 así como menores niveles de activación en los LT CD8⁺ y CD4⁺, fueron capaces de lograr una mejor reconstitución tanto en el recuento absoluto de LT CD4⁺ como en la relación CD4/CD8 al año de iniciado el cART.



Relación CD4/CD8 (post-cART)

Figura 49: Correlaciones entre diferentes aspectos evaluados en la muestra pre-cART *ex vivo* (basal grupo TTe + pre-cART grupo TTa) y la relación CD4/CD8 en la muestra al año de iniciado el cART (post-cART). Correlaciones entre la relación CD4/CD8 post-cART *versus* (A) el porcentaje de LT_{ME} CD8⁺; (B) el porcentaje de LT_{ET} CD8⁺; (C) el arresto en la diferenciación de memoria de los LT CD8⁺ desde memoria efectora (T_{ME}) hacia efectoras terminales (T_{ET}); (D) el porcentaje de LT CD8⁺PD-1⁺; (E) el porcentaje de LT CD8⁺HLA-DR⁺; (F) el porcentaje de LT CD8⁺CD38/HLA-DR⁺; (G) el porcentaje de LT CD4⁺HLA-DR⁺ y (H) el porcentaje de LT CD8⁺CD38/HLA-DR⁺, en la muestra pre-cART. Los puntos negros representan al grupo TTa y los grises al grupo TTe. Los valores de *r* y *p* corresponden a la prueba de Spearman's.

IV.7.3.2. Relación entre la calidad de la respuesta evaluada en las muestras basales y los aspectos evaluados en las muestras post-cART post-expansión

En una segunda instancia, analizamos las asociaciones existentes entre los parámetros evaluados *ex vivo* al momento del diagnóstico (muestras basales de ambos grupos) y la muestra post-cART (luego de la expansión *in vitro*). Se observó una correlación entre el porcentaje de LT CD8⁺ pentafuncionales obtenido en la muestra post-cART (post-expansión) y el porcentaje de LT_{SCM} CD8⁺ totales presentes en la muestra basal ($p=0,0103$, $r=0,4611$, p ajustado= $0,0129$; *Figura 50A*). La magnitud del VIA post-cART (post-expansión) se correlacionó positivamente con el porcentaje de LT_{ME} CD8⁺ en el compartimento HIV-específico ($p=0,0026$ $r=0,3391$, p ajustado= $0,0286$; *Figura 50B*) y negativamente con los niveles de activación inmune, tanto en LT CD8⁺ como CD4⁺, en las muestras basales: con el porcentaje de LT CD8⁺CD38⁺ ($p=0,0042$ $r=-0,3428$, p ajustado= $0,0308$; *Figura 50C*) y LT CD8⁺CD38/HLA-DR⁺ ($p=0,0130$ $r=-0,2839$, p ajustado= $0,0477$; *Figura 50D*); con el porcentaje de LT CD4⁺ CD38⁺ ($p=0,0006$ $r=-0,3769$, p ajustado= $0,0132$; *Figura 50E*), LT CD4⁺HLA-DR⁺ ($p=0,0080$ $r=-0,2731$, p ajustado= $0,0352$; *Figura 50F*) y LT CD4⁺CD38/HLA-DR⁺ ($p=0,0058$ $r=-0,2713$, p ajustado= $0,0319$; *Figura 50G*). Además, se observaron correlaciones inversas entre el porcentaje de LT CD4⁺CD38⁺ y la capacidad de mediar citotoxicidad directa (%lisis específica, VITAL), tanto en la relación T:E 1:1 ($p=0,0317$, $r=-0,4697$, p ajustado= $0,0845$; *Figura 50H*) como T:E 1:5 ($p=0,0297$, $r=-0,5673$, p ajustado= $0,0845$; *Figura 50I*).

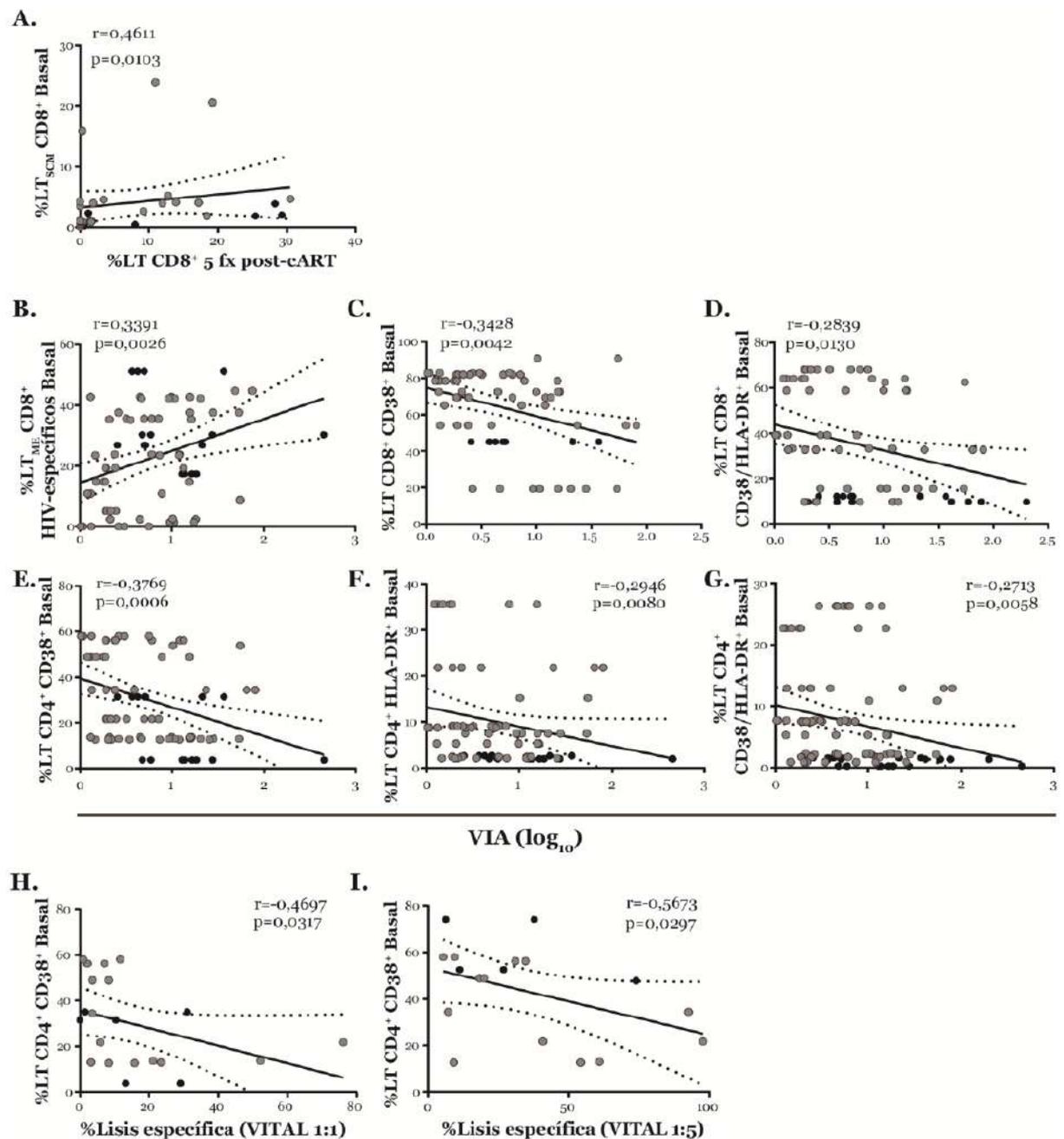


Figura 50: Correlaciones entre aspectos evaluados en las muestras basales *ex vivo* (muestras basales grupos TTa+TTe) y aquellos evaluados en la muestra al año de iniciado el cART (post-cART) y luego de la expansión *in vitro*. **(A)** Correlación entre el porcentaje de LT CD8⁺ pentafuncionales observados post-cART y el porcentaje de LT_{scm} CD8⁺ total en las muestras basales. **(B-G)** Correlaciones entre la capacidad de los LT CD8⁺ de mediar VIA post-cART *versus* **(B)** el porcentaje de LT_{ME} HIV-específicos, **(C)** el porcentaje de LT CD8⁺CD38⁺, **(D)** el porcentaje de LT CD8⁺CD38⁺/HLA-DR⁺, **(E)** el porcentaje de LT CD4⁺CD38⁺, **(F)** el porcentaje de LT CD4⁺HLA-DR⁺ y **(G)** el porcentaje de LT CD4⁺ CD38⁺/HLA-DR⁺, en la muestra basal. **(H)** Correlación entre el porcentaje de Lisis específica (VITAL en relación 1:1) post-cART y el porcentaje de LT CD4⁺CD38⁺ en la muestra basal. **(I)** Correlación entre el porcentaje de Lisis específica (VITAL en relación 1:5) post-cART y el porcentaje de LT CD4⁺CD38⁺ en la muestra basal. Los puntos negros representan al grupo TTa y los grises al grupo TTe. Los valores de r y p corresponden a la prueba de Spearman's.

IV.7.3.3. Relación entre la calidad de la respuesta evaluada en las muestras pre-cART y los aspectos evaluados en las muestras post-cART post-expansión

Por último, y de forma análoga a lo expuesto en el párrafo anterior, se evaluó la existencia de correlaciones entre los aspectos observados en las muestras previas al inicio del cART de ambos grupos (basal para el grupo TTe y pre-cART para el grupo TTa) y los parámetros funcionales y fenotípicos evaluados en los LT CD8⁺ en las muestras post-cART expandidas *in vitro*. Primero, y como se describió para las muestras basales, se observó una correlación positiva entre el porcentaje de LT CD8⁺ pentafuncionales en la muestra post-cART y el porcentaje LT_{SCM} CD8⁺ (tanto totales como HIV-específicos) en la muestra pre-cART ($p=0,0008$ $r=0,5045$ p ajustado= $0,0168$ y $p=0,0089$ $r=0,4417$ p ajustado= $0,0504$, respectivamente; *Figura 51A y B*). Por otro lado, se encontró que la magnitud de VIA post-cART se correlacionó con mayores porcentajes de LT_N CD8⁺ ($p=0,0297$, $r=0,2197$, p ajustado= $0,0941$; *Figura 51C*) y LT_{MC} CD8⁺ ($p=0,0217$, $r=0,2317$, p ajustado= $0,0941$; *Figura 51D*); mayor proporción de LT_{ME} CD8⁺ HIV-específicos ($p=0,0258$, $r=0,2461$, p ajustado= $0,0941$; *Figura 51E*); mayor proporción de células PD-1⁺ dentro de la subpoblación T_{ME} CD8⁺ ($p=0,0169$, $r=0,2409$, p ajustado= $0,0941$; *Figura 51F*); y menor porcentaje de LT CD8⁺CD38⁺ observados en la muestra pre-cART ($p=0,0059$, $r=0,3129$, p ajustado= $0,0912$; *Figura 51G*). Por último, y también en consonancia con lo descrito para la muestra basal, la capacidad de los LT CD8⁺ expandidos de mediar citotoxicidad (% Lisis específica, VITAL en relación 1:1) en la muestra post-cART se correlacionó de manera inversa con el nivel de activación inmune en los LT CD4⁺ pre-cART (%CD38) ($p=0,0373$, $r=-0,4272$, p ajustado= $0,0912$; *Figura 51H*).

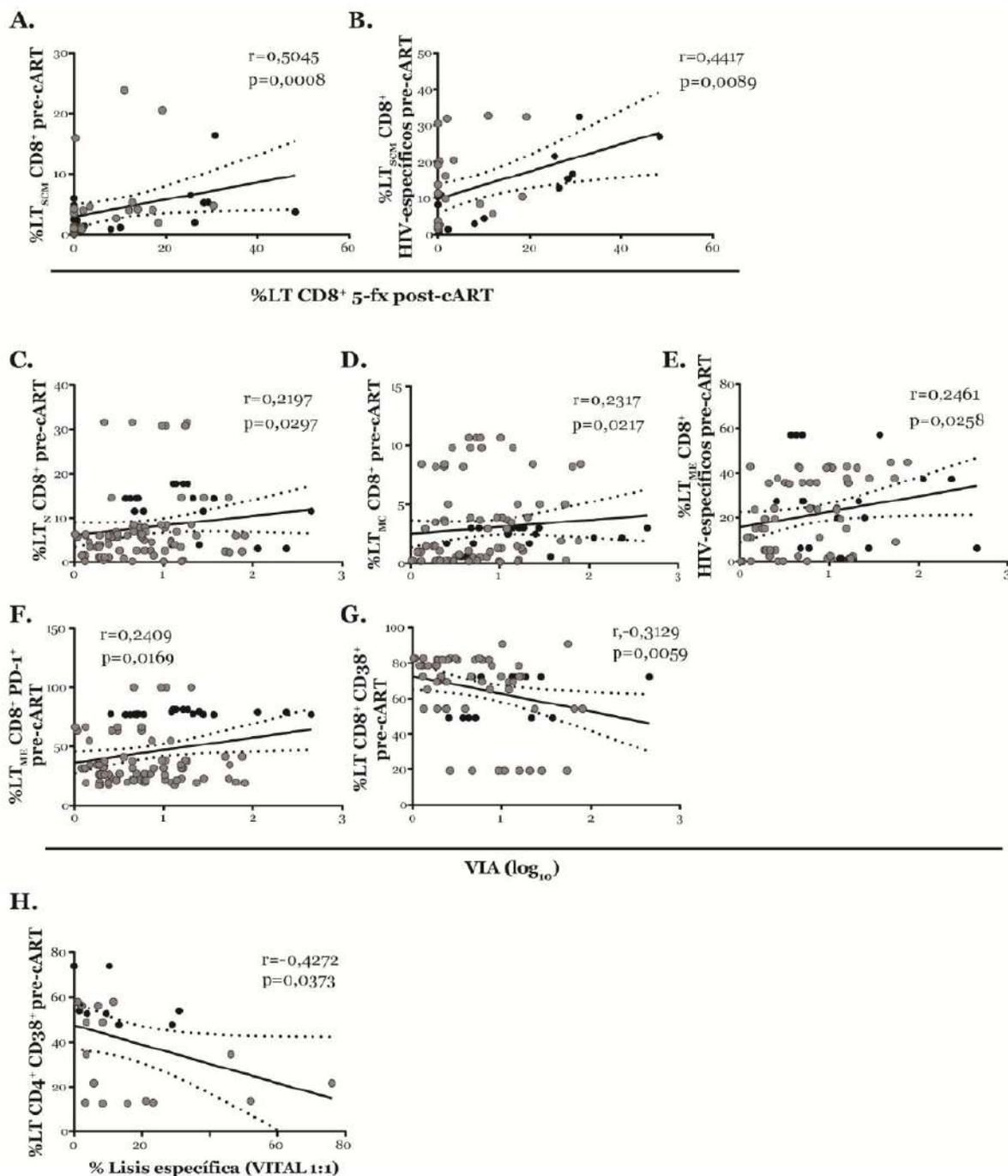


Figura 51: Correlaciones entre aspectos evaluados en las muestras pre-cART *ex vivo* (basal grupo TTe + pre-cART grupo TTa) y aquellos evaluados en la muestra al año de iniciado el cART (post-cART) y post-expansión *in vitro*. Correlaciones entre el porcentaje de LT CD8⁺ pentafuncionales observados post-cART *versus* (A) el porcentaje de LT_{SCM} CD8⁺ totales y (B) el porcentaje de LT_{SCM} CD8⁺ HIV-específicos en las muestras pre-cART. (C-G) Correlaciones entre la capacidad de mediar VIA post-cART *versus* (C) el porcentaje de LT_N CD8⁺ totales, (D) el porcentaje de LT_{MC} CD8⁺ totales, (E) el porcentaje de LT_{ME} CD8⁺ HIV-específicos, (F) el porcentaje de LT_{ME} CD8⁺PD-1⁺ y (G) el porcentaje de LT CD8⁺ CD38⁺, en las muestras pre-cART. (H) Correlación entre el porcentaje de Lisis específica (VITAL en relación 1:1) post-cART y el porcentaje de LT CD4⁺CD38⁺ en las muestras pre-cART. Los puntos negros representan al grupo TTa y los grises al grupo TTe. Los valores de *r* y *p* corresponden a la prueba de Spearman's.

En conclusión, una mayor proporción de LT_{SCM} CD8⁺, tanto en la muestra basal como pre-cART, se correlacionó con una mayor proporción de células HIV-específicas pentafuncionales post-cART (post-expansión). La presencia de esta subpoblación antes del cART resultaría una ventaja, ya que estas células tienen mayor capacidad de autorenovarse, sobrevivir y repoblar la completa ruta de diferenciación del perfil de memoria [91, 148]. De esta manera, se explicaría la asociación encontrada entre la presencia de células con propiedades *stem cell* a tiempos tempranos de la infección y células pentafuncionales post-cART, post-expansión. Por otro lado, aspectos relacionados a la diferenciación del perfil de memoria y el nivel de activación inmune basal y pre-cART se relacionaron con la capacidad de las células T CD8⁺ de mediar actividad antiviral post-cART, ya sea por mecanismos citolíticos como no citolíticos. Por lo tanto, los resultados observados en las muestras obtenidas previo al inicio del cART indican que ciertos parámetros permitirían predecir la funcionalidad y características de las células obtenidas luego del empleo de protocolos de expansión. En otras palabras, estos parámetros serían de utilidad como posibles biomarcadores de la funcionalidad inmune de las células que persisten luego de instaurado el cART. Además, esta información podría ser utilizada en el diseño e implementación de terapias de remisión de la replicación viral personalizadas (*tailor-made*, hechas a medida). De esta manera, se podrían incorporar moduladores de la respuesta inmune con el objetivo de subsanar los aspectos deletéreos observados a tiempos tempranos y lograr así células con mejores cualidades luego de la estimulación *ex vivo*.

V. DISCUSIÓN

*“La ciencia será siempre una búsqueda, jamás un descubrimiento real. Es un viaje,
nunca una llegada”*

Karl Raimund Popper

La implementación del tratamiento antirretroviral combinado (cART) mejoró enormemente la calidad y expectativa de vida de los individuos infectados por HIV. Sin embargo, el cART no es capaz de eliminar el reservorio viral por sí solo, transformando la terapia en un tratamiento de por vida que no logra curar la infección. Muchas estrategias han sido propuestas para lograr la eliminación de los reservorios virales (o al menos la remisión virológica sostenida) y el éxito de algunas de ellas depende en gran medida de la actividad de los LT CD8⁺ HIV-específicos [70, 149]. Pero el conocimiento disponible acerca de la calidad de la respuesta T CD8⁺ HIV-específica en individuos que se encuentran bajo cART no es preciso ni completo.

El inicio temprano del tratamiento antirretroviral trae aparejado profundos beneficios, tanto sobre parámetros virológicos, inmunológicos y clínicos en los sujetos infectados [86, 87, 134, 150]. De manera análoga, la mayor persistencia del antígeno tiene consecuencias deletéreas sobre las células T CD8⁺ HIV-específicas, lo que resulta, con el tiempo, en una respuesta inmune exhausta e hiperactivada [87, 151]. Más aún, cuánto más tarde es iniciado el cART mayor es el tamaño del reservorio viral y, además, su composición resulta alterada, siendo poblado mayoritariamente por variantes con mutaciones de escape en epítopes CD8⁺ inmunodominantes [152]. Sin embargo, diferentes estudios indican que, en individuos bajo cART, los LT CD8⁺ que persisten luego de la expansión *ex vivo* son capaces de ejercer actividad antiviral *in vitro*, incluso frente a células reactivadas (es decir, LT CD4⁺ latentemente infectados expuestos a agentes de reversión de la latencia) [125, 152, 153], pero la eliminación de las células infectadas y reactivadas no llega a ser completa [154].

Pocos trabajos han investigado el impacto del inicio de la terapia antirretroviral, a diferentes tiempos después de la infección, sobre la magnitud y amplitud de la respuesta de las células T CD8⁺ [114, 155, 156]. Sin embargo, ninguna de estas aproximaciones ha evaluado cómo esas diferencias impactan en la actividad antiviral final, aspecto importante a considerar frente al desarrollo e implementación de estrategias terapéuticas para lograr la remisión virológica. En síntesis, resta identificar y evaluar en profundidad aquellas características funcionales y fenotípicas de las células T CD8⁺ que se asociarían a un mejor control viral en el contexto de la reactivación del reservorio, de manera de ser estimuladas posteriormente para lograr la cura o la remisión de la infección.

En este contexto, el **objetivo general** de este trabajo fue *estudiar múltiples aspectos funcionales y fenotípicos de la respuesta T CD8⁺ HIV-específica en muestras obtenidas de individuos HIV⁺ que*

iniciaron tratamiento a diferentes tiempos post-infección. Los grupos de estudio incluidos en el trabajo ejemplifican dos situaciones que encontraríamos en la actualidad en sujetos infectados, los cuales serían potenciales candidatos a someterse a las terapias de remisión virológica.

Los **resultados obtenidos** en esta tesis indican que: i) el haber comenzado el cART a tiempos tempranos luego de la infección impactó positivamente en la recuperación del recuento de LT CD4⁺ post-cART (*Figura 21*); ii) las respuestas T CD8⁺ Nef- y p24-específicas pudieron ser expandidas *in vitro*, tanto en el grupo T_{Ta} como T_{Te}, luego de un año de haber iniciado el cART (*Figura 24*); iii) se observaron elevados porcentajes de células T CD8⁺ Nef- y p24-específicas polifuncionales post-expansión, con un perfil incluso comparable a las células CEF-específicas (*Figuras 26 y 27*); iv) luego de la expansión, el perfil de memoria de los LT CD8⁺ resultó fuertemente diferenciado hacia un fenotipo efector, aunque los individuos del grupo T_{Te} mostraron una mayor preservación de las subpoblaciones de células T_N, T_{SCM} y T_{MC} CD8⁺ (*Figuras 28, 29 y 31*); v) la expresión de PD-1 post-expansión estuvo principalmente concentrada en las células T_{ME} CD8⁺ HIV-específicas y este parámetro se correlacionó con una mayor polifuncionalidad de los LT CD8⁺ post-expansión (*Figuras 30, 31, 32 y 41*); vi) los LT CD8⁺ expandidos, tanto Nef- como p24-específicos, mostraron una alta eficiencia al momento de ejercer actividad antiviral (a través de mecanismos citolíticos y no citolíticos) y la magnitud de éste parámetro se relacionó con una mayor proporción de LT CD8⁺ de memoria efectora diferenciados (en el caso de ambos ensayos VIA y VITAL), con la polifuncionalidad (VITAL) y con la proporción de LT CD8⁺ HIV-específicos PD-1⁺ (VITAL) (*Figuras 38, 39, 40 y 41*); vii) la recuperación de los parámetros clínicos (recuento absoluto de LT CD4⁺ y relación CD4/CD8) luego de un año de haber iniciado el cART, fue más pronunciada en aquellos individuos que mostraron una diferenciación conservada del perfil de memoria, menor expresión total de PD-1, así como menores niveles de activación inmune, tanto en los LT CD8⁺ como CD4⁺ en la muestra pre-cART (*Figuras 48 y 49*); viii) se encontró que, ciertos parámetros observados en las muestras basales y pre-cART nos permitirían predecir las características funcionales post-expansión de los LT CD8⁺ que persisten post-cART: un perfil de memoria con menor diferenciación en las muestras tomadas antes del cART correlacionó con una mayor proporción de LT CD8⁺ polifuncionales y con una mayor capacidad citotóxica en la muestra post-cART, asimismo menores niveles de activación basales y pre-cART también mostraron correlacionar positivamente con la capacidad de ejercer actividad antiviral post-cART (VIA y VITAL) (*Figuras 50 y 51*).

La **mayor contribución** de este trabajo yace en la profunda caracterización inmune y funcional lograda en las muestras obtenidas de individuos bajo tratamiento, así como también en la evaluación del impacto del momento de inicio del mismo sobre éstos parámetros. El protocolo de expansión nos permitió ilustrar, como una primera aproximación, el efecto de la re-estimulación de los LT CD8⁺ HIV-específicos mediado por antígenos virales, simulando lo que ocurriría en el caso de una reactivación del reservorio en el contexto de la aplicación de estrategias de cura y/o remisión virológica. Además, se lograron identificar posibles *biomarcadores* tempranos (evaluados antes del cART) que permitirían predecir aspectos funcionales de las células T CD8⁺ que persisten luego de iniciado el cART, aspecto que cobra importancia a la hora de plantear estrategias de cura funcional "hechas a la medida" para cada individuo.

El inicio del tratamiento antirretroviral se traduce en la disminución a niveles indetectables de los antígenos virales circulantes en aquellos individuos que muestran una buena adherencia. Esto lleva a una dramática reducción de la frecuencia de LT CD8⁺ HIV-específicos circulantes [77, 78, 157-160]. Por este motivo, para lograr estudiar la respuesta inmune específica en las muestras obtenidas luego del inicio del cART se decidió implementar un **protocolo de expansión celular *in vitro***. Diferentes autores ya han demostrado la utilidad de estimular las respuestas HIV-específicas para lograr una actividad óptima [81, 114, 122, 124, 125, 152, 153, 161-164]. En este trabajo, se analizaron particularmente las respuestas de las células T CD8⁺ expandidas con *pooles* de péptidos correspondientes a las proteínas Nef y Gag (p17 y p24) por las siguientes razones: 1) durante la infección aguda, Nef es el blanco inmunodominante [92, 93, 165], aunque la respuesta luego se diversifica hacia otros epítopes virales incluyendo péptidos de la proteína Gag [95, 96, 99, 133, 166]; 2) altas frecuencias de LT CD8⁺ polifuncionales dirigidos contra Gag y Nef se asociaron con un menor *set-point* viral [167]; 3) las respuestas CD8⁺ Gag-específicas se asociaron a un mayor control viral en diferentes escenarios [95, 96, 99, 168], particularmente, la inmunodominancia anti-Gag a tiempos tempranos post-infección se asoció con una mejor actividad antiviral y con una progresión más lenta hacia la enfermedad [75]; 4) las respuestas Gag-específicas "expandibles" se asociaron con una mayor capacidad de mediar actividad antiviral y menores tasas de replicación viral residual en individuos *Elite Controllers* [162, 169]; 5) la expresión de la proteína Nef es detectable en PBMCs de individuos bajo cART, lo que conllevaría a una estimulación persistente de la respuesta Nef-específica en estos individuos [170] y 6) los LT CD4⁺ de individuos bajo tratamiento prolongado contienen secuencias provirales "defectivas" que son capaces de expresar la proteína Nef [171].

En primer lugar, en este trabajo quedó ilustrado el gran **impacto que posee el inicio temprano del cART** sobre distintos parámetros. Los sujetos del grupo TTe lograron, luego de un año de iniciado el cART, reconstituir de manera más eficiente la población de LT CD4⁺, independientemente de los elevados niveles de carga viral y activación inmune demostrados en la muestra basal (*Figuras 21 y 22*). Por su parte, los individuos del grupo TTa mostraron en la muestra pre-cART, niveles elevados de activación inmune principalmente en el compartimento CD4⁺, probablemente consecuencia de la prolongada estimulación antigénica que se traduciría en una peor recuperación clínica luego de un año de iniciado el cART [137]. Los beneficios del inicio temprano del cART ya fueron ampliamente estudiados y, estos resultados están en línea con lo reportado [86, 87, 134, 150].

Luego, se comprobó que, a pesar de que la respuesta pre-expansión fue muy baja y, en algunos casos hasta indetectable, esta pudo ser específica y significativamente expandida en ambos grupos de estudio (*Figura 24A*). Sin embargo, los sujetos TTa mostraron, en términos de **especificidad**, una distribución más pareja de la respuesta hacia los tres antígenos de HIV evaluados. En cambio, los sujetos del grupo TTe, mostraron una respuesta post-expansión más acotada y dirigida principalmente hacia Nef y p24 (*Figura 24B*). Esto podría deberse al hecho de que los individuos del grupo TTa estuvieron bajo estimulación antigénica durante períodos de tiempo más prolongados, lo que habría permitido que los LT CD8⁺ de estos sujetos desarrollaran un mayor espectro de reconocimiento a diferentes antígenos virales. Deng y col. demostraron que una respuesta T CD8⁺ más amplia, es decir, dirigida contra un mayor número de epítopes, sería favorable al momento de la eliminación de LT CD4⁺ infectados y reactivados [152].

La **polifuncionalidad** de la respuesta T fue postulada como un correlato de control viral en base a estudios donde se evaluó la capacidad de las células T CD8⁺ de degranular y secretar múltiples mediadores solubles luego de la estimulación entre individuos con rápida progresión hacia la enfermedad *versus* controladores a largo plazo [107, 167]. Más tarde, se demostró que la ausencia de células polifuncionales no se correlaciona necesariamente con una mayor progresión hacia la enfermedad [75]. Al contrario, la pérdida de la polifuncionalidad sería una consecuencia de la estimulación antigénica constante durante la infección crónica virémica, lo que conduciría en última instancia al agotamiento y disfunción celular [172, 173]. De todas maneras, la capacidad de los LT CD8⁺ de mediar funciones simultáneas frente a la estimulación antigénica continúa considerándose como una respuesta beneficiosa en distintos escenarios. Aquí, una proporción significativa de LT CD8⁺ expandidos mostró habilidad de mediar funciones diferentes y simultáneas (*Figuras 26 y 27*). En línea con esto, varios trabajos han

demostrado que, luego de la expansión de los LT CD8⁺ con péptidos específicos, se evidencia una significativa presencia de células polifuncionales [139, 162]. Particularmente, Ndhlovu y colaboradores [162] demostraron que, luego de expandir las células con un protocolo similar al empleado en esta tesis, los individuos *EC* poseían mayor frecuencia de células polifuncionales, comparado a un grupo de sujetos crónicamente infectados bajo tratamiento. A diferencia de Ndhlovu y col., aquí no se observaron diferencias entre los grupos bajo estudio, es decir, las células fueron igualmente polifuncionales post-expansión en el grupo TTA y TTe. Un aspecto a considerar al comparar estas observaciones, es el hecho que los grupos estudiados en este trabajo no son tan opuestos como lo son el grupo *EC* y de individuos crónicamente infectados bajo tratamiento. Entonces, diferencias más sutiles podrían existir entre los grupos TTA y TTe que no pudieron evidenciarse en este sistema experimental. Además, un estudio similar indicó que diferencias en el tiempo de inicio del cART no impactó significativamente sobre el perfil de polifuncionalidad de los LT CD8⁺ post-cART, aunque evaluado directamente *ex vivo* [114]. Por otro lado, en este trabajo se evaluó el perfil polifuncional a tiempos tempranos luego de la infección y antes de instaurar el cART. Se encontró que, a pesar de existir diferencias significativas en el perfil polifuncional en las muestras tomadas antes del cART y su respectiva muestra post-cART (post-expansión; *Figura 42*), la expansión logró revertir las diferencias observadas y equiparar la capacidad funcional en ambos grupos hacia un perfil mucho más polifuncional.

Los LT CD8⁺ atraviesan un proceso de diferenciación de células T_N hacia diferentes subpoblaciones de memoria y efectoras. Cada subpoblación se caracteriza por atributos particulares en cuanto a la capacidad de autorenovación, de proliferación y funcionalidad [90, 91]. Durante el curso natural de la infección por HIV, el **perfil de diferenciación de memoria de las células T CD8⁺** resulta severamente alterado, reflejando una diferenciación terminal inapropiada de las células efectoras [48, 112, 174]. Esta alteración ha sido asociada con una mayor tasa de progresión a la enfermedad [112, 175], y el tratamiento efectivo no lograría restaurar completamente este aspecto [163]. En este trabajo, la diferenciación del perfil de memoria fue evaluada en los LT CD8⁺ luego de la expansión *in vitro*, es decir, en condiciones de intensa estimulación antigénica e intensa señal de proliferación impulsada por la citoquina IL-2. Bajo estas condiciones, cabía esperar que los LT CD8⁺ se diferenciaron hacia un perfil de memoria efector terminal. Sin embargo, esto no se vio reflejado de igual manera en los dos grupos incluidos en el estudio: los individuos TTe presentaron proporciones aumentadas de células T_{SCM} y T_{MC} CD8⁺ luego de la estimulación en los tres compartimentos evaluados (LT CD8⁺ totales, LT CD8⁺ HIV-específicos y LT CD8⁺

PD-1⁺; Figuras 28, 29 y 31). Inicialmente, esto podría considerarse como una característica ventajosa, ya que estos individuos lograron una preservación de células menos diferenciadas con capacidades de proliferación y autorenovación conservadas. Sin embargo, como se discutirá más adelante, este aspecto se correlacionó de manera inversa con la capacidad de mediar función antiviral. Los LT_{SCM} CD8⁺ han sido descritos como una subpoblación de células que ha experimentado un encuentro con el antígeno pero que retiene la expresión de un núcleo de genes que son expresados por las células T_N. Además, presentan una capacidad de proliferación homeostática superior, logran persistir mayores períodos de tiempo, y lo que resulta más interesante en el contexto de la implementación de terapias de remisión virológica, son capaces de repoblar completamente la ruta de diferenciación de memoria [90, 91]. Recientemente, se reportó que los individuos HIV⁺ que reciben cART tienen mayores proporciones de células CD8⁺ T_{SCM} y que, incluso, su frecuencia aumenta a medida que se extiende el tiempo de tratamiento [176]. En línea con esto, al evaluar la muestra basal en los individuos del grupo TTe se observó una mayor representación de células con un perfil menos diferenciado (LT_N, LT_{SCM} y LT_{MC} CD8⁺) comparado a la muestras basal del grupo TTa (Figuras 43, 44 y 46). Esto podría explicar que en el grupo TTe se observaran mayores proporciones de LT_{SCM} CD8⁺ luego de la expansión, principalmente al tener en cuenta que ambos grupos (TTa y TTe) poseían una mediana de tiempo bajo tratamiento similar al momento de la toma de muestra post-cART. Incluso, se observó que la proporción de LT_{SCM} CD8⁺ en las muestras obtenidas antes del cART (muestras basales y pre-cART) se correlacionó positivamente con la presencia de LT CD8⁺ pentafuncionales en la muestra post-cART luego de la expansión (Figuras 50A y 51A). En el caso de regímenes que implican la transferencia adoptiva de células T, estrategias ya exploradas para el tratamiento del cáncer e infecciones virales [71-73], se ha descrito que la respuesta se ve afectada por la diferenciación de los LT CD8⁺: aunque las células de memoria efectora están en un estadio de completa diferenciación funcional, su menor capacidad proliferativa compromete el éxito de la terapéutica. Es decir que, en un modelo ideal, sería óptimo conservar un perfil de memoria con menor diferenciación que, a su vez, fuese capaz de originar LT CD8⁺ efectores rápidamente frente a la re-estimulación antigénica. Por ello, se están evaluando diferentes estrategias que logren limitar la diferenciación del fenotipo de memoria *ex vivo* pero reteniendo la diferenciación funcional de las células efectoras terminales [177]. El mismo razonamiento podría aplicarse en este contexto: los sujetos TTe poseen la ventaja de preservar subpoblaciones de LT_{SCM}, pero deberían explorarse estrategias que logren potenciar el desarrollo rápido de actividad antiviral. Por otro lado, se observó que en la muestra pre-cART la capacidad de lograr una diferenciación hacia un fenotipo terminal (es decir mayor proporción de LT_{ET} CD8⁺ y menor proporción

de T_{ME}) se correlacionó positivamente tanto con el recuento de LT CD4⁺ como con la relación CD4/CD8 observados al año de haber iniciado el cART (*Figuras 48 y 49*). Ya se ha descrito que, durante el transcurso de la infección, los LT CD8⁺ tienden a perder la capacidad de diferenciarse hacia un fenotipo terminal. Este fenómeno fue descrito como un bloqueo en la diferenciación terminal del compartimento celular HIV-específico durante la infección crónica [144] y fue posteriormente confirmado en otros estadios como en la infección aguda [48, 178, 179]. El análisis de correlaciones realizado en este trabajo aportó más evidencia a este fenómeno ya que la relación T_{ME}/(T_{ME}+T_{ET}) de los LT CD8⁺ evaluados en la muestra pre-cART se correlacionó inversamente con el recuento de LT CD4⁺ y con la relación CD4/CD8 post-cART (*Figura 48 y 49*). Estos resultados, podrían explicar por qué los individuos del grupo T_{Ta} no logran un mejor *status* clínico al año de haber iniciado el cART (*Figura 20B y C*). Además, junto a datos reportados previamente en otras cohortes [175, 180], indican claramente que el deterioro temprano en las vías de diferenciación de las células T CD8⁺ se asocia con una mayor progresión a la enfermedad, incluso desde tiempos muy tempranos post-infección, y que no puede ser completamente revertido por el cART.

En un siguiente paso, se investigó la **expresión de PD-1** luego de la expansión *in vitro* de los LT CD8⁺. La molécula PD-1 es un co-receptor inhibitorio que está involucrado en la regulación del umbral de respuestas antigénicas de células T y B. Ejerce funciones moduladoras únicas, que dependen no sólo de su presencia/ausencia, sino también de su nivel de expresión en la superficie celular [181, 182]. En modelos de infecciones virales crónicas, se encontró una expresión extremadamente alta y persistente de PD-1 en células T. Este fenotipo PD-1^{high} se ha asociado con un estado de agotamiento celular, incluso en la infección por HIV [112, 144, 145, 181, 183, 184]. En este estudio, la expresión de PD-1 en los LT CD8⁺ post-expansión fue baja al compararse con otros reportes que miden la expresión de PD-1 pero directamente *ex vivo* (*Figura 30*). Esto podría ser el resultado de una modulación negativa del receptor durante la expansión o de la muerte selectiva de las células PD-1⁺. La última opción está en consonancia con la noción que las células PD-1⁺ muestran una menor actividad de telomerasa y acortamiento telomérico, lo que las hace susceptible a la muerte celular [185, 186]. La expresión de PD-1 en células expandidas estuvo concentrada en el compartimento de LT CD8⁺ HIV-específicos, particularmente dentro de los LT_{ME} CD8⁺ (*Figuras 30, 32 y 33*). Sorprendentemente, se encontraron correlaciones positivas entre la expresión de PD-1 en los LT CD8⁺ HIV-específicos expandidos y su nivel de polifuncionalidad (*Figura 41*). Esto coincide con datos provistos por Hokey y col., quienes encontraron una alta expresión de PD-1 en células activadas con un perfil T_{ME}, lo que sugiere que PD-1 podría jugar un rol co-estimulador sobre

ciertas subpoblaciones de LT CD8⁺ [187]. Más aún, un estudio reciente demostró que las células CD8⁺ tumor-específicas que persisten luego de la transferencia adoptiva de linfocitos son mayormente polifuncionales y expresan simultáneamente altos niveles de PD-1 [188]. Por otro lado, se observó una mayor expresión de PD-1 en la muestra pre-cART del grupo TTa comparado con las muestras basales de ambos grupos (*Figura 45*). Esto coincide con el hecho que la muestra pre-cART del grupo TTa estuvo sometida durante mayor tiempo a la estimulación antigénica. Más aún, se observó que mayores niveles de expresión de PD-1 pre-cART impactaron negativamente, tanto sobre el recuento de CD4⁺ como en la relación CD4/CD8 evaluado al año post-cART (*Figuras 48D y 49D*). Además, muy recientemente nuestro grupo demostró que una elevada expresión de PD-1 en LT CD8⁺ antes de instaurado el cART se correlaciona con un reservorio viral de mayor tamaño luego de un año de iniciado el cART [189]. Es decir, que la expresión de PD-1 evaluada antes de iniciado el cART podría permitir predecir diferentes aspectos virológicos e inmunológicos post-cART. En conjunto, todos estos resultados están en concordancia con reportes que sugieren que PD-1 tendría un rol dual en el transcurso de la infección, actuando como marcador de activación celular durante la infección aguda y como marcador de agotamiento durante la etapa crónica de la infección [181, 190]. Así, en el contexto de la re-estimulación antigénica en individuos bajo cART, la elevada expresión de PD-1 en LT_{ME} y LT_{ET} podría implicar que esta molécula estaría actuando como marcador de activación, simulando lo que sucedería durante la infección aguda. Esto, a su vez, permitiría explicar la correlación directa observada entre la proporción de LT_{ME} CD8⁺ PD-1⁺ HIV-específicos *versus* la capacidad de los LT CD8⁺ de mediar polifuncionalidad y actividad antiviral post-cART (VITAL) (*Figura 41*). Estos datos resaltan el hecho de que el rol de la molécula PD-1 en el contexto de la reactivación viral necesita ser estudiado con más profundidad. Diversos estudios han demostrado los beneficios que surgen de la inhibición de la señalización de PD-1/PD-1 Ligando, al momento de la estimulación de los LT CD8⁺ [185, 191]. Se cree que, en futuros esquemas terapéuticos, se lograrían resultados óptimos al incluir no solo moléculas que modulen las señales inhibitorias si no terapias combinadas que también estimulen la respuesta inmune específica [68, 192].

La habilidad de los LT CD8⁺ de eliminar células infectadas depende de múltiples factores y puede ocurrir por distintos mecanismos, como ser a través de mediadores solubles (mecanismos no citolíticos) o por mecanismos citolíticos. Entonces, para evaluar el posible impacto de la polifuncionalidad y el fenotipo de los LT CD8⁺ analizados en la muestra post-cART y post-expansión sobre la **capacidad de mediar actividad antiviral** en nuestro modelo, se usaron dos ensayos diferentes. Por un lado, se empleó el

ensayo de inhibición viral o VIA, que provee una medición global del potencial antiviral de los LT CD8⁺ mediado tanto por mecanismos citolíticos como no citolíticos [127], y nos permitió evaluar la inhibición de la replicación de cuatro cepas virales diferentes. Aunque aporta una imagen global de la respuesta antiviral, no permite discriminar si la citotoxicidad juega un rol antiviral importante en este modelo de expansión. Para evaluar específicamente esto, se implementó en paralelo, el ensayo VITAL desarrollado por Herman y col. [128]. Este método es una técnica versátil que permite evaluar particularmente la citotoxicidad directa, siendo necesario el contacto directo entre las células efectoras y las células *target*. Se consideró relevante discriminar estos dos mecanismos ya que, en un contexto de reactivación de la replicación viral durante la implementación estrategias de cura y/o remisión virológica, sería preferible la estimulación de la capacidad de reconocer y eliminar rápidamente células infectadas reactivadas de manera eficiente frente al desarrollo de mecanismos no citolíticos de inhibición viral [193]. De esta manera, estos experimentos aportan información complementaria, permitiendo una caracterización más profunda de la respuesta inmune antiviral. Los resultados mostraron que, tanto los LT CD8⁺ Nef-específicos como los p24-específicos expandidos a partir de las muestras post-cART de ambos grupos de individuos, fueron capaces de mediar VIA contra el amplio repertorio de virus ensayados que incluyeron cepas virales de relevancia clínica (*Figura 35*). Las células HIV-específicas del grupo TTe mostraron una tendencia hacia una mayor capacidad de ejercer VIA que las del grupo TTe, pero la diferencia fue significativa sólo cuando se analizó la respuesta p24-específica. La magnitud del ensayo VIA se correlacionó con el nivel de diferenciación de los LT CD8⁺ post-cART post-expansión ya que se encontraron correlaciones inversas con las proporciones de LT_{SCM} y LT_{MC} CD8⁺ y directa con la proporción de LT_{ET} CD8⁺, demostrando la necesidad de desarrollar una diferenciación completa para lograr mediar VIA con mayor magnitud (*Figura 38*). En un trabajo previo de nuestro grupo se demostró que una mayor diferenciación hacia un perfil de memoria terminal se relaciona con una mayor actividad antiviral evaluada directamente *ex vivo* en individuos sin tratamiento [112]. Aquí, esta asociación se mantuvo incluso en individuos bajo cART y luego de la expansión de los LT CD8⁺, lo que es consistente con reportes que probaron que las células de memoria diferenciadas son eficientes en el control de nuevas infecciones virales debido a que están dotadas de funciones efectoras inmediatas [87, 194]. Al evaluar la magnitud del ensayo VITAL, no se encontraron diferencias entre los grupos. La magnitud del VITAL se correlacionó de manera directa con una mayor proporción de LT_{ET} CD8⁺ HIV-específicos, y con la proporción de LT CD8⁺ capaces de degranular y secretar IFN- γ , TNF- α , y MIP-1 β , ya sea como funciones únicas o en combinación con otras funciones (*Figuras 39 y 40*). En línea con esto, se ha reportado que la

expresión en superficie de CD107A/B, como función única o acompañada por la secreción de IFN- γ , se asoció con la capacidad de los LT CD8⁺ antígeno-específicos de eliminar células infectadas, aunque esto demostrado por ensayos de tipo VIA [75, 195-199]. Por otro lado, la producción de MIP-1 β se ha asociado con una mayor magnitud de VIA ya que interfiere con la infección al bloquear la unión al co-receptor CCR5 [195]. En nuestro modelo, no se encontraron diferencias entre grupos en el porcentaje total de LT CD8⁺ productores de MIP-1 β , lo que es consistente con la falta de diferencia en la magnitud del ensayo de VIA entre ambos grupos. A la fecha, ningún reporte asoció la capacidad de mediar VITAL con el nivel de degranulación de los LT CD8⁺ HIV-específicos luego de la expansión, lo que representa un nuevo aporte en este trabajo. Cabe destacar que, la mayoría de las correlaciones encontradas para el ensayo VITAL estuvieron condicionadas mayormente por los resultados obtenidos para las respuestas Nef-específicas. Más aún, fue evidente que las células Nef-específicas mostraron una tendencia hacia una mayor capacidad de mediar citotoxicidad directa. Dado que la expresión de los ARNm virales aumenta dentro de la hora post-estimulación de LT CD4⁺ de los individuos bajo cART y que hay generación de progenie luego de 6 horas, los LT CD8⁺ que sean capaces de reconocer específicamente productos virales tempranos, como la proteína Nef, serían muy beneficiosos a la hora de implementar estrategias de remisión virológica. Estas células podrían eliminar efectivamente células infectadas reactivadas justo antes de que se produzca la diseminación viral y la modulación negativa del complejo mayor de histocompatibilidad en la superficie celular, lo que imposibilitaría su reconocimiento [164]. Es más, un trabajo publicado recientemente demostró que, en individuos tratados, la expresión continua de la proteína Nef está asociada al mantenimiento de LT CD8⁺ Nef-específicos circulantes [88]. Entonces, el conjunto de estos resultados resaltan la importancia de esta proteína como blanco contra el cual dirigir la respuesta inmune en estrategias de cura, remisión y también en formulaciones vacunales.

Por último, se estudió la existencia de posibles relaciones entre los parámetros evaluados antes de iniciado el cART y la capacidad de mediar actividad antiviral post-cART, de manera de plantear **posibles predictores tempranos de la funcionalidad inmune**. Se encontró que, mayores proporciones de LT_{ME} CD8⁺ HIV-específicos tanto en las muestras basales como en las muestras pre-cART y mayor proporción LT_{ME} CD8⁺PD-1⁺ pre-cART se correlacionaron de manera directa con la capacidad de mediar VIA post-cART post-expansión (*Figuras 50 y 51*). En línea con esto, también se encontraron correlaciones positivas entre la preservación de subpoblaciones con menor diferenciación (LT_N y LT_{MC} CD8⁺ totales) en las muestras pre-cART y mayor capacidad de mediar VIA. Finalmente, y como ya fue reportado por

nuestro grupo pero en un modelo *ex vivo* y utilizando muestras de individuos sin tratamiento, el nivel de activación inmune en las muestras basales y pre-cART se correlacionó de manera inversa con la capacidad de los LT CD8⁺ de mediar inhibición viral post-cART (VIA y VITAL) [200]. Esto indicaría que, lograr reducir los niveles de activación inmune a tiempos tempranos post-infección repercutiría fuertemente en la capacidad antiviral de las células que persisten luego de iniciado el cART.

Entre las **limitaciones** de este trabajo podemos nombrar: i) el empleo de un protocolo de estimulación prolongada y potente podría estar enmascarando diferencias sutiles entre los grupos estudiados, por ejemplo, como consecuencia de la muerte celular de ciertas subpoblaciones celulares y la supervivencia de otras comunes a ambos grupos; por lo tanto, no podemos excluir la posibilidad de que con protocolos de expansión alternativos (como mediante el uso de IL-7 o IL-15) puedan surgir diferencias intergrupos; ii) identificar las células HIV-específicas mediante la combinación de moléculas marcadas con el mismo fluorocromo lleva a la subestimación de la respuesta específica, que podría estar siendo evaluada erróneamente como parte del compartimento de células totales; iii) no se evaluó la producción de perforinas y granzimas, componentes claves en la función antiviral de los LT CD8⁺, y por lo tanto no se tuvieron en cuenta para describir la calidad de las células CD8⁺; iv) el grupo TTe está constituido por individuos muy heterogéneos, lo que dificulta el análisis e interpretación de los datos; v) algunos de los individuos del grupo TTe podrían haber iniciado tratamiento incluso luego de la seroconversión, por lo que no representan individuos tratados tan tempranamente como lo son aquellos definidos en otras cohortes que incluyen individuos identificados durante los estadios de *Fiebig I y II* [87]. Este último aspecto podría interpretarse como una ventaja en términos de la potencial aplicación de los resultados a la práctica diaria. La identificación de un individuo con infección aguda en estadios de *Fiebig I a III* es extremadamente inusual. Por el contrario, el diagnóstico durante la fase aguda ocurre, generalmente, cuando los sujetos se encuentran cursando las etapas tardías de *Fiebig* (*Fiebig IV a VI*). Por lo tanto, el escenario planteado en esta tesis representaría de manera más fidedigna lo que sucede en un contexto real.

Los datos presentados en esta tesis remarcan la importancia de la caracterización funcional de los LT CD8⁺ que persisten una vez iniciado el cART. Su estudio exhaustivo permitirá, al momento de la implementación de terapias de cura y/o remisión virológica, enfrentar estos desafíos con un conocimiento profundo de las características funcionales óptimas o deletéreas de la respuesta inmune existentes y que necesiten ser subsanadas.

VI. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

“La ciencia nunca resuelve un problema sin crear otros 10 más”

George Bernard Shaw

En este trabajo, se evaluó exhaustivamente la calidad de los LT CD8⁺ obtenidos post-expansión *in vitro* a partir de muestras de individuos HIV⁺ que iniciaron tratamiento de manera temprana o tardía luego de la infección aguda, aportando resultados relevantes a considerar en el diseño y evaluación de estrategias que pretendan lograr la remisión virológica sostenida y que dependan, entre otras cosas, de la capacidad de los LT CD8⁺ de mediar citotoxicidad. Asimismo, se encontraron posibles biomarcadores que podrían ser empleados como predictores de la respuesta T CD8⁺ HIV-específica que se montaría en un contexto de reactivación viral. A pesar de la baja frecuencia de LT CD8⁺ HIV-específicos encontrada en individuos bajo cART, fue posible expandir estas células *in vitro* y, más aún, fueron capaces de mediar funciones antivirales. Se observaron diferencias cualitativas menores en las respuestas de los LT CD8⁺ expandidos entre ambos grupos estudiados, en su mayoría relacionadas al perfil de diferenciación de memoria. Por lo tanto, el inicio del tratamiento antes del *set-point* viral no representó un beneficio importante en términos de calidad de la respuesta post-expansión, en nuestro modelo. En otras palabras, el hecho de haber iniciado el cART durante la etapa crónica de la infección no representaría un obstáculo al momento de incluir estos individuos como candidatos a somerterse a terapias de remisión virológica.

Aunque demostramos aquí que la expansión *in vitro* tiene como resultado una respuesta antiviral funcional, todavía queda dilucidar si este tipo de respuestas (con la especificidad y funcionalidad adecuadas) pueden obtenerse *in vivo* (mediante vacunación terapéutica, por ejemplo) o si una estrategia de transferencia adoptiva de linfocitos T sería la mejor opción para alcanzar la remisión virológica sostenida en la infección por HIV. Además, debería considerarse la inclusión de inmunomoduladores (dirigidos contra *checkpoints* inmunes y/o agonistas de vías estimuladoras) para superar el daño inmune intrínseco causado por la infección en cada sujeto en particular, lo que llevaría al desarrollo de regímenes terapéuticos "hechos a medida" o personalizados para cada sujeto. Por lo tanto, y a modo de perspectiva, quedan sentadas las bases para plantear estudios que busquen determinar el impacto de incluir inmunomoduladores durante el proceso de expansión *in vitro* y así lograr, en cada sujeto particular, potenciar la respuesta antiviral observada. En este sentido, resultados preliminares de nuestro grupo indican que ciertas características de las células expandidas según nuestro modelo, se relacionan con el tamaño del reservorio al año post-cART: mayores proporciones de LT CD8⁺ capaces de mediar múltiples funciones y con un fenotipo efector se relacionaron con un tamaño menor del reservorio. Estos resultados proveerán información importante para diseñar racionalmente y/o evaluar futuras estrategias para

modular no solo la respuesta de células T anti-HIV si no también respuestas inmunes dirigidas contra otros patógenos persistentes.

VII. REFERENCIAS

“El conocimiento es el único bien que más crece cuanto más se comparte”

-

Refrán popular

1. Barre-Sinoussi, F., et al., *Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS)*. Science, 1983. **220**(4599): p. 868-71.
2. Gallo, R.C., et al., *Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS*. Science, 1984. **224**(4648): p. 500-3.
3. Gallo, R.C., et al., *Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS)*. Science, 1983. **220**(4599): p. 865-7.
4. Levy, J.A., et al., *Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San Francisco patients with AIDS*. Science, 1984. **225**(4664): p. 840-2.
5. Ratner, L., R.C. Gallo, and F. Wong-Staal, *HTLV-III, LAV, ARV are variants of same AIDS virus*. Nature, 1985. **313**(6004): p. 636-7.
6. Clavel, F., et al., *Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS*. Science, 1986. **233**(4761): p. 343-6.
7. Kong, L.I., et al., *West African HIV-2-related human retrovirus with attenuated cytopathicity*. Science, 1988. **240**(4858): p. 1525-9.
8. ONUSIDA, *UNAIDS report on the global AIDS epidemic 2018*. 2018.
9. Broder, S., *The development of antiretroviral therapy and its impact on the HIV-1/AIDS pandemic*. Antiviral Res, 2010. **85**(1): p. 1-18.
10. Arts, E.J. and D.J. Hazuda, *HIV-1 antiretroviral drug therapy*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2012. **2**(4): p. a007161.
11. Passaes, C.P. and A. Saez-Cirion, *HIV cure research: advances and prospects*. Virology, 2014. **454-455**: p. 340-52.
12. Castro-Gonzalez, S., M. Colomer-Lluch, and R. Serra-Moreno, *Barriers for a HIV cure: the latent reservoir*. AIDS Res Hum Retroviruses, 2018.
13. ONUSIDA, *UNAIDS DATA 2017*. 2017.
14. SIDA., P.N.d., *Boletín n° 34 sobre el VIH, SIDA e ITS en Argentina*. 2017.
15. Plantier, J.C., et al., *A new human immunodeficiency virus derived from gorillas*. Nat Med, 2009. **15**(8): p. 871-2.
16. Alessandri-Gradt, E., et al., *HIV-1 group P infection: towards a dead-end infection?* AIDS, 2018. **32**(10): p. 1317-1322.
17. Laboratory, L.A.N., *HIV Circulating Recombinant Forms (CRFs)*. 2018: <https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/CRFs/CRFs.html>.
18. Hemelaar, J., *The origin and diversity of the HIV-1 pandemic*. Trends Mol Med, 2012. **18**(3): p. 182-92.
19. Hemelaar, J., et al., *Global trends in molecular epidemiology of HIV-1 during 2000-2007*. AIDS, 2011. **25**(5): p. 679-89.
20. Maartens, G., C. Celum, and S.R. Lewin, *HIV infection: epidemiology, pathogenesis, treatment, and prevention*. Lancet, 2014. **384**(9939): p. 258-71.
21. Graf, T. and A.R. Pinto, *The increasing prevalence of HIV-1 subtype C in Southern Brazil and its dispersion through the continent*. Virology. **435**(1): p. 170-8.

-
22. Almeida, S.E., et al., *Temporal dynamics of HIV-1 circulating subtypes in distinct exposure categories in southern Brazil*. *Virology*, 2006. **9**: p. 306.
 23. Marquina, S., et al., *Coexistence of subtypes B, F, and as B/F env recombinant of HIV type 1 in Buenos Aires Argentina*. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 1996. **12**(17): p. 1651-4.
 24. Campodonico, M., et al., *HIV type 1 subtypes in Argentina and genetic heterogeneity of the V3 region*. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 1996. **12**(1): p. 79-81.
 25. Carr, J.K., et al., *Diverse BF recombinants have spread widely since the introduction of HIV-1 into South America*. *Aids*, 2001. **15**(15): p. F41-7.
 26. Quarleri, J.F., et al., *HIV type 1 BF recombinant strains exhibit different pol gene mosaic patterns: descriptive analysis from 284 patients under treatment failure*. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 2004. **20**(10): p. 1100-7.
 27. Dileria, D., et al., *HIV-1 Genetic Diversity Surveillance among Newly Diagnosed Individuals in Buenos Aires, Argentina*. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 2007. **23**(10): p. 1201-7.
 28. Gomez-Carrillo, M., et al., *Analysis of HIV type 1 diversity in pregnant women from four Latin American and Caribbean countries*. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 2006. **22**(11): p. 1186-91.
 29. Rubio, A.E., et al., *Similar replicative fitness is shared by the subtype B and unique BF recombinant HIV-1 isolates that dominate the epidemic in Argentina*. *PLoS One*, 2014. **9**(4): p. e92084.
 30. Bello, G., et al., *Phylogenetics of HIV-1 circulating recombinant forms 12_BF and 38_BF in Argentina and Uruguay*. *Retrovirology*, 2010. **7**: p. 22.
 31. Fernandez, M.F., et al., *Short communication: Emergence of novel A/G recombinant HIV-1 strains in Argentina*. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 2015. **31**(3): p. 293-7.
 32. Coffin, J.M., S.H. Hughes, and H.E. Varmus, *The Interactions of Retroviruses and their Hosts*, in *Retroviruses*, J.M. Coffin, S.H. Hughes, and H.E. Varmus, Editors. 1997: Cold Spring Harbor (NY).
 33. Flint, S.J., et al., *Principles of Virology: Molecular Biology, Pathogenesis and Control*. 2004, Washington, D. C. : ASM Press.
 34. Hoffmann, C.R., JK and Kamps BS, *HIV Medicine 2007*. 2007, www.HIVMedicine.com: Flying Publisher.
 35. Simon, V., D.D. Ho, and Q. Abdool Karim, *HIV/AIDS epidemiology, pathogenesis, prevention, and treatment*. *Lancet*, 2006. **368**(9534): p. 489-504.
 36. Peterlin, B.M. and D. Trono, *Hide, shield and strike back: how HIV-infected cells avoid immune eradication*. *Nat Rev Immunol*, 2003. **3**(2): p. 97-107.
 37. Lever, A.M. and K.T. Jeang, *Replication of human immunodeficiency virus type 1 from entry to exit*. *Int J Hematol*, 2006. **84**(1): p. 23-30.
 38. Choe, H., et al., *The beta-chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates*. *Cell*, 1996. **85**(7): p. 1135-48.
 39. Deng, H., et al., *Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1*. *Nature*, 1996. **381**(6584): p. 661-6.
 40. Dragic, T., et al., *HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5*. *Nature*, 1996. **381**(6584): p. 667-73.
-

-
41. Lusic, M. and R.F. Siliciano, *Nuclear landscape of HIV-1 infection and integration*. Nat Rev Microbiol, 2017. **15**(2): p. 69-82.
 42. Chen, L., O.T. Keppler, and C. Scholz, *Post-translational Modification-Based Regulation of HIV Replication*. Front Microbiol, 2018. **9**: p. 2131.
 43. Paiardini, M., et al., *Mucosal immune dysfunction in AIDS pathogenesis*. AIDS Rev, 2008. **10**(1): p. 36-46.
 44. Cunningham, A.L., A.N. Harman, and N. Nasr, *Initial HIV mucosal infection and dendritic cells*. EMBO Mol Med, 2013. **5**(5): p. 658-60.
 45. Harman, A.N., et al., *Tissue dendritic cells as portals for HIV entry*. Rev Med Virol, 2013. **23**(5): p. 319-33.
 46. Miller, C.J., et al., *Propagation and dissemination of infection after vaginal transmission of simian immunodeficiency virus*. J Virol, 2005. **79**(14): p. 9217-27.
 47. Cohen, M.S., J.A. Anderson, and R. Swanstrom, *Acute HIV Infection: Implications for HIV Spread, Disease Progression, and Vaccine Development*, in *HIV Molecular Immunology*, C.B. Bette T. M. Korber, Barton F. Haynes, Richard Koup, John P. Moore, Bruce D. Walker, and David I. Watkins., Editor. 2005, Los Alamos National Laboratory, Theoretical Biology and Biophysics: Los Alamos, New Mexico. p. 21-31.
 48. Addo, M.M., et al., *Fully differentiated HIV-1 specific CD8+ T effector cells are more frequently detectable in controlled than in progressive HIV-1 infection*. PLoS One, 2007. **2**(3): p. e321.
 49. Cooper, A., et al., *HIV-1 causes CD4 cell death through DNA-dependent protein kinase during viral integration*. Nature, 2013. **498**(7454): p. 376-9.
 50. Mehandru, S., et al., *Mechanisms of gastrointestinal CD4+ T-cell depletion during acute and early human immunodeficiency virus type 1 infection*. J Virol, 2007. **81**(2): p. 599-612.
 51. Brenchley, J.M., D.A. Price, and D.C. Douek, *HIV disease: fallout from a mucosal catastrophe?* Nat Immunol, 2006. **7**(3): p. 235-9.
 52. May, M.T., et al., *Impact on life expectancy of HIV-1 positive individuals of CD4+ cell count and viral load response to antiretroviral therapy*. AIDS, 2014. **28**(8): p. 1193-202.
 53. Perreau, M., Y. Levy, and G. Pantaleo, *Immune response to HIV*. Curr Opin HIV AIDS, 2013. **8**(4): p. 333-40.
 54. Deeks, S.G., *HIV infection, inflammation, immunosenescence, and aging*. Annu Rev Med, 2011. **62**: p. 141-55.
 55. van Marle, G., et al., *Combating the HIV reservoirs*. Biotechnol Genet Eng Rev, 2018. **34**(1): p. 76-89.
 56. Kulpa, D.A. and N. Chomont, *HIV persistence in the setting of antiretroviral therapy: when, where and how does HIV hide?* J Virus Erad, 2015. **1**(2): p. 59-66.
 57. Deeks, S.G., S.R. Lewin, and D.V. Havlir, *The end of AIDS: HIV infection as a chronic disease*. Lancet, 2013. **382**(9903): p. 1525-33.
 58. McGettrick, P., E.A. Barco, and P.W.G. Mallon, *Ageing with HIV*. Healthcare (Basel), 2018. **6**(1).
 59. Chawla, A., et al., *A Review of Long-Term Toxicity of Antiretroviral Treatment Regimens and Implications for an Aging Population*. Infect Dis Ther, 2018.
-

-
60. Moir, S., T.W. Chun, and A.S. Fauci, *Pathogenic mechanisms of HIV disease*. *Annu Rev Pathol*, 2011. **6**: p. 223-48.
 61. Krebs, S.J. and J. Ananworanich, *Immune activation during acute HIV infection and the impact of early antiretroviral therapy*. *Curr Opin HIV AIDS*, 2016. **11**(2): p. 163-72.
 62. Hileman, C.O. and N.T. Funderburg, *Inflammation, Immune Activation, and Antiretroviral Therapy in HIV*. *Curr HIV/AIDS Rep*, 2017. **14**(3): p. 93-100.
 63. Sengupta, S. and R.F. Siliciano, *Targeting the Latent Reservoir for HIV-1*. *Immunity*, 2018. **48**(5): p. 872-895.
 64. Hutter, G., et al., *Long-term control of HIV by CCR5 Delta32/Delta32 stem-cell transplantation*. *N Engl J Med*, 2009. **360**(7): p. 692-8.
 65. Rodriguez-Munoz, J. and S. Moreno, *Strategies for the cure of HIV infection*. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 2018.
 66. Perreau, M., R. Banga, and G. Pantaleo, *Targeted Immune Interventions for an HIV-1 Cure*. *Trends Mol Med*, 2017. **23**(10): p. 945-961.
 67. Deeks, S.G., et al., *International AIDS Society global scientific strategy: towards an HIV cure 2016*. *Nat Med*, 2016. **22**(8): p. 839-50.
 68. Pitman, M.C., et al., *Barriers and strategies to achieve a cure for HIV*. *Lancet HIV*, 2018. **5**(6): p. e317-e328.
 69. Thorlund, K., et al., *Landscape review of current HIV 'kick and kill' cure research - some kicking, not enough killing*. *BMC Infect Dis*, 2017. **17**(1): p. 595.
 70. Deeks, S.G., *HIV: Shock and kill*. *Nature*, 2012. **487**(7408): p. 439-40.
 71. Houot, R., et al., *T-cell-based Immunotherapy: Adoptive Cell Transfer and Checkpoint Inhibition*. *Cancer Immunol Res*, 2015. **3**(10): p. 1115-22.
 72. Roddie, C. and K.S. Peggs, *Immunotherapy for transplantation-associated viral infections*. *J Clin Invest*, 2017. **127**(7): p. 2513-2522.
 73. Hammerl, D., et al., *Adoptive T Cell Therapy: New Avenues Leading to Safe Targets and Powerful Allies*. *Trends Immunol*, 2018. **39**(11): p. 921-936.
 74. Jones, R.B. and B.D. Walker, *HIV-specific CD8(+) T cells and HIV eradication*. *J Clin Invest*, 2016. **126**(2): p. 455-63.
 75. Turk, G., et al., *Early Gag immunodominance of the HIV-specific T-cell response during acute/early infection is associated with higher CD8+ T-cell antiviral activity and correlates with preservation of the CD4+ T-cell compartment*. *J Virol*, 2013. **87**(13): p. 7445-62.
 76. McBrien, J.B., N.A. Kumar, and G. Silvestri, *Mechanisms of CD8(+) T cell-mediated suppression of HIV/SIV replication*. *Eur J Immunol*, 2018. **48**(6): p. 898-914.
 77. Casazza, J.P., et al., *Decay kinetics of human immunodeficiency virus-specific CD8+ T cells in peripheral blood after initiation of highly active antiretroviral therapy*. *J Virol*, 2001. **75**(14): p. 6508-16.
 78. Conrad, J.A., et al., *Antiretroviral therapy reduces the magnitude and T cell receptor repertoire diversity of HIV-specific T cell responses without changing T cell clonotype dominance*. *J Virol*, 2012. **86**(8): p. 4213-21.
-

-
79. Weekes, M.P., et al., *Large HIV-specific CD8 cytotoxic T-lymphocyte (CTL) clones reduce their overall size but maintain high frequencies of memory CTL following highly active antiretroviral therapy*. Immunology, 2006. **118**(1): p. 25-38.
 80. Rehr, M., et al., *Emergence of polyfunctional CD8+ T cells after prolonged suppression of human immunodeficiency virus replication by antiretroviral therapy*. J Virol, 2008. **82**(7): p. 3391-404.
 81. Lam, S., et al., *Broadly-specific cytotoxic T cells targeting multiple HIV antigens are expanded from HIV+ patients: implications for immunotherapy*. Mol Ther, 2015. **23**(2): p. 387-95.
 82. Cartwright, E.K., et al., *CD8(+) Lymphocytes Are Required for Maintaining Viral Suppression in SIV-Infected Macaques Treated with Short-Term Antiretroviral Therapy*. Immunity, 2016. **45**(3): p. 656-668.
 83. McIlroy, D., *Do HIV-specific CTL continue to have an antiviral function during antiretroviral therapy? If not, why not, and what can be done about it?* Front Immunol, 2013. **4**: p. 52.
 84. Siliciano, J.D. and R.F. Siliciano, *Recent developments in the effort to cure HIV infection: going beyond N = 1*. J Clin Invest, 2016. **126**(2): p. 409-14.
 85. Trautmann, L., *Kill: boosting HIV-specific immune responses*. Curr Opin HIV AIDS, 2016. **11**(4): p. 409-16.
 86. Buzon, M.J., et al., *Long-term antiretroviral treatment initiated at primary HIV-1 infection affects the size, composition, and decay kinetics of the reservoir of HIV-1-infected CD4 T cells*. J Virol, 2014. **88**(17): p. 10056-65.
 87. Takata, H., et al., *Delayed differentiation of potent effector CD8(+) T cells reducing viremia and reservoir seeding in acute HIV infection*. Sci Transl Med, 2017. **9**(377).
 88. Thomas, A.S., et al., *T-cell responses targeting HIV Nef uniquely correlate with infected cell frequencies after long-term antiretroviral therapy*. PLoS Pathog, 2017. **13**(9): p. e1006629.
 89. Yue, F.Y., et al., *HIV-Specific Granzyme B-Secreting but Not Gamma Interferon-Secreting T Cells Are Associated with Reduced Viral Reservoirs in Early HIV Infection*. J Virol, 2017. **91**(8).
 90. Mahnke, Y.D., et al., *The who's who of T-cell differentiation: human memory T-cell subsets*. Eur J Immunol, 2013. **43**(11): p. 2797-809.
 91. Gattinoni, L., et al., *T memory stem cells in health and disease*. Nat Med, 2017. **23**(1): p. 18-27.
 92. Lichterfeld, M., et al., *HIV-1 Nef is preferentially recognized by CD8 T cells in primary HIV-1 infection despite a relatively high degree of genetic diversity*. AIDS, 2004. **18**(10): p. 1383-92.
 93. Adland, E., et al., *Nef-specific CD8+ T cell responses contribute to HIV-1 immune control*. PLoS One, 2013. **8**(9): p. e73117.
 94. Turk, G., et al., *Magnitude, breadth, and functional profile of T-cell responses during human immunodeficiency virus primary infection with B and BF viral variants*. J Virol, 2008. **82**(6): p. 2853-66.
 95. Zuniga, R., et al., *Relative dominance of Gag p24-specific cytotoxic T lymphocytes is associated with human immunodeficiency virus control*. J Virol, 2006. **80**(6): p. 3122-5.
 96. Geldmacher, C., et al., *CD8 T-cell recognition of multiple epitopes within specific Gag regions is associated with maintenance of a low steady-state viremia in human immunodeficiency virus type 1-seropositive patients*. J Virol, 2007. **81**(5): p. 2440-8.
 97. Walker, B. and A. McMichael, *The T-cell response to HIV*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2012. **2**(11).
-

-
98. Edwards, B.H., et al., *Magnitude of functional CD8+ T-cell responses to the gag protein of human immunodeficiency virus type 1 correlates inversely with viral load in plasma.* J Virol, 2002. **76**(5): p. 2298-305.
 99. Kiepiela, P., et al., *CD8+ T-cell responses to different HIV proteins have discordant associations with viral load.* Nat Med, 2007. **13**(1): p. 46-53.
 100. Sacha, J.B., et al., *Gag-specific CD8+ T lymphocytes recognize infected cells before AIDS-virus integration and viral protein expression.* J Immunol, 2007. **178**(5): p. 2746-54.
 101. Payne, R.P., et al., *Efficacious early antiviral activity of HIV Gag- and Pol-specific HLA-B 2705-restricted CD8+ T cells.* J Virol, 2010. **84**(20): p. 10543-57.
 102. Miura, T., et al., *Impaired replication capacity of acute/early viruses in persons who become HIV controllers.* J Virol, 2010. **84**(15): p. 7581-91.
 103. Henn, M.R., et al., *Whole genome deep sequencing of HIV-1 reveals the impact of early minor variants upon immune recognition during acute infection.* PLoS Pathog, 2012. **8**(3): p. e1002529.
 104. Saez-Cirion, A., et al., *Heterogeneity in HIV suppression by CD8 T cells from HIV controllers: association with Gag-specific CD8 T cell responses.* J Immunol, 2009. **182**(12): p. 7828-37.
 105. Julg, B., et al., *Enhanced anti-HIV functional activity associated with Gag-specific CD8 T-cell responses.* J Virol, 2010. **84**(11): p. 5540-9.
 106. Appay, V., et al., *Persistent HIV-1-specific cellular responses despite prolonged therapeutic viral suppression.* AIDS, 2002. **16**(2): p. 161-70.
 107. Betts, M.R., et al., *HIV nonprogressors preferentially maintain highly functional HIV-specific CD8+ T cells.* Blood, 2006. **107**(12): p. 4781-9.
 108. Almeida, J.R., et al., *Antigen sensitivity is a major determinant of CD8+ T-cell polyfunctionality and HIV-suppressive activity.* Blood, 2009. **113**(25): p. 6351-60.
 109. Ferre, A.L., et al., *Mucosal immune responses to HIV-1 in elite controllers: a potential correlate of immune control.* Blood, 2009. **113**(17): p. 3978-89.
 110. Papagno, L., et al., *Immune activation and CD8+ T-cell differentiation towards senescence in HIV-1 infection.* PLoS Biol, 2004. **2**(2): p. E20.
 111. Appay, V., et al., *Phenotype and function of human T lymphocyte subsets: consensus and issues.* Cytometry A, 2008. **73**(11): p. 975-83.
 112. Ghigliione, Y., et al., *Early skewed distribution of total and HIV-specific CD8+ T-cell memory phenotypes during primary HIV infection is related to reduced antiviral activity and faster disease progression.* PLoS One, 2014. **9**(8): p. e104235.
 113. Burgers, W.A., et al., *Association of HIV-specific and total CD8+ T memory phenotypes in subtype C HIV-1 infection with viral set point.* J Immunol, 2009. **182**(8): p. 4751-61.
 114. Jensen, S.S., et al., *Initiation of Antiretroviral Therapy (ART) at Different Stages of HIV-1 Disease Is Not Associated with the Proportion of Exhausted CD8+ T Cells.* PLoS One, 2015. **10**(10): p. e0139573.
 115. Velu, V., et al., *Role of PD-1 co-inhibitory pathway in HIV infection and potential therapeutic options.* Retrovirology, 2015. **12**: p. 14.
 116. Socias, M.E., et al., *Acute retroviral syndrome and high baseline viral load are predictors of rapid HIV progression among untreated Argentinean seroconverters.* J Int AIDS Soc, 2011. **14**: p. 40.
-

-
117. Socias, M.E., et al., *Acute retroviral syndrome and high baseline viral load are predictors of rapid HIV progression among untreated Argentinean seroconverters*. J Int AIDS Soc. **14**: p. 40.
 118. Dirección de SIDA y ETS, M.d.S., *Guías para el manejo de los pacientes adultos con infección por VIH*. 2013.
 119. (SADD), S.A.d.I., *Consenso Argentino de Terapia Antirretroviral 2014-2015*.
 120. Mallotra, U., et al., *Enhanced detection of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Nef-specific T cells recognizing multiple variants in early HIV-1 infection*. J Virol, 2007. **81**(10): p. 5225-37.
 121. Currier, J.R., et al., *A panel of MHC class I restricted viral peptides for use as a quality control for vaccine trial ELISPOT assays*. J Immunol Methods, 2002. **260**(1-2): p. 157-72.
 122. Ruiz, M.J., et al., *Evaluation of Different Parameters of Humoral and Cellular Immune Responses in HIV Serodiscordant Heterosexual Couples: Humoral Response Potentially Implicated in Modulating Transmission Rates*. EBioMedicine, 2017. **26**: p. 25-37.
 123. Goonetilleke, N., et al., *Induction of multifunctional human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-specific T cells capable of proliferation in healthy subjects by using a prime-boost regimen of DNA- and modified vaccinia virus Ankara-vectored vaccines expressing HIV-1 Gag coupled to CD8+ T-cell epitopes*. J Virol, 2006. **80**(10): p. 4717-28.
 124. Ndhlovu, Z.M., et al., *The Breadth of Expandable Memory CD8+ T Cells Inversely Correlates with Residual Viral Loads in HIV Elite Controllers*. J Virol, 2015. **89**(21): p. 10735-47.
 125. Shan, L., et al., *Stimulation of HIV-1-specific cytolytic T lymphocytes facilitates elimination of latent viral reservoir after virus reactivation*. Immunity, 2012. **36**(3): p. 491-501.
 126. 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, 1997. **16**(2): p. 83-92.
 127. Saez-Cirion, A., et al., *Ex vivo T cell-based HIV suppression assay to evaluate HIV-specific CD8+ T-cell responses*. Nat Protoc, 2010. **5**(6): p. 1033-41.
 128. Hermans, I.F., et al., *The VITAL assay: a versatile fluorometric technique for assessing CTL- and NKT-mediated cytotoxicity against multiple targets in vitro and in vivo*. J Immunol Methods, 2004. **285**(1): p. 25-40.
 129. Keele, B.F., et al., *Identification and characterization of transmitted and early founder virus envelopes in primary HIV-1 infection*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(21): p. 7552-7.
 130. Salazar-Gonzalez, J.F., et al., *Genetic identity, biological phenotype, and evolutionary pathways of transmitted/founder viruses in acute and early HIV-1 infection*. J Exp Med, 2009. **206**(6): p. 1273-89.
 131. Turk, G., et al., *Biomarkers of Progression after HIV Acute/Early Infection: Nothing Compares to CD4(+) T-cell Count? Viruses*, 2018. **10**(1).
 132. Roederer, M., J.L. Nozzi, and M.C. Nason, *SPICE: exploration and analysis of post-cytometric complex multivariate datasets*. Cytometry A, 2011. **79**(2): p. 167-74.
 133. Streeck, H., et al., *Human immunodeficiency virus type 1-specific CD8+ T-cell responses during primary infection are major determinants of the viral set point and loss of CD4+ T cells*. J Virol, 2009. **83**(15): p. 7641-8.
-

-
134. Macatangay, B.J. and C.R. Rinaldo, *Preserving HIV-specific T cell responses: does timing of antiretroviral therapy help?* Curr Opin HIV AIDS, 2015. **10**(1): p. 55-60.
 135. Deeks, S.G., et al., *Immune activation set point during early HIV infection predicts subsequent CD4+ T-cell changes independent of viral load.* Blood, 2004. **104**(4): p. 942-7.
 136. Doisne, J.M., et al., *CD8+ T cells specific for EBV, cytomegalovirus, and influenza virus are activated during primary HIV infection.* J Immunol, 2004. **173**(4): p. 2410-8.
 137. Paiardini, M. and M. Muller-Trutwin, *HIV-associated chronic immune activation.* Immunol Rev, 2013. **254**(1): p. 78-101.
 138. Rodriguez, A.M., et al., *IL-12 and GM-CSF in DNA/MVA immunizations against HIV-1 CRF12_BF Nef induced T-cell responses with an enhanced magnitude, breadth and quality.* PLoS One, 2012. **7**(5): p. e37801.
 139. Almeida, J.R., et al., *Superior control of HIV-1 replication by CD8+ T cells is reflected by their avidity, polyfunctionality, and clonal turnover.* J Exp Med, 2007. **204**(10): p. 2473-85.
 140. Seder, R.A., P.A. Darrah, and M. Roederer, *T-cell quality in memory and protection: implications for vaccine design.* Nat Rev Immunol, 2008. **8**(4): p. 247-58.
 141. Vigano, S., et al., *Rapid perturbation in viremia levels drives increases in functional avidity of HIV-specific CD8 T cells.* PLoS Pathog, 2013. **9**(7): p. e1003423.
 142. Grabmeier-Pfistershammer, K., et al., *Identification of PD-1 as a unique marker for failing immune reconstitution in HIV-1-infected patients on treatment.* J Acquir Immune Defic Syndr, 2011. **56**(2): p. 118-24.
 143. Serrano-Villar, S., et al., *HIV-infected individuals with low CD4/CD8 ratio despite effective antiretroviral therapy exhibit altered T cell subsets, heightened CD8+ T cell activation, and increased risk of non-AIDS morbidity and mortality.* PLoS Pathog, 2014. **10**(5): p. e1004078.
 144. Day, C.L., et al., *PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression.* Nature, 2006. **443**(7109): p. 350-4.
 145. Trautmann, L., et al., *Upregulation of PD-1 expression on HIV-specific CD8+ T cells leads to reversible immune dysfunction.* Nat Med, 2006. **12**(10): p. 1198-202.
 146. Montesano, C., et al., *HIV replication leads to skewed maturation of CD8-positive T-cell responses in infected children.* New Microbiol, 2010. **33**(4): p. 303-9.
 147. Barbour, J.D., et al., *High CD8+ T cell activation marks a less differentiated HIV-1 specific CD8+ T cell response that is not altered by suppression of viral replication.* PLoS One, 2009. **4**(2): p. e4408.
 148. Gattinoni, L., et al., *A human memory T cell subset with stem cell-like properties.* Nat Med, 2011. **17**(10): p. 1290-7.
 149. Sung, J.A., et al., *HIV-Specific, Ex Vivo Expanded T Cell Therapy: Feasibility, Safety, and Efficacy in ART-Suppressed HIV-Infected Individuals.* Mol Ther, 2018. **26**(10): p. 2496-2506.
 150. Saez-Cirion, A., et al., *Post-treatment HIV-1 controllers with a long-term virological remission after the interruption of early initiated antiretroviral therapy ANRS VISCONTI Study.* PLoS Pathog, 2013. **9**(3): p. e1003211.
 151. Mylvaganam, G.H., G. Silvestri, and R.R. Amara, *HIV therapeutic vaccines: moving towards a functional cure.* Curr Opin Immunol, 2015. **35**: p. 1-8.
-

-
152. Deng, K., et al., *Broad CTL response is required to clear latent HIV-1 due to dominance of escape mutations*. *Nature*, 2015. **517**(7534): p. 381-5.
 153. Sung, J.A., et al., *Expanded cytotoxic T-cell lymphocytes target the latent HIV reservoir*. *J Infect Dis*, 2015. **212**(2): p. 258-63.
 154. Huang, S.H., et al., *Latent HIV reservoirs exhibit inherent resistance to elimination by CD8+ T cells*. *J Clin Invest*, 2018. **128**(2): p. 876-889.
 155. Jain, V., et al., *Antiretroviral therapy initiated within 6 months of HIV infection is associated with lower T-cell activation and smaller HIV reservoir size*. *J Infect Dis*, 2013. **208**(8): p. 1202-11.
 156. Rutishauser, R.L., et al., *Early and Delayed Antiretroviral Therapy Results in Comparable Reductions in CD8(+) T Cell Exhaustion Marker Expression*. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 2017. **33**(7): p. 658-667.
 157. Kalams, S.A., et al., *Levels of human immunodeficiency virus type 1-specific cytotoxic T-lymphocyte effector and memory responses decline after suppression of viremia with highly active antiretroviral therapy*. *J Virol*, 1999. **73**(8): p. 6721-8.
 158. Ogg, G.S., et al., *Decay kinetics of human immunodeficiency virus-specific effector cytotoxic T lymphocytes after combination antiretroviral therapy*. *J Virol*, 1999. **73**(1): p. 797-800.
 159. Migueles, S.A., et al., *Defective human immunodeficiency virus-specific CD8+ T-cell polyfunctionality, proliferation, and cytotoxicity are not restored by antiretroviral therapy*. *J Virol*, 2009. **83**(22): p. 11876-89.
 160. Janbazian, L., et al., *Clonotype and repertoire changes drive the functional improvement of HIV-specific CD8 T cell populations under conditions of limited antigenic stimulation*. *J Immunol*, 2012. **188**(3): p. 1156-67.
 161. Chapuis, A.G., et al., *HIV-specific CD8+ T cells from HIV+ individuals receiving HAART can be expanded ex vivo to augment systemic and mucosal immunity in vivo*. *Blood*, 2011. **117**(20): p. 5391-402.
 162. Ndhlovu, Z.M., et al., *Elite controllers with low to absent effector CD8+ T cell responses maintain highly functional, broadly directed central memory responses*. *J Virol*, 2012. **86**(12): p. 6959-69.
 163. Emu, B., et al., *Composition and function of T cell subpopulations are slow to change despite effective antiretroviral treatment of HIV disease*. *PLoS One*, 2014. **9**(1): p. e85613.
 164. Walker-Sperling, V.E., et al., *Reactivation Kinetics of HIV-1 and Susceptibility of Reactivated Latently Infected CD4+ T Cells to HIV-1-Specific CD8+ T Cells*. *J Virol*, 2015. **89**(18): p. 9631-8.
 165. Gray, C.M., et al., *Human immunodeficiency virus-specific gamma interferon enzyme-linked immunospot assay responses targeting specific regions of the proteome during primary subtype C infection are poor predictors of the course of viremia and set point*. *J Virol*, 2009. **83**(1): p. 470-8.
 166. Masemola, A., et al., *Hierarchical targeting of subtype C human immunodeficiency virus type 1 proteins by CD8+ T cells: correlation with viral load*. *J Virol*, 2004. **78**(7): p. 3233-43.
 167. Riou, C., et al., *Differential impact of magnitude, polyfunctional capacity, and specificity of HIV-specific CD8+ T cell responses on HIV set point*. *J Virol*, 2014. **88**(3): p. 1819-24.
 168. Ferrando-Martinez, S., et al., *Differential Gag-specific polyfunctional T cell maturation patterns in HIV-1 elite controllers*. *J Virol*, 2012. **86**(7): p. 3667-74.
 169. Ndhlovu, Z.M., et al., *Magnitude and Kinetics of CD8+ T Cell Activation during Hyperacute HIV Infection Impact Viral Set Point*. *Immunity*, 2015. **43**(3): p. 591-604.
-

-
170. Mujib, S., et al., *Pharmacologic HIV-1 Nef blockade promotes CD8 T cell-mediated elimination of latently HIV-1-infected cells in vitro*. JCI Insight, 2017. **2**(17).
 171. Imamichi, H., et al., *Defective HIV-1 proviruses produce novel protein-coding RNA species in HIV-infected patients on combination antiretroviral therapy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2016. **113**(31): p. 8783-8.
 172. Streeck, H., et al., *Antigen load and viral sequence diversification determine the functional profile of HIV-1-specific CD8+ T cells*. PLoS Med, 2008. **5**(5): p. e100.
 173. Ferrari, G., et al., *Relationship between functional profile of HIV-1 specific CD8 T cells and epitope variability with the selection of escape mutants in acute HIV-1 infection*. PLoS Pathog, 2011. **7**(2): p. e1001273.
 174. Champagne, P., et al., *Skewed maturation of memory HIV-specific CD8 T lymphocytes*. Nature, 2001. **410**(6824): p. 106-11.
 175. Burgers, W.A., et al., *Association of HIV-specific and total CD8+ T memory phenotypes in subtype C HIV-1 infection with viral set point*. J Immunol, 2009. **182**(8): p. 4751-61.
 176. Vigano, S., et al., *Prolonged Antiretroviral Therapy Preserves HIV-1-Specific CD8 T Cells with Stem Cell-Like Properties*. J Virol, 2015. **89**(15): p. 7829-40.
 177. Restifo, N.P., M.E. Dudley, and S.A. Rosenberg, *Adoptive immunotherapy for cancer: harnessing the T cell response*. Nat Rev Immunol, 2012. **12**(4): p. 269-81.
 178. Trautmann, L., et al., *Profound metabolic, functional, and cytolytic differences characterize HIV-specific CD8 T cells in primary and chronic HIV infection*. Blood, 2012. **120**(17): p. 3466-77.
 179. Meyer-Olson, D., et al., *Clonal expansion and TCR-independent differentiation shape the HIV-specific CD8+ effector-memory T-cell repertoire in vivo*. Blood, 2010. **116**(3): p. 396-405.
 180. Northfield, J.W., et al., *Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-specific CD8+ T(EMRA) cells in early infection are linked to control of HIV-1 viremia and predict the subsequent viral load set point*. J Virol, 2007. **81**(11): p. 5759-65.
 181. Breton, G., et al., *Programmed death-1 is a marker for abnormal distribution of naive/memory T cell subsets in HIV-1 infection*. J Immunol, 2013. **191**(5): p. 2194-204.
 182. Okazaki, T., et al., *A rheostat for immune responses: the unique properties of PD-1 and their advantages for clinical application*. Nat Immunol, 2013. **14**(12): p. 1212-8.
 183. Barber, D.L., et al., *Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection*. Nature, 2006. **439**(7077): p. 682-7.
 184. Yamamoto, T., et al., *Surface expression patterns of negative regulatory molecules identify determinants of virus-specific CD8+ T-cell exhaustion in HIV infection*. Blood, 2011. **117**(18): p. 4805-15.
 185. Zangeneh, G.G., H.; Emad, M.; Erfani, N.; Doroudchi, A. , *Elevated PD-1 expression and decreased telomerase activity in memory T cells of patients with symptomatic Herpes Zoster infection*. Cell. Mol. Biol., 2014. **60**(4): p. 13-21.
 186. Bellon, M. and C. Nicot, *Telomere Dynamics in Immune Senescence and Exhaustion Triggered by Chronic Viral Infection*. Viruses, 2017. **9**(10).
 187. Hokey, D.A., et al., *Activation drives PD-1 expression during vaccine-specific proliferation and following lentiviral infection in macaques*. Eur J Immunol, 2008. **38**(5): p. 1435-45.
-

-
188. Donia, M., et al., *PD-1(+)* Polyfunctional T Cells Dominate the Periphery after Tumor-Infiltrating Lymphocyte Therapy for Cancer. *Clin Cancer Res*, 2017. **23**(19): p. 5779-5788.
 189. Ghiglione, Y., et al., *PD-1* expression in HIV-specific CD8+ T-cells prior to antiretroviral therapy is associated with HIV persistence. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 2018.
 190. Zelinsky, G., et al., Virus-specific CD8+ T cells upregulate programmed death-1 expression during acute friend retrovirus infection but are highly cytotoxic and control virus replication. *J Immunol*, 2011. **187**(7): p. 3730-7.
 191. Lichterfeld, M., et al., Telomerase activity of HIV-1-specific CD8+ T cells: constitutive up-regulation in controllers and selective increase by blockade of PD ligand 1 in progressors. *Blood*, 2008. **112**(9): p. 3679-87.
 192. Wykes, M.N. and S.R. Lewin, Immune checkpoint blockade in infectious diseases. *Nat Rev Immunol*, 2018. **18**(2): p. 91-104.
 193. Brockman, M.A., R.B. Jones, and Z.L. Brumme, Challenges and Opportunities for T-Cell-Mediated Strategies to Eliminate HIV Reservoirs. *Front Immunol*, 2015. **6**: p. 506.
 194. Masopust, D. and L.J. Picker, Hidden memories: frontline memory T cells and early pathogen interception. *J Immunol*, 2012. **188**(12): p. 5811-7.
 195. Freel, S.A., et al., Initial HIV-1 antigen-specific CD8+ T cells in acute HIV-1 infection inhibit transmitted/founder virus replication. *J Virol*, 2012. **86**(12): p. 6835-46.
 196. Freel, S.A., et al., Phenotypic and functional profile of HIV-inhibitory CD8 T cells elicited by natural infection and heterologous prime/boost vaccination. *J Virol*, 2010. **84**(10): p. 4998-5006.
 197. Yamamoto, T., et al., Virus inhibition activity of effector memory CD8(+) T cells determines simian immunodeficiency virus load in vaccinated monkeys after vaccine breakthrough infection. *J Virol*, 2012. **86**(10): p. 5877-84.
 198. Julg, B., et al., Enhanced anti-HIV functional activity associated with Gag-specific CD8 T-cell responses. *J Virol*. **84**(11): p. 5540-9.
 199. Hua, S., et al., Potential role for HIV-specific CD38-/HLA-DR+ CD8+ T cells in viral suppression and cytotoxicity in HIV controllers. *PLoS One*, 2014. **9**(7): p. e101920.
 200. Ghiglione, Y.A., *Análisis de potenciales correlatos inmunes de control en la infección por HIV-1 durante la seroconversión y el primer año de infección*. 2015, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires: https://digital.bl.fcen.uba.ar/download/tesis/tesis_n5734_Ghiglione.pdf.
-