

INTERVENCIONES PARA DISMINUIR LA
INFLAMACIÓN Y CONSEGUIR LA REMISIÓN
VIROLÓGICA PERSISTENTE EN PERSONAS QUE
VIVEN CON VIH

Tesis Doctoral

M^a Reyes Jiménez León

No temas a las dificultades, lo mejor surge de ellas.

Rita Levi-Montalcini

En la Ciencia la única verdad sagrada, es que no hay verdades sagradas.

Carl Sagan

A mis niños, Estrella y Alfonso por ser mi guía.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar agradecer a mis directores Ezequiel y Luis por confiar en mi y darme la oportunidad de formar parte del grupo. Especialmente a Ezequiel por compartir conmigo su pasión por la ciencia y reconciliarme con la investigación, haciendo que recuerde que era realmente con lo que soñaba cuando era una niña.

A todos mis compañeros del 211, a los veteranos y las nuevas incorporaciones. Especialmente a Laura Tarancón, Bea y Rebeca por enseñarme todo lo necesario y cuidarme los primeros meses. A mis niñas, Joana, Sara e Isabel por las horas de terapia y las risas infinitas. A las más jóvenes del equipo Inés, Marta y Belén por su entusiasmo y el aire fresco que han traído al grupo. A Ana, por sus sinceros consejos y a Ángel por darme el mejor de todos. A Carmen y María por ser las primeras compañeras de fatigas. A Alberto por preparar los mejores cumpleaños, a Esperanza, Abraham, Fran, Laura, Marta y Bea por estar siempre dispuestos a ayudar con la mejor de sus sonrisas.

Pero realmente esta tesis se la debo a mis padres, Alfonso y Mercedes. Por apoyarme aunque no siempre me hayáis entendido. A mi padre, mi alma gemela, el verdadero culpable de que no pueda dedicarme a otra cosa que no sea la ciencia. A mi madre, porque de ella he heredado el tesón y la cabezonería, como diría el abuelo “*sin genio no se va a ninguna parte*”. Por supuesto a mis hermanas, por estar siempre, por ser lo que hemos sido siempre, inseparables.

Por último y no menos importante, a mi Pepe, por su INFINITA paciencia. Por saber lo que necesito con una mirada. Por hacerlo todo siempre tan fácil y hacerme tan feliz. Por nuestros niños Estrella y Alfonso, nuestro camino, lo más maravilloso que me ha pasado en la vida. Sin ti, esta tesis no habría sido posible. A mi fideíto y mi rubio, por hacer que se me olvide todo al instante de estar juntos.

FINANCIACIÓN

Esta tesis doctoral ha sido realizada con la financiación de los siguientes contratos y proyectos:

Contrato Predoctoral PFIS, Fondo de Investigación Sanitaria, Instituto de Salud Carlos III (FI17/00186).

Proyecto de Investigación en Salud del Fondo de Investigación Sanitaria, Instituto de Salud Carlos III (PI18/01532). Ensayo clínico para evaluar la seguridad y eficacia de Vedolizumab combinado con TAR para conseguir la cura funcional en pacientes infectados por VIH-1-1 sin TAR previo.

Proyecto de Investigación en Salud del Fondo de Investigación Sanitaria, Instituto de Salud Carlos III (PI16/00684). Papel de las células plasmacitoides dendríticas en el control espontáneo de la replicación del VIH-1 y en su patogénesis. Relevancia clínica de los mecanismos implicados.

Gilead Fellowship (GLD17/0299). Role of plasmacytoid dendritic cells in the spontaneous control of HIV replication and HIV pathogenesis: clinical relevance of the involved mechanisms.

INDICE

AGRADECIMIENTOS	6
ABREVIATURAS	12
RESUMEN	14
INTRODUCCIÓN GENERAL	18
Historia natural de la infección por VIH-1	19
Paradigma actual de la infección por VIH-1: Inflamación crónica y Eventos no definatorios de SIDA en PVVS bajo TAR	22
Co-infección VIH-1/VHC.....	25
Reservorio viral y estrategias de curación para la infección por VIH-1	26
- Reservorio celular	27
- Reservorios anatómicos o santuarios del VIH-1	29
- Replicación residual persistente del VIH-1.....	30
- Estrategias de curación para la infección por VIH-1.....	31
HIPOTESIS Y OBJETIVOS	36
CAPITULO 1	40
MODULACIÓN DE LA ACTIVACIÓN Y FUNCION DE LOS MONOCITOS DURANTE EL TRATAMIENTO CON ANTIVIRALES DE ACCION DIRECTA EN PACIENTES CO-INFECTADOS CON VIH-1 Y VIRUS DE LA HEPATITIS C	40
INTRODUCCIÓN	41
MATERIALES Y METODOS	43
RESULTADOS.....	49
DISCUSION	61
CAPITULO 2	68
INCREMENTO DE LA RESPUESTA VIH-ESPECÍFICA EN LINFOCITOS T A TRAVÉS DE CÉLULAS DENDRÍTICAS PLAMACITOIDES ESTIMULADAS CON AGONISTAS DE RECEPTORES TIPO “TOLL” EN DIVERSOS FENOTIPOS DE PROGRESIÓN DE LA INFECCIÓN POR VIH-1.	68
INTRODUCCIÓN	69
MATERIALES Y MÉTODOS	72
RESULTADOS.....	81
DISCUSION.....	100
CAPITULO 3	108

ENSAYO CLÍNICO EN FASE II PARA EVALUAR LA SEGURIDAD Y EFICACIA DE VEDOLIZUMAB COMBINADO CON TAR PARA CONSEGUIR LA CURACIÓN FUNCIONAL EN PVVS SIN TAR PREVIO.....	108
INTRODUCCION	109
MATERIALES Y MÉTODOS	112
RESULTADOS	121
DISCUSION.....	139
MATERIAL SUPLEMENTARIO	148
DISCUSION INTEGRADA	154
CONCLUSIONES	164
BIBLIOGRAFIA	168
ANEXOS	192
Otros trabajos desarrollados en el periodo de tesis	192
Informes de comités éticos.....	194

ABREVIATURAS

AAD: Antivirales de acción directa

B2M: β 2-microglobulina

CDC: Centers for Disease Control and Prevention

DC: Células dendríticas

ddPCR: PCR digital en gota (*“Droplet digital PCR”*)

EDTA: ácido tetra-acético etilen diamina.

ENOS: Eventos no sida

GALT: Tejido linfoide asociado a intestino (*“Gut Associated Lymphoid Tissue”*)

IAT: Interrupción analítica del tratamiento

IFN: Interferon

IL: Interleucina

IO: Infecciones oportunistas

LPS: Lipopolisacárido

LTR: “Long terminal repeat”

mDCs: Células dendríticas mieloides

MFI: intensidad media de fluorescencia

MIP: Proteína inflamatoria de macrófagos

NK: Células asesinas naturales (*“natural killer cells”*)

PBMCs: Células mononucleadas procedentes de sangre periférica

PCR: Proteína C Reactiva

PD1: Receptor de muerte programada tipo 1 (*“programmed cell dead protein 1”*)

pDCs: Células dendríticas plasmacitoides

PDL1: Ligando del receptor de muerte programada tipo 1 (*“programmed cell Dead protein ligand 1”*)

PVVS: Personas que viven con el VIH o con SIDA

RVS: Respuesta viral sostenida

sCD14: CD14 soluble

sCD163: CD163 soluble

SIDA: Síndrome de inmunodeficiencia adquirida

SIV: virus de la inmunodeficiencia de simios

TAR: Tratamiento antirretroviral

TLR: Receptores tipo *“toll”*

TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa

VHB: Virus de la hepatitis B

VHC: Virus de la hepatitis C

VIH-1: Virus de inmunodeficiencia humana 1

RESUMEN

En la actualidad las personas que viven con VIH-1 o SIDA (PVVS) tienen a su disposición tratamientos antirretrovirales (TAR) altamente eficaces en el control rápido de la viremia tras la infección. No obstante, las PVVS siguen teniendo una esperanza de vida ligeramente inferior a la población no infectada. Las PVVS sufren un proceso de envejecimiento prematuro al que contribuye un estado inflamatorio crónico de bajo grado que el TAR es incapaz de reducir. Este estado conlleva a la aparición prematura de enfermedades propias de edades avanzadas como enfermedades cardiovasculares o hepáticas a las que se denomina eventos no defintorios de SIDA (ENOS) y que son la principal causa de muerte en PVVS bajo TAR. No está claro el origen de esta inflamación crónica, aunque se han identificado algunos factores siendo uno de los principales la co-infección con otros virus y la consecuente activación del sistema inmunitario innato, en el cual un componente principal es el monocito. Es por tanto, un objetivo primordial en la lucha contra el VIH-1, el diseño de intervenciones terapéuticas que disminuyan este estado inflamatorio crónico. En este contexto, el primer objetivo de la presente tesis doctoral fue evaluar el fenotipo y los cambios funcionales de las tres subpoblaciones de monocitos durante la erradicación del VHC en individuos co-infectados VIH-1/VHC. Pudiéndose observar que la erradicación del VHC es capaz de modular el fenotipo y función de los monocitos, logrando una redistribución de sus subpoblaciones hacia un perfil menos proinflamatorio y con una menor activación y polifuncionalidad de estos. Sin embargo, a pesar de la erradicación del VHC, algunos parámetros no lograron normalizarse por completo en comparación con los sujetos mono-infectados VIH-1.

Otro gran objetivo en la lucha contra el VIH-1 es alcanzar la remisión virológica permanente o “cura funcional” sin necesidad de TAR. Para esto, se están diseñando diversas estrategias que buscan potenciar la actividad antiviral natural del sistema inmunitario mediante diversas moléculas. En la presente tesis doctoral hemos podido describir los mecanismos moleculares de dos de ellas: los agonistas de receptores de tipo “toll” (TLR) y el anticuerpo monoclonal humanizado dirigido contra la integrina $\alpha 4\beta 7$, Vedolizumab. Mediante un ensayo *in vitro*, investigamos como los agonistas de TLR-7 y-9 pueden servir como potenciadores de la actividad de las células dendríticas plasmacitoides (pDCs) y consecuentemente incrementar la respuesta específica antiviral de los linfocitos T. Las pDCs poseen una gran actividad antiviral gracias a ser las principales productoras de interferón de tipo I y a ser el nexo de unión entre la inmunidad innata y adaptativa. Hemos observado que la estimulación específica de estas células mediante agonistas de TLR-7 y -9 produce su activación y maduración siendo capaces de modular a su vez al linfocito T hacia un incremento en la producción de citoquinas. En este mismo escenario y como último punto de la presente tesis doctoral, hemos desarrollado el primer ensayo clínico para evaluar la seguridad y eficacia de Vedolizumab combinado con TAR para alcanzar la remisión virológica permanente en PVVS en infección reciente sin TAR previo tras la interrupción de este. El objetivo principal del estudio fue evaluar la seguridad y eficacia de Vedolizumab para alcanzar la remisión virológica permanente en PVVS en infección reciente tras la interrupción analítica del tratamiento (IAT). Adicionalmente, también realizamos una caracterización exhaustiva del perfil inmunológico asociado a los niveles de reservorio VIH-1 tanto en sangre periférica como en el tejido linfoide asociado a intestino (GALT) tras el bloqueo la integrina $\alpha 4\beta 7$ *in vivo*. Estos resultados arrojan conocimientos sobre la funcionalidad y los mecanismos de estas moléculas que son indispensables para el

diseño de futuras estrategias inmunoterapéuticas con el objetivo de disminuir el reservorio de los individuos infectados por VIH-1 y lograr el control de la infección sin necesidad de tratamientos.

Todos estos resultados en conjunto pueden tener importantes implicaciones en el desarrollo de futuras estrategias tanto para la reducción de la inflamación crónica que conducen a al desarrollo de ENOS como para con la reducción de los niveles de reservorio y la cura funcional del VIH-1.

INTRODUCCIÓN GENERAL

El virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1 (VIH-1) es el causante de la infección que recibe el mismo nombre. La fase más avanzada de la enfermedad que puede conducir a la muerte se denomina síndrome de inmunodeficiencia adquirida o SIDA. En 2021 se cumplieron 40 años desde que se registraron los primeros casos de enfermedades y muertes que posteriormente recibirían el nombre de SIDA. Desde entonces, aproximadamente 78 millones de personas han contraído el VIH-1 y 35 millones han muerto por enfermedades relacionadas con él. En estas cuatro décadas se ha producido un enorme progreso tanto médico como científico que se ha visto reflejado en un descenso drástico de las muertes tras el desarrollo de los actuales tratamientos antirretrovirales (TAR) combinados. Aunque se ha observado una disminución en el ritmo al cual se producen las nuevas infecciones y un aumento en el acceso a TAR en las personas que viven con VIH-1 o SIDA (PVVS); en 2020, 1.5 millones de personas contrajeron el VIH-1 y 680.000 murieron por enfermedades relacionadas con el SIDA (1). La epidemia por VIH-1 sigue siendo, por lo tanto, un problema de salud pública que requiere todos los recursos disponibles para ponerle fin. La organización de las naciones unidas para el SIDA (ONUSIDA) lidera la lucha mundial contra la epidemia de SIDA. En 2014 anunció una iniciativa global para acabar con la epidemia, los objetivos 90-90-90. Esta iniciativa consistía en que para el año 2020 el 90% de las PVVS conocieran su estado, de éstas el 90% se encontraran bajo TAR y de éstas el 90% hubieran alcanzado la supresión viral (2-4). A pesar de los esfuerzos globales, las últimas estadísticas sobre el estado de la epidemia de SIDA muestran profundas desigualdades entre países y continentes que han impedido alcanzar este objetivo de forma global (5, 6). Por lo que el objetivo principal de la estrategia mundial contra el SIDA para 2021-2026 está

centrado en acabar con estas desigualdades para conseguir globalmente los objetivos reseñados.

Historia natural de la infección por VIH-1

El VIH-1 se propaga por contacto directo con la sangre, semen, líquido seminal, secreciones vaginales y rectales o la leche materna de una PVVS con carga viral detectable. Actualmente no existe cura para el VIH-1, el TAR logra suprimir la carga viral plasmática siempre y cuando no se interrumpa. Sin tratamiento la infección por el VIH-1 progresa a lo largo del tiempo deteriorando progresivamente el sistema inmunitario hasta causar la fase final de la infección o SIDA.

La historia natural de la infección por VIH-1 se puede dividir en tres fases fundamentales (Figura 1) (7, 8):

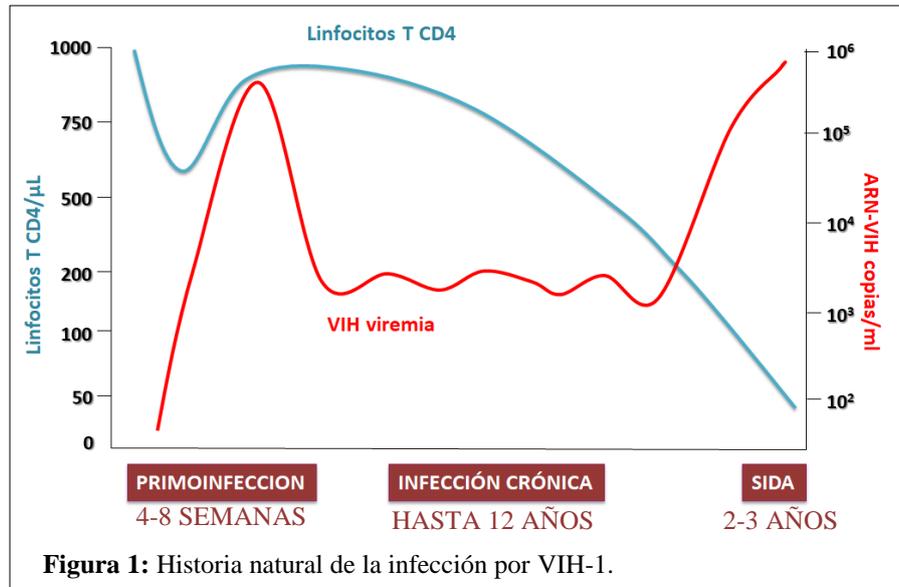
- **Fase 1: Infección aguda por VIH-1.**

Durante esta fase inicial de la infección por VIH-1 o primoinfección, los virus presentes en el inóculo se replican rápidamente en el huésped, infectando las células que expresan CD4 y mayoritariamente CCR5 como correceptor. Durante todo el curso de la infección, los linfocitos T CD4+ son la principal diana para el VIH-1.

A nivel virológico se caracteriza por un aumento muy pronunciado de la carga viral en sangre, propagándose rápidamente por todo el organismo. Este aumento exponencial de la carga viral va acompañado de una pequeña disminución del recuento de linfocitos T CD4+. La viremia va aumentando progresivamente en las primeras semanas tras la exposición, manifestándose clínicamente a través de síntomas inespecíficos como fiebre, cefalea y/o malestar general en la mayoría de casos. Con frecuencia, la infección por VIH-1 puede pasar desapercibida, dificultando un diagnóstico precoz, aunque

algunos pacientes pueden presentar un cuadro similar al de la mononucleosis infecciosa (9). Los estudios de dinámica viral durante infección aguda por VIH-1 o SIV sugieren que las poblaciones virales se duplican cada 6-10 horas, con cada célula infectada dando lugar a unas 20 nuevas células infectadas (10, 11). Durante esta fase los niveles de virus y de células infectadas en la circulación son muy elevados. La concentración de partículas víricas en la sangre suele ser de 10^6 /ml y puede llegar a 10^8 /ml. La invasión de los órganos linfoides secundarios por VIH-1 ocurre como resultado de los altos niveles de viremia que se alcanzan en esta fase. Es importante resaltar que la mayoría de los linfocitos T CD4+ se encuentran en el tejido linfoide asociado a intestino (GALT, del inglés "*Gut Associated Lymphoid Tissue*"), y es por tanto en esa localización donde se produce una gran replicación viral tanto en infección primaria como en las fases posteriores de la infección por VIH-1.

Tras unas semanas, los niveles de carga viral en sangre disminuyen como consecuencia de la respuesta inmunitaria frente al virus. Los linfocitos T CD8+ tienen un papel fundamental en el control de la viremia en esta etapa de la infección. Su acción citotóxica junto con la producción de interferón (IFN)- α y otros elementos del sistema inmunitario son los responsables de que la carga viral llegue a un punto de estabilización o "*set point*".



- **Fase 2: Infección crónica por VIH-1.**

A la etapa de primoinfección le sigue, generalmente, un largo periodo de infección crónica, asintomática o de latencia clínica que puede durar años. Esta fase se caracteriza por dos eventos fundamentales: la replicación viral en los órganos linfoides secundarios y el descenso paulatino del recuento de linfocitos T CD4+. Aunque, en esta fase las PVVS pueden no presentar síntomas relacionados con la infección por VIH-1, el virus sigue replicándose continuamente y es fácilmente detectable. La tasa de disminución de los linfocitos T CD4+ está determinada principalmente por el “set point” de carga viral. Las PVVS con “set point” más elevados progresan más rápidamente a SIDA (12). Los mecanismos subyacentes de esta depleción de linfocitos T CD4+ incluyen una destrucción de estas células por el propio virus y una incapacidad del timo para producirlas (13). En ausencia de TAR esta fase puede durar unos 10 años, estableciéndose con el tiempo la fase final de la infección o SIDA que conlleva la muerte del paciente. Esto es así para la mayoría de PVVS con la excepción de un grupo de individuos infectados por VIH-1 denominados controladores. Estos PVVS son capaces de mantener cargas virales indetectables sin la necesidad de TAR (14).

- **Fase 3: Síndrome de inmunodeficiencia adquirida o SIDA**

El SIDA es la etapa final de la infección por VIH-1. Cuando los linfocitos T CD4+ disminuyen por debajo de las 200 células/ μ l la carga viral aumenta rápidamente. Entre uno y dos años antes de alcanzar esta fase la tasa de destrucción de linfocitos T CD4+ suele ser mayor. En este contexto el sistema inmunitario se encuentra ya completamente deteriorado siendo incapaz de luchar contra infecciones oportunistas (IO) o el cáncer. Las infecciones oportunistas son infecciones que ocurren con más frecuencia en personas inmunodeprimidas. Las PVVS reciben un diagnóstico de SIDA cuando presentan una IO o un recuento de linfocitos T CD4+ inferior a las 200 células/ μ l. La esperanza de vida de una PVVS diagnosticada de SIDA no suele superar los 3 años.

Paradigma actual de la infección por VIH-1: Inflamación crónica y Eventos no definitorios de SIDA en PVVS bajo TAR

La progresión a SIDA fue durante mucho tiempo la principal causa de muerte en PVVS debido a la falta de tratamientos al inicio de la epidemia o a tratamientos subóptimos como los análogos de nucleótidos. No se produce un descenso dramático en la morbimortalidad hasta el año 1996 cuando se introducen los tratamientos antirretrovirales de gran actividad basados en inhibidores de la proteasa junto con los análogos de nucleótidos que consiguen un eficiente control de la viremia VIH-1 (15), aumentando la esperanza de vida de las PVVS y convirtiendo a la infección por VIH-1 en una patología crónica (16). A día de hoy, a pesar de disponer de regímenes terapéuticos muy eficaces en el control de la carga viral, las tasas de mortalidad en la PVVS siguen siendo entre tres y quince veces superiores a la observada en la población no infectada (17). Aunque parte del exceso de mortalidad observado entre las PVVS puede atribuirse todavía a enfermedades que ocurren como consecuencia de la

inmunodeficiencia causada por la infección, los últimos estudios muestran que más de la mitad de las muertes observadas en los últimos años entre personas infectadas por VIH-1 que han recibido TAR correctamente se pueden agrupar en un conjunto de patologías denominadas eventos no definitorios de SIDA (ENOS) (18). Es decir, el TAR es altamente eficaz respecto al control rápido de la infección por VIH-1 y restaurando parcialmente el sistema inmunológico lo que lleva a la prevención del SIDA. Sin embargo, no consigue recuperar completamente la salud inicial del individuo; persistiendo una inflamación crónica de bajo grado. Este hecho facilita que las PVVS bajo TAR con carga viral suprimida sean susceptibles de desarrollar algún ENO entre los que se encuentran enfermedades cardiovasculares, renales, hepáticas, óseas, determinados tipos de cáncer o afectaciones neuro-psiquiátricas (16, 19); enfermedades que en la población general no infectada por VIH-1 suelen asociarse con edades avanzadas. Por lo cual la comunidad científica cree que el aumento de ENOS entre las PVVS en comparación con la población general, es el resultado de un proceso de envejecimiento prematuro, al que contribuye de forma especial esta inflamación crónica de bajo grado (20, 21). Aunque los mecanismos inmunopatogénicos implicados en el desarrollo de ENOS no son del todo conocidos, muchos estudios ven el origen de éstos como multifactorial (22), pudiendo identificar entre ellos a:

- Replicación residual del VIH-1.
- Otras infecciones virales: (citomegalovirus (CMV), virus del papiloma humano (VPH), Leishmania o, especialmente, los virus de la hepatitis B y C (VHB y VHC).
- Aumento de la translocación microbiana a través de la mucosa intestinal comprometida a causa de la propia infección.
- Toxicidad del TAR.

- Estilo de vida de las PVVS.

Durante mucho tiempo la investigación sobre los orígenes de este estado inflamatorio crónico en PVVS bajo TAR se ha centrado en la activación de los linfocitos T dejando a un lado el papel de la inmunidad innata. No obstante, cada vez queda más patente que son fundamentalmente los mediadores inflamatorios producidos por los monocitos, y no por los linfocitos T activados, los que sirven como predictores del desarrollo de ENOS en PVVS bajo TAR, demostrando la importancia de este tipo celular (23). Los monocitos forman parte del sistema inmunitario innato y constituyen una parte fundamental del inicio y mantenimiento de la respuesta inflamatoria aguda. Sin embargo, también contribuyen a la inflamación crónica y pueden ser un factor determinante en la patogénesis de enfermedades estrechamente vinculadas con la inflamación, como la aterosclerosis (24–27). Estas células son un grupo heterogéneo que comprende tres subpoblaciones principales en función de la expresión de los marcadores CD14 y CD16: clásicos (CD14⁺⁺CD16⁻; mayoritarios en sangre periférica), intermedios (CD14⁺⁺CD16⁺) y no clásicos (CD14^{low}CD16⁺⁺) (28). Durante la infección por VIH-1 se ha descrito un aumento de los monocitos CD16 acompañado por un incremento en la producción de citoquinas proinflamatorias Factor de Necrosis Tumoral (TNF)- α e IL-1 α (29, 30). Además, el incremento de los monocitos intermedios durante el transcurso de la infección por VIH-1 se ha relacionado con la progresión de la enfermedad y el desarrollo de eventos cardiovasculares (31). De hecho nuestro grupo ya observó alteraciones inflamatorias relacionadas con monocitos en PVVS bajo TAR que se basaban principalmente en una mayor producción de IL-10 e IL-6 (20). Posteriormente también encontramos una asociación entre la activación de los linfocitos T CD8⁺ junto con monocitos y el desarrollo de accidentes cardiovasculares (32). Es vital destacar que este estado de activación e inflamación crónica al que contribuyen algunos de los

componentes de la inmunidad innata y adaptativa persisten elevados en PVVS bajo TAR con viremia suprimida (33, 34). Moléculas como IP-10, interferón (IFN)- α , CD163s, CD14s, proteína C reactiva (PCR), dímeros-D o la IL-6 permanecen elevados en PVVS bajo TAR respecto a individuos no infectados por VIH-1. De hecho algunas de ellas se han asociado con un mayor riesgo de desarrollar ENOS (23, 35, 36).

La paradoja de la activación inmunitaria en la infección por VIH-1 se basa en que mientras que la activación inmunitaria aguda y regulada refleja el conjunto de procesos antivirales que se están desarrollando en la lucha contra cualquier patógeno, incluido el VIH-1; por otro lado, estos mismos marcadores, que de manera desregulada se mantienen a niveles anormales a lo largo del tiempo, se correlacionan con el desarrollo de ENOS, progresión a SIDA e incluso la muerte del individuo. Es por esto que la disminución de esta activación e inflamación persistente en las PVVS se ha convertido en uno de los desafíos principales en el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas contra el VIH-1 con el objetivo de disminuir el desarrollo de ENOS.

Co-infección VIH-1/VHC

Debido a rutas comunes de transmisión, las PVVS tienen mayor riesgo de adquirir otras infecciones que incrementen los niveles de activación e inflamación crónicos. La co-infección tanto por virus de la hepatitis B (VHB) como C (VHC) incrementa de forma muy acentuada el riesgo de desarrollar ENOS severos (37–40). Dentro de los ENOS podemos diferenciar entre severos y no severos. Los ENOS severos son aquellos ENOS que pueden desencadenar una muerte, requieren tratamiento de por vida, son causa de hospitalización e incapacidad permanente y se asocian a niveles elevados de morbilidad (39, 41). La mayoría de estudios incluye en este grupo las enfermedades renal y hepática terminal y los eventos cardiovasculares junto con los carcinomas no

definitorios de SIDA (40, 42). Concretamente la co-infección en PVVS por VHC se asocia a un mayor riesgo de enfermedad renal, cardiovascular, cirrosis y hepatocarcinoma en relación con individuos VIH-1 mono-infectados bajo TAR (43–46). Sin olvidar que una de las principales causas que contribuyen al estado inflamatorio crónico de las PVVS bajo TAR que conducen al desarrollo de estos ENOS son las coinfecciones por otros virus, especialmente por el VHC como ya hemos comentando. De hecho, durante mucho tiempo se ha considerado la enfermedad hepática terminal causada por VHC el principal ENO, sin embargo, este ha perdido relevancia gracias a la aparición de los nuevos tratamientos antivirales directos (AAD) eficaces frente a la infección por el VHC. No es por tanto de extrañar, que la eliminación de esta coinfección pueda conducir de alguna manera a la disminución de la inflamación en estas PVVS. En este contexto, ya tuvimos la oportunidad de observar como la erradicación del VHC en pacientes co-infectados VIH-1/VHC disminuía la activación de los linfocitos T junto con otros parámetros (47). Por lo cual, quedaba por esclarecer si la erradicación del VHC por AAD también disminuía la activación de componentes de la inmunidad innata como es el caso de los monocitos hasta niveles de PVVS mono-infectados. **Este objetivo se abarca en el primer capítulo de la presente tesis “Modulación de la activación y función de los monocitos durante el tratamiento con antivirales de acción directa en pacientes co-infectados con VIH-1 y VHC.”** Parte de los resultados ya han sido publicados (48).

Reservorio viral y estrategias de curación para la infección por VIH-1

Como ya hemos comentado anteriormente los tratamientos actuales para la infección por VIH-1 logran suprimir la carga viral plasmática a niveles indetectables, siempre y cuando este no se interrumpa, pero no logran la curación de la infección. En la inmensa

mayoría de las PVVS que lo interrumpen el virus reaparece a los pocos días o semanas, convirtiéndose en un tratamiento de por vida. Por otro lado, no hay que ignorar los posibles efectos secundarios derivados del uso prolongado de estos fármacos, la posibilidad de desarrollar resistencias a ellos y el elevado coste para los servicios de salud públicos. Además, a pesar de obtener un control de la carga viral plasmática y evitar la transmisión de la infección, como ya hemos explicado, el TAR no consigue revertir por completo el estado de activación e inflamación crónica generado por la infección del VIH-1. Por estos motivos la comunidad científica persiste en la búsqueda de estrategias que permitan la erradicación o la cura funcional del VIH-1. Entendiendo este último concepto como la situación en la que, aunque el virus no esté completamente eliminado del organismo, el sistema inmunitario de la persona es capaz de controlarlo a niveles indetectables en sangre periférica sin necesidad de fármacos.

Actualmente los obstáculos principales que evitan la erradicación del VIH-1 son:

1. El reservorio celular y anatómico del VIH-1
2. La replicación residual persistente del VIH-1

A pesar de que no tener la misma importancia relativa en el establecimiento de la infección por VIH-1, cualquier estrategia terapéutica debe realizar una aproximación integrando ambos aspectos.

- **Reservorio celular**

Tras entrar en la célula, el VIH-1 se transcribe a ADN complementario, se trasloca al núcleo y se integra en el genoma de la célula infectada. Por lo cual, el reservorio viral del VIH-1 son las células donde el virus permanece latente. Por tanto, el reservorio se establece durante el inicio de la infección y es muy estable. Este reservorio celular está

compuesto principalmente por linfocitos T CD4+ de memoria en reposo latentemente infectados que portan el ADN del virus integrando en su genoma (ADN proviral). Estas células se encuentran diseminadas por todo el organismo de PVVS con o sin TAR. La presencia de estas células se puede detectar tanto en sangre periférica como en tejido linfoide. Estas células presentan una mínima o nula expresión de los genes virales por lo que es muy difícil que el sistema inmunitario del huésped las reconozca al no presentar en su membrana ningún marcador que las diferencie de las células no infectadas. Sin embargo, en estudios recientes se ha descrito que estas células se pueden caracterizar por la expresión de las denominadas moléculas de control inmunitario o “*immune checkpoint*”. Fromentin et al. (2016) describió que la mayoría de ellas expresaba al menos uno de estos marcadores: PD1, TIGIT y LAG3 (49). Sin embargo, a día de hoy no existen marcadores que permitan diferenciar las células que albergan el VIH-1 de manera latente.

Otras poblaciones celulares también contribuyen tanto al establecimiento del reservorio celular como a su mantenimiento. Por ejemplo, los macrófagos han sido un tipo celular que ha despertado cierta controversia en relación a este tema. Algunos autores creen que su función como fagocitos justifica la presencia de ácidos nucleicos y proteínas virales en ellos tras fagocitar los linfocitos T CD4+ infectados (50). Mientras que otros autores creen que en este mismo proceso el macrófago resulta infectado (51). Los resultados con ratones humanizados muestran que quizás este compartimento celular este siendo infravalorado, y reflejan indicios de que estos macrófagos persisten en tejido replicando el virus con independencia de los linfocitos T (52, 53). Por otro lado, estas células también pueden contribuir a la propagación del virus por el organismo. Tanto los macrófagos como las DC son capaces de capturar el virus y transferirlo a los linfocitos T CD4+ sin necesidad de infectarse (54). Respecto a las DC, tanto las dendríticas

plasmacitoides (pDCs) como las mieloides (mDCs) expresan CD4 y CCR5 lo que las hace susceptibles a la infección. De la misma forma estas células pueden transferir el virus mediante la presentación antigénica durante la sinapsis inmunológica a un linfocito T CD4+ autólogo (55). Otras células que contribuyen al reservorio celular del VIH-1 son las células epiteliales hepáticas y renales e incluso las células NK (56).

- **Reservorios anatómicos o santuarios del VIH-1**

Los principales reservorios anatómicos de células infectadas por VIH-1 incluyen tejido linfóide, como el localizado en el tracto genital, pulmones y GALT; y órganos no linfoides, como el sistema nervioso central (SNC) o los riñones. El GALT representa el reservorio más importante dado que alberga el 60% de los linfocitos del cuerpo y de ellos el 40% son linfocitos T CD4+ (57). La mayoría de los linfocitos T CD4+ del GALT se encuentran activados ya que el intestino delgado representa la interfase más extensa de la interacción con el exterior sometiendo al sistema inmunitario a una gran sobrecarga antigénica. En el curso de la infección los linfocitos T CD4+ localizados en el GALT también son destruidos masivamente debido a su localización, al grado de activación de los linfocitos T CD4+ y a que el TAR no alcanza niveles óptimos ni homogéneos (58). Esta destrucción, a diferencia de los niveles en sangre periférica, se mantiene en todas las etapas de la infección y no se recuperan con el TAR (59, 60). En el intestino, además de linfocitos T CD4+, se encuentran multitud de células dianas para el VIH-1 como macrófagos y otras células de la inmunidad innata. De hecho, se ha descrito que los macrófagos rectales expresan niveles más elevados de CCR5, haciendo particularmente susceptibles a la infección por VIH-1 las localizaciones más distales del intestino (61).

Otro reservorio anatómico de gran importancia para el VIH-1 son los tejidos linfoides donde se generan los centros germinales. Los centros germinales son compartimentos

anatómicos transitorios que aparecen en los órganos linfáticos secundarios donde se produce la maduración de los linfocitos B para la generación de anticuerpos de alta afinidad contra patógenos. Estos centros germinales albergan linfocitos T y células dendríticas foliculares, células que también forman parte del reservorio celular del VIH-1. Los linfocitos T CD8+ presentes en estos tejidos linfoides suelen presentar una actividad citotóxica reducida, con baja expresión de las moléculas granzima y perforina (62). En último lugar y al igual de los que sucede en el GALT los TAR no llegan de forma óptima a estas localizaciones. Estos mecanismos perpetúan la replicación viral residual en los nódulos linfáticos (63).

- **Replicación residual persistente del VIH-1**

A pesar de que el TAR consigue reducir hasta niveles indetectables en sangre periférica la carga viral de las PVVS, cuando se aplican técnicas de detección ultrasensibles se detectan niveles de ARN viral. Este hallazgo sugiere que no todas las secuencias de ADN viral integradas en los cromosomas se encuentran transcripcionalmente silentes. La actividad transcripcional de estos provirus puede variar ampliamente y parece estar marcada por las características genómicas y epigenéticas de la ubicación cromosómica donde se integran (64). Por lo cual tendremos provirus transcripcionalmente silenciados debido a que se encuentran integrados en regiones de la cromatina compactas con funciones básicamente estructurales denominadas heterocromatina (65, 66). Por el contrario, la mayoría de las PVVS muestran signos claros de actividad transcripcional al encontrarse seguramente integrados en regiones de la cromatina más laxas y con mayor actividad transcripcional (67–69). Queda por discernir si toda la actividad transcripcional que se detecta es apta para su posterior traducción.

Por otro lado, se sabe mediante modelos de dinámica de replicación viral, que los virus hallados en órganos linfoides secundarios y en sangre periférica son muy similares. Por lo que la replicación viral en las células infectadas de tejidos linfoides donde el TAR no llega a concentraciones óptimas podría estar estableciendo un reservorio viral y su tráfico por todo el organismo (70, 71).

- **Estrategias de curación para la infección por VIH-1**

La búsqueda de una cura contra la infección por el VIH-1 sigue siendo una tarea abrumadora. Actualmente, las estrategias de curación para la infección por VIH-1 se centran en dos enfoques distintos: la erradicación y la remisión virológica persistente o “cura funcional”.

La erradicación o cura esterilizante se centra en la eliminación casi completa de todos los virus del organismo. Dado este contexto, la posibilidad de un repunte en la carga viral cuando el TAR se interrumpe es nula. Esta condición, considerada poco viable, se describió, por primera vez, en una PVVS con leucemia que se sometió a un trasplante alogénico con células madres hematopoyéticas que presentaban la delección $\Delta 32$ en el gen CCR5, a este individuo se le conoció como el “paciente Berlin” (72).

Por otro lado, la remisión virológica persistente o “cura funcional” se define como la ausencia de replicación viral detectable a lo largo del tiempo en una PVVS sin recibir TAR. La remisión virológica persistente ha quedado bien documentada de modo natural en los controladores de élite y, mediante TAR, en los controladores postratamiento. Este modelo de curación para la infección por VIH-1 se trata de un control de la replicación viral mediada por el huésped, que en ausencia de TAR, lograría reestablecer la función inmunitaria y reducir la inflamación inducida por la infección crónica del VIH-1.

Durante la presente tesis se han abordado dos posibles estrategias con el fin de conseguir dicho objetivo.

En el capítulo 2, **“Incremento de la respuesta VIH-específica en linfocitos T a través de células dendríticas plasmacitoides estimuladas con agonistas de receptores tipo “toll” (TLR) en diversos fenotipos de progresión de la infección por VIH-1”**, mediante un ensayo *in vitro*, se ha estudiado el papel de determinados agonistas de TLR-7 y -9 como potenciadores de la funcionalidad de las pDCs. Al ser la primera respuesta del organismo frente a la infección, la inmunidad innata tiene un papel muy relevante en el control de la infección por VIH-1. Las pDCs con su potente actividad antiviral, gracias a la producción de IFN- α , y su función como célula presentadora de antígenos están consideradas un nexo entre la inmunidad innata y adaptativa. Nuestro grupo, en trabajos anteriores ya ha descrito como las pDCs presentan una mayor funcionalidad en los sujetos controladores de elite (73, 74) y que tras su estimulación específica con estas moléculas son capaces de reducir la infectividad del VHC (75). Por otro lado, los agonistas de TLR-7 y -9 ya se han usado como moléculas inmunomoduladoras demostrando un aumento en la funcionalidad de las pDCs y en la respuesta adaptativa antiviral (76). En particular, GS-9620 activa selectivamente la producción de IFN- α y citoquinas proinflamatorias (77). En este trabajo queríamos profundizar en los cambios fenotípicos y moleculares que se producen en las pDCs tras su estimulación con agonistas de TLR-7 y -9. A su vez, mediante un co-cultivo posterior con linfocitos T CD4+ y CD8+ autólogos, ver si estas pDCs previamente estimuladas eran capaces de modular la respuesta de linfocitos T frente a un conjunto de péptidos propios del VIH-1.

Finalmente, en el capítulo 3, mostramos los resultados del **“Ensayo clínico en fase II para evaluar la seguridad y eficacia de Vedolizumab combinado con TAR para**

conseguir la curación funcional en PVVS sin TAR previo". Vedolizumab es un anticuerpo monoclonal humanizado dirigido contra la forma heterodimérica de la integrina $\alpha 4\beta 7$, aprobado para el tratamiento de enfermedades inflamatorias intestinales (78, 79). Una de las rutas más usadas para el tráfico de los linfocitos T CD4+ a GALT es a través de la interacción entre la integrina $\alpha 4\beta 7$ expresada en la superficie de los linfocitos T CD4+ y la molécula de adhesión celular MadCAM-1 expresada principalmente en las vénulas del endotelio alto (80). El papel de esta integrina en la infección por VIH-1 ha sido ampliamente documentado en la última década, en la introducción del capítulo 3 hemos recogido los principales hallazgos que la postularon como una diana para la curación de la infección por VIH-1. De hecho, en 2016, se publicó la supresión virológica permanente tras la interrupción analítica del tratamiento (IAT) en macacos que recibieron una intervención conjunta del TAR y un anticuerpo monoclonal que bloqueaba la integrina $\alpha 4\beta 7$ (81). Aunque estos resultados no pudieron reproducirse posteriormente, sentaron las bases del uso de Vedolizumab en PVVS con el objetivo de alcanzar la remisión virológica permanente o "cura funcional" (82–84). En este contexto se iniciaron varios ensayos clínicos con PVVS que incluían Vedolizumab en su intervención terapéutica (85). El presente ensayo clínico fue el primero en aplicar una intervención conjunta de infusiones intravenosas mensuales de Vedolizumab junto con el TAR habitual a PVVS recientemente infectadas que no habían recibido TAR previo. Tras 24 semanas recibiendo TAR y Vedolizumab ambos tratamientos se interrumpieron, comenzando así la fase observacional del ensayo o IAT. Se realizaron dos colonoscopias con toma de biopsias en íleon y ciego antes de comenzar el tratamiento y antes de la interrupción del mismo. Todos los individuos incluidos en el ensayo se sometieron a un seguimiento mensual para la monitorización de sus niveles de linfocitos T CD4+, carga viral, concentración de fármacos, niveles de

reservorio VIH-1 y expresión de la integrina $\alpha 4\beta 7$ y otros marcadores inmunológicos mediante citometría de flujo.

HIPOTESIS Y OBJETIVOS

CAPITULO 1: Modulación de la activación y función de los monocitos durante el tratamiento con antivirales de acción directa en pacientes co-infectados con VIH-1 y VHC.

Hipótesis 1: Tras la eliminación del VHC a través de los AAD se reduce la activación de los monocitos y su función proinflamatoria .

Objetivo 1: Evaluar el fenotipo y los cambios funcionales de las tres subpoblaciones de monocitos durante la erradicación del VHC en individuos co-infectados VIH-1/VHC antes y después del tratamiento con AAD.

CAPITULO 2: Incremento de la respuesta VIH-específica en linfocitos T a través de células dendríticas plasmacitoides estimuladas con agonistas de receptores tipo “toll” en diversos fenotipos de progresión de la infección por VIH-1.

Hipótesis 2: La manipulación de la funcionalidad de las pDCs mediada por los TLR podría favorecer una respuesta efectiva de las pDCs, mediante el aumento de la respuesta VIH-1 específica mediada por linfocitos T, en sujetos infectados por VIH-1 con objeto de conseguir el control espontáneo del virus.

Objetivo 2: Estudiar la modulación de las pDCs en respuesta a agonistas de TLRs y la consecuente polarización de los linfocitos T hacia una respuesta antiviral.

CAPITULO 3: Ensayo clínico en fase II para evaluar la seguridad y eficacia de Vedolizumab combinado con TAR para conseguir la curación funcional en PVVS sin TAR previo.

Hipótesis 3: El tratamiento con Vedolizumab junto con TAR de inicio en pacientes infectados por VIH-1 es seguro y bien tolerado. Tras la interrupción del TAR y de la administración de Vedolizumab se consigue el control persistente de la carga viral plasmática.

Objetivo Principal 3: Evaluar la seguridad y eficacia de Vedolizumab combinado con TAR para conseguir la remisión de la carga viral plasmática a niveles indetectables en personas infectadas por el VIH-1 sin tratamiento antirretroviral previo tras la IAT.

Objetivo Secundarios 3: Caracterización virológica e inmunológica exhaustiva en sangre periférica y en GALT a lo largo del ensayo clínico.

CAPITULO 1

MODULACIÓN DE LA ACTIVACIÓN Y FUNCION DE LOS MONOCITOS DURANTE EL TRATAMIENTO CON ANTIVIRALES DE ACCION DIRECTA EN PACIENTES CO-INFECTADOS CON VIH-1 Y VIRUS DE LA HEPATITIS C

Parte de este capítulo ha sido publicado en:

Pablo-Bernal, Rebeca S. De; Jimenez-Leon, M. Reyes; Tarancon-Diez, Laura; Gutierrez-Valencia, Alicia; Serna-Gallego, Ana; Trujillo-Rodriguez, Maria; Alvarez-Rios, Ana I.; Milanes-Guisado, Yusnelkis; Espinosa, Nuria; Roca-Oporto, Cristina; Viciano, Pompeyo; Lopez-Cortes, Luis F.; Ruiz-Mateos, Ezequiel. Modulation of Monocyte Activation and Function during Direct Antiviral Agent Treatment in Patients Coinfected with HIV and Hepatitis C Virus. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2020; 64,9: e00773-20.

INTRODUCCIÓN

La hepatitis C es una infección del hígado causada por el virus del mismo nombre Virus de la hepatitis C (VHC). Los AAD han cambiado de forma radical el panorama del tratamiento del VHC, obteniéndose en la mayoría de pacientes tasas de repuesta viral sostenida (RVS) superiores al 90%. Las tasas de eficacia de estos tratamientos son prácticamente idénticas entre pacientes mono-infectados por VHC y co-infectados por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH-1) (86). Según los Centros para el control y la Prevención de Enfermedades (Centers for Disease Control and Prevention, CDC), en 2014 aproximadamente un 21% de las PVVS en Estados Unidos también estaban infectadas por VHC. La coinfección por ambos virus puede hacer que la infección crónica por el VHC progrese de forma más rápida presentando tasas más elevadas de cargas virales, fibrosis y descompensación hepática (87). En la infección por VIH-1, la activación inmunitaria y más concretamente la proveniente de los monocitos se ha asociado con un estatus de inflamación crónica que podría ser el causante de ENOS (31, 88). Además, la co-infección por VHC se ha asociado al desarrollo de eventos extrahepáticos en PVVS como pueden ser los eventos cardiovasculares (89). Por estos motivos, es importante saber en qué medida la erradicación del VHC puede reducir la activación de los monocitos en PVVS.

En humanos se han descrito tres subpoblaciones de monocitos en función de la expresión de los receptores de superficie CD14 y CD16: clásicos ($CD14^{++}CD16^{-}$), intermedios ($CD14^{++}CD16^{+}$) y no clásicos ($CD14^{dim}CD16^{++}$). Cabe destacar que estas subpoblaciones presentan heterogeneidad en tamaño, complejidad, expresión de receptores y funcionalidad (28, 90). Los monocitos intermedios y no clásicos poseen un perfil proinflamatorio el cual ya se ha asociado a un mayor riesgo de padecer eventos

cardiovasculares tanto en población general como en PVVS bajo TAR (91, 92). Este estado proinflamatorio se caracteriza principalmente por la producción de interleucina 6 (IL-6) y 10 (IL-10) por parte de los monocitos (20). Asimismo, existen estudios que apoyan la hipótesis de que la activación de origen monocitario puede contribuir a acelerar la fibrosis hepática en pacientes co-infectados VIH-1/VHC (93). Nuestro grupo ya publicó en 2018 que la erradicación del VHC en pacientes co-infectados VIH-1/VHC disminuía significativamente no solo la activación de los linfocitos T si no también: el marcador de translocación bacteriana lipopolisacárido (LPS), el marcador indirecto de activación de monocitos CD14 soluble (sCD14), el marcador de inflamación macrofágica y hepática CD163 soluble (sCD163) y el marcador de coagulación dímeros-D. Es importante destacar que los niveles de reservorio VIH-1 en sangre periférica de estos individuos (ADN proviral) también disminuyeron tras el tratamiento con AAD (47). Mientras que en individuos mono-infectados VHC sí se han descrito cambios en la frecuencia de las diferentes subpoblación de monocitos (94, 95), hasta el momento no se había descrito que efecto pueden tener los AAD sobre la función, activación y redistribución de las diferentes subpoblaciones de monocitos en pacientes co-infectados VIH-1/VHC. Por lo cual el objetivo del presente estudio fue evaluar el fenotipo y los cambios funcionales de las tres subpoblaciones de monocitos durante la erradicación del VHC en individuos co-infectados VIH-1/VHC.

MATERIALES Y METODOS

Sujetos del estudio

Este estudio se llevó a cabo en la unidad de enfermedades infecciosas, microbiología y parasitología del hospital universitario Virgen del Rocío (HUVR). Los participantes incluidos pertenecen a la cohorte de este hospital y se seleccionaron entre septiembre de 2017 y abril de 2018 según los siguientes criterios de inclusión: PVVS co-infectadas VIH-1/VHC con carga viral detectable para VHC, bajo TAR con carga viral indetectable para VIH-1 durante al menos los últimos seis meses. Tras doce semanas de tratamiento con AAD todos los participantes alcanzaron RVS. La RVS se definió como la presencia de una carga viral indetectable para VHC entre el tercer y sexto mes tras la finalización del tratamiento con AAD. Los participantes se trataron acorde a las recomendaciones de las guías clínicas del momento y siguiendo el mejor juicio clínico en base al genotipo VHC, los tratamientos previos frente al VHC, las posibles interacciones con TAR para VIH-1 y el estado de fibrosis hepática evaluada mediante elastografía transitoria (FibroScan; Echosens, Paris, France). El estado de cirrosis se definió con un valor de rigidez hepática ≥ 14.5 kPa (96). Los criterios de exclusión fueron estar co-infectados por el virus de la hepatitis B (VHB), presentar otra causa concomitante de enfermedad hepática, padecer alguna infección activa y haber recibido tratamiento con esteroides o inmunosupresores antes de empezar el tratamiento frente a VHC. Se incluyeron 22 participantes co-infectados VIH-1/VHC bajo TAR. Como grupo control, se seleccionaron 10 individuos mono-infectados por VIH-1 apareados por edad bajo TAR. También se incluyó una cohorte confirmatoria de muestras congeladas obtenidas antes y después del tratamiento con AAD. Estas muestras se obtuvieron de 18 individuos co-infectados VIH-1/VHC entre Abril y Diciembre de 2015. El presente

estudio fue aprobado por el comité ético del HUVR (Código de protocolo UCE-VHC-2015-1; Código interno 1050-N-15) todos los participantes dieron su consentimiento informado.

Determinaciones de laboratorio

El recuento de linfocitos T CD4+ y CD8+ se determinó antes y después de tratamiento con AAD mediante el citómetro de flujo FC500 (Beckman-Coulter, Brea, CA). La carga viral plasmática de VIH-1 se cuantificó mediante PCR cuantitativa según las instrucciones del fabricante (Cobas AmpliPrep/Cobas TaqMan HIV-1 test; Roche Molecular Systems, Basel, Switzerland) (límite de detección, 20 copias ARN VIH-1/ml). Los niveles de carga viral de VHC se determinaron también antes y después del tratamiento con AAD mediante PCR cuantitativa (Cobas TaqMan test; Roche Diagnostic Systems, Pleasanton, CA) (límite de detección 15 UI/ml).

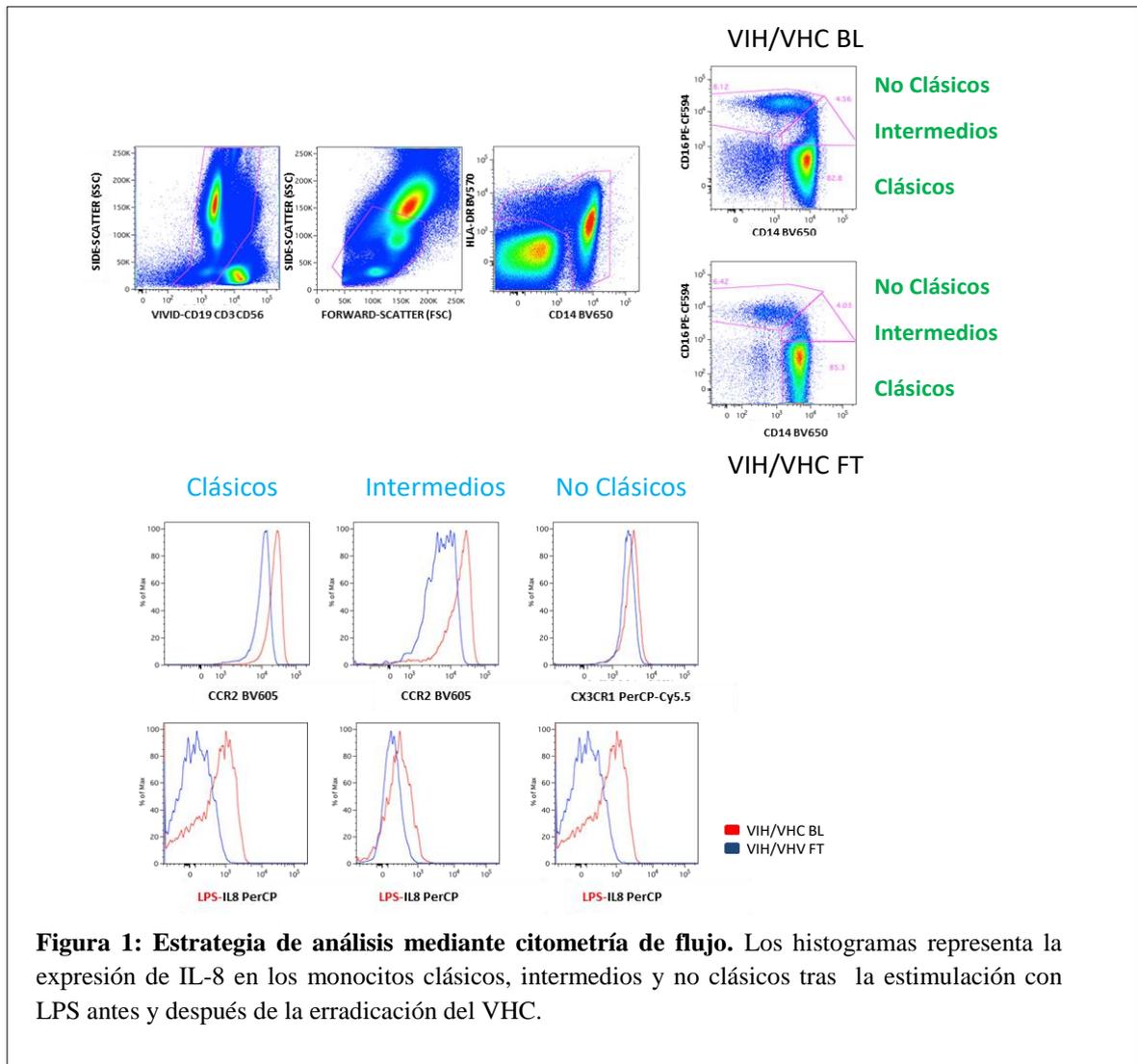
Inmunofenotipado y tinción intracelular de citoquinas en monocitos

Respecto a la cohorte confirmatoria (n=18), se usaron muestras congeladas de células mononucleadas procedentes de sangre periférica (PBMCs). Tras descongelarlas, las células fueron inmediatamente inmunofenotipadas; respecto a los ensayos de producción intracelular de citoquinas, estos no se pudieron llevar a cabo en este tipo de muestras. Para la cohorte principal (n=22), se usó 1ml de sangre total recién extraída para el inmunofenotipado, estas muestras fueron recogidas en tubos BD Vacutainer con ácido tetra-acético etilen diamina (EDTA) como anticoagulante. Los eritrocitos fueron lisados según las recomendaciones del fabricante (lyse buffer; R&D, San Diego, CA) e inmediatamente se incubaron las células con un marcador de viabilidad para excluir las células no viables y con el siguiente panel de anticuerpos: Live/Dead fixable violet

dead-cell stain (marcador de viabilidad), CD11b (Alexa Fluor 700 [AF700]), CD40 (allophycocyanin [APC]), CCR5 (allophycocyanin H7 [APCH7]), CD49d (fluorescein isothiocyanate [FITC]), TLR4 (brilliant violet [BV786]), CD62L (phycoerythrin [PE]), CD163 (phycoerythrin-cyanine 7 [PC7]), CD16 (phycoerythrin Texas Red [PETXRED]), CCR2 (BV605), CD14 (BV650), CX3CR1 (peridinin chlorophyll protein [PerCP]), HLA-DR (BV711) y CD19, CD3, and CD56 (BV510).

Los ensayos para la determinación de la polifuncionalidad *in vitro* se realizaron a partir de 1.5ml de sangre total recién extraída en tubos BD Vacutainer con EDTA como anticoagulante. Se procedió a la lisis de los eritrocitos y las PBMCs se incubaron en medio R10 (medio RPMI 1640 suplementado con 10% Suero fetal bovino, 100 U/ml penicilina G, 100µl/ml sulfato de estreptomicina y 1.7mM de glutamina sodio) con 10 U/ml de DNasa I (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) durante una hora. Tras la incubación las células se estimularon en presencia y ausencia de 0.05ng/ml de LPS durante 6 horas a 37°C y al 5% de CO₂. A todas las condiciones del cultivo se les añadió 1µg/ml de anti-CD28, 1µg/ml anti-CD49d (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) y 10µg/ml de brefeldina A (BioLegend, San Diego, CA). Tras las 6 horas de incubación se analizó el estado de activación y la producción de citoquinas intracelulares de los monocitos mediante citometría de flujo multiparamétrica (LSR Fortessa cell analyzer (BD Biosciences)). Se adquirieron un total de 2.000.000 de eventos y al menos se analizaron 20.000 en cada tubo (Figura 1). Para ello se aplicó el siguiente panel de anticuerpos: TNF- α (AF700), IL-1 α (FITC), IL-1 β (APC), CCR5 (APCH7), TLR4 (BV786), IL-6 (PE), IL-10 (PC7), CD16 (PETXRED), CCR2 (BV605), CD14 (BV650), IL-8 (PerCP), HLA-DR (BV711), and CD19, CD3 y CD56 (BV510). La capacidad de respuesta de las células *in vitro* se calculó mediante la sustracción a los resultados de la

condición no estimulada. Los datos obtenidos fueron analizados con el software de análisis FlowJo 8.7.7 (TreeStar, San Carlos, CA, USA).



Determinación de marcadores solubles

Las muestras de suero y plasma se recogieron en tubos Vacutainer de separación de suero y en tubos con EDTA como anticoagulante, respectivamente. Estas muestras se preservaron a -20°C hasta la determinación de los siguientes biomarcadores: PCR, β 2-microglobulina (B2M), dímeros-D, IL-6, TNF- α y sCD163. Los niveles de PCR y B2M se determinaron mediante inmunturbidimetría con el analizador Cobas701 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Los niveles de dímeros-D se determinaron

mediante inmunoensayo (HemosIL D-dimer HS500; Instrumentation Laboratory, Bedford, MA). La cuantificación plasmática de IL-6, TNF- α y sCD163 se realizó mediante ELISA (high sensitivity [R&D Systems, Minneapolis, MN] para IL-6 y TNF- α y sCD163 [IQproducts, The Netherland] para sCD163) según las recomendaciones del fabricante.

Cuantificación del ADN proviral VIH-1

Los niveles de ADN proviral VIH-1 se cuantificaron a partir de ADN proveniente de sangre total mediante PCR digital en gota (*“Droplet digital PCR”*; ddPCR) usando el lector Bio-Rad QX200. El ADN genómico se extrajo usando el ADN minikit (Omega; Bio-Tek) según las recomendaciones del fabricante. La concentración de ADN se midió utilizando el Qubit (Thermo Fisher Scientific) y se llevaron a una concentración de 30ng/ μ l. El lector Bio-Rad QX200 se usó siguiendo las recomendaciones del fabricante a una temperatura de hibridación de 58°C. Para aumentar la sensibilidad de la técnica se diseñaron cebadores tanto en la región gag como “long terminal repeat” (LTR). El gen somático utilizado para normalizar los resultados a copias por millón de células fue el RPP30. Los cebadores y sondas empleados fueron los siguientes:

Gag región	5'-CATGTT TTCAGCATTATCAGAAGGA-3'
	5'-TGCTTGATGTCCCCCACT-3'
	5'-VIC-CCACCCACAAGATTTAAACACCATGCTAA-BHQ1-3'
Long terminal repeat (LTR)	5'-TGTGTGCCCGTCTGTTGTGT-3'
	5'-GCCGAGRCCTGCGTCGAGAG-3'
	5'-FAM-CAGTGGCGCCCGAACAGGGA-BHQ1-3'
RPP30	5'-GATTTGGACCTGCGAGCG-3'
	5'-GCGGCTGTCTCCACAAGT-3'
	5'-VIC-CTGACCTGAAGGCTCT-BHQ1-3'

El número de copias se obtuvo mediante el análisis de los resultados obtenidos con la ddPCR con el software Bio-Rad QuantaSoft software v.1.7.4.

Análisis estadístico

Se elaboró una base de datos que contenía toda información clínica, epidemiológica y experimental de los participantes. Las variables continuas se expresaron mediante medianas y rangos intercuartílicos (RIC), las variables categóricas mediante números y porcentajes. Los test de Chi-cuadrado y U de Mann-Whitney se aplicaron para determinar diferencias entre grupos. El test de Wilcoxon se aplicó para ver diferencias a lo largo del tratamiento dentro de un mismo grupo. Las correlaciones entre variables se determinaron mediante el test de Spearman. Todos los valores se consideraron significativos cuando el valor de la $p < 0.05$. El análisis estadístico se realizó mediante el paquete de software SPSS 22.0 (SSP, Chicago, IL, USA). Se calcularon un total de 63 combinaciones de citoquinas usando el software Pestle 1.6.2 y Spice 5.2 (proporcionado por M. Roederer, NIH, Bethesda, MD). El índice cuantitativo de polifuncionalidad también se calculó empleando la versión beta 0.1.2 del software FunkyCells Boolean Dataminer, proporcionado por Martin Larson (INSERM U1135, Paris, Francia).

RESULTADOS

Características de los individuos incluidos en el estudio

Se incluyeron 22 sujetos co-infectados VIH-1/VHC apareados por edad y recuento de linfocitos T CD4+ con 10 mono-infectados VIH-1. Las características generales están reflejadas en la tabla 1, encontrando sólo diferencias en el sexo. Todos los integrantes del grupo de estudio mono-infectados VIH-1 fueron de sexo masculino mientras que en el grupo co-infectados la representación era de un 54.54% de hombres. Todos los sujetos incluidos en el estudio se encontraban bajo TAR con cargas virales indetectables para VIH-1. Los individuos co-infectados VIH-1/VHC completaron las 12 semanas de tratamiento con AAD alcanzando todos ellos la RVS.

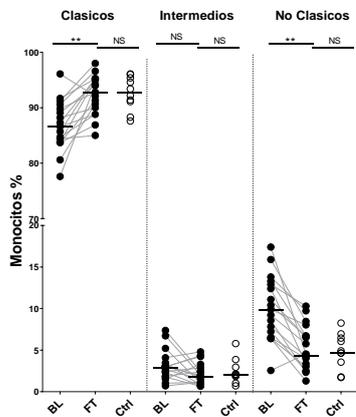
Los marcadores de activación de monocitos en individuos co-infectados VIH-1/VHC disminuyeron tras la erradicación del VHC

Tras la erradicación del VHC observamos una remodelación en las subpoblaciones de monocitos. Mientras que los niveles de monocitos clásicos aumentaron ($p=0.0003$), los no clásicos disminuyeron ($p=0.0001$) y los intermedios se mantuvieron al mismo nivel (Figura 1A). La expresión de la integrina CD49d disminuyó en las subpoblaciones de monocitos intermedios y no clásicos tras el tratamiento (Figura 2B). Además, también observamos una disminución en los marcadores de activación y adhesión celular CD40 (en monocitos clásicos y no clásicos ($p=0.004$ y $p=0.006$, respectivamente)) y CX3CR1 (en monocitos clásicos e intermedios ($p=0.009$ y $p=0.001$, respectivamente)). Tras la finalización del tratamiento con AAD, los niveles de CD49d, CD40, CX3CR1 y CCR5 fueron similares a los del grupo control mono-infectado VIH-1 en las tres subpoblaciones de monocitos (Figura 2B). La expresión de la molécula CD62L,

implicada en la migración y la adhesión celular de los monocitos aumento tras la finalización del tratamiento para VHC ($p=0.004$) hasta niveles comparables al grupo control mono-infectado VIH-1 en los monocitos clásicos. Sin embargo, los monocitos no clásicos no alcanzaron estos niveles de expresión (Figura 2B). CD62L es una de las moléculas implicadas en el rodamiento y adhesión de los monocitos a las células endoteliales de los vasos sanguíneos. La disminución de la expresión de este marcador puede promover la formación de aterosclerosis y otras enfermedades inflamatorias (97, 98). Por últimos, tras concluir el tratamiento, la expresión de CCR2 también disminuyó en los monocitos no clásicos, pero permaneció elevada en comparación con el grupo control mono-infectado VIH-1 (Figura 2B). En individuos VIH-1 se han descrito niveles elevados de CCR5, CCR2 y CD49d hasta un año antes de padecer un accidente cardiovascular (98). Respecto a otros marcadores analizados (CD11b, TLR-4, y CD163) no encontramos diferencias ni a lo largo del tratamiento ni entre los grupos de estudio con la excepción de la expresión de CD163 en los monocitos intermedios (Figura 3). La estrategia de análisis para las subpoblaciones de monocitos y de los diferentes marcadores se puede consultar en la figura 1. La misma tendencia se observó en la cohorte de confirmación ($n=18$). Los individuos incluidos en esta cohorte presentan un recuento de linfocitos T CD4+ nadir inferior y mayores niveles de cirrosis (Tabla 2). En este caso al tratarse de células criopreservadas no se pudieron analizar todos los marcadores (Figura 4). Tras el tratamiento con AAD el porcentaje de monocitos clásicos incremento significativamente ($p=0.02$). En cambio, los intermedios y no clásicos disminuyeron ($p=0.005$; $p=0.03$, respectivamente). Además, también observamos la disminución de la expresión de CCR5, CD49d, y TLR4 tras el tratamiento de AAD en los monocitos intermedios ($p=0.002$; $p=0.02$; $p=0.005$; $p=0.05$;

p=0.0004; p=0.01, respectivamente). No se encontraron diferencias en la expresión de CD11b, CX3CR1, CD40 y TLR2 (Figura 4).

A



B

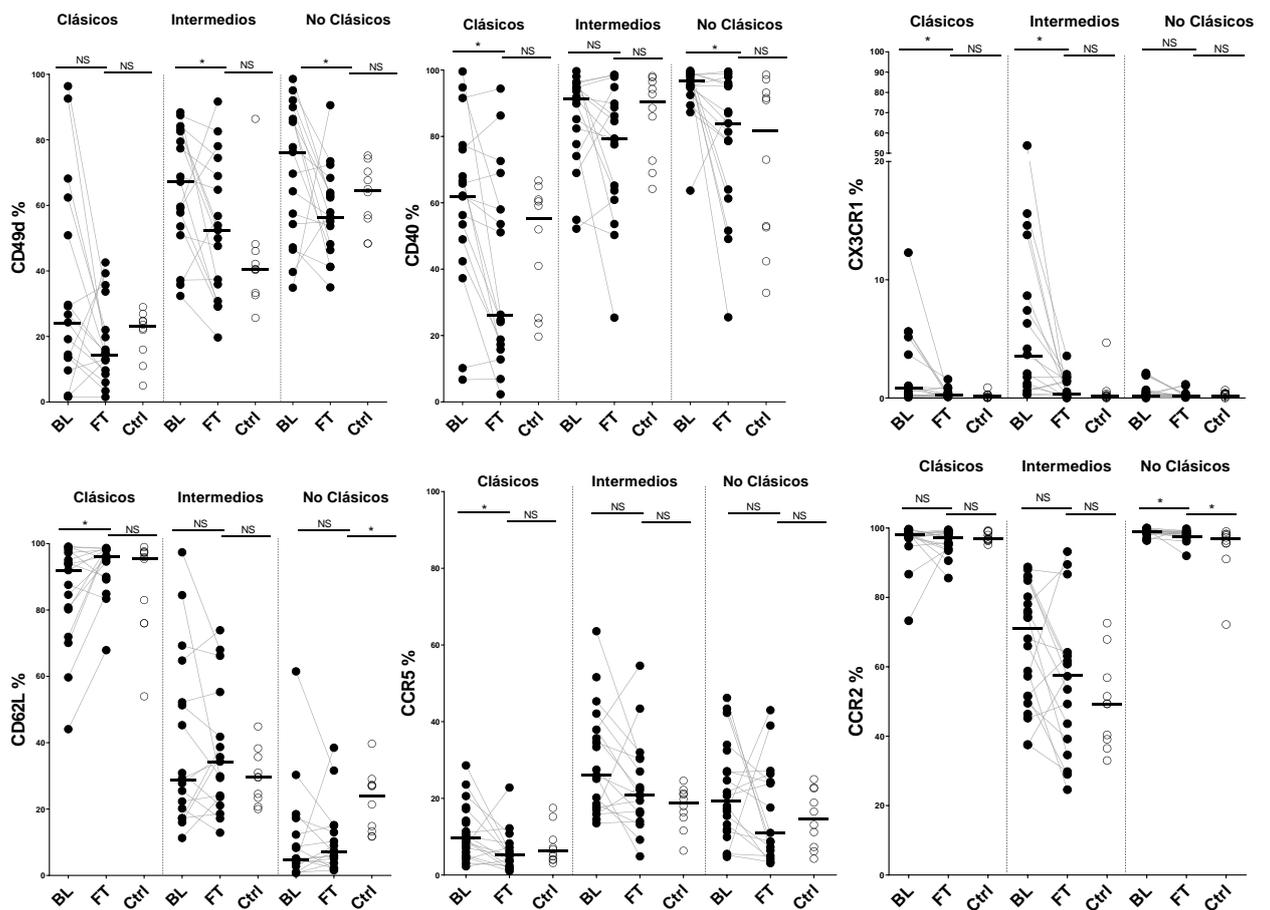


Figura 2: La erradicación del VHC reduce el fenotipo activado de los monocitos. (A) Cambios dinámicos en las frecuencias de subpoblaciones de monocitos. **(B)** Porcentaje de expresión de marcadores de superficies en pacientes co-infectados VIH-1/VHC antes y después del tratamiento con AAD y en el grupo control mono-infectado VIH-1. Significación estadística: *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

Tabla 1. Características de los participantes del estudio.

Variables	VHC/VIH-1 BL (n=22)	VHC/VIH-1 FT (n=22)	VIH-1 GC (n=10)	P valor VHC/VIH BL vs FT ^a	P valor VHC/VIH FT vs VIH GC ^b
Sexo (hombres), %	55	55	100	N.A.	0.010
Edad, (Años)	47 [44-51]	47 [44-51]	45 [37-49]	N.A.	0.176
CD4+ Nadir (células/ μ L)	172 [50-393]	172 [50-393]	297 [148-429]	1	0.190
Linf. T-CD4 ⁺ (células/ μ L)	671 [446-957]	964 [678-1112]	823 [649-1203]	0.117	0.946
Linf. T-CD8 ⁺ (células/ μ L)	1038 [607-1310]	1088 [796-1549]	1169 [983-1597]	0.327	0.588
Ratio Linfocitos T CD4+ /CD8+	0.72 [0.45-0.99]	0.86 [0.49-1.09]	0.76 [0.57-0.89]	0.983	0.436
ARN VIH-1 (Log ₁₀ copias/mL)	1.3 [1.3 - 1.3]	1.3 [1.3-1.3]	1.3 [1.3-1.3]	1	1
ARN VHC (Log ₁₀ copias/mL)	6.8 [6.2 – 7.2]	1 [1-1]	N.A.	0.020	N.A.
VHC genotipo-1 (%)	77.8	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
Estadio de Fibrosis (%)					
0-1	44.4	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
2	44.4	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
3	5.5	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
4	5.5	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
Cirrosis (%)	5.5	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.

N.A.: No aplicable. Las variables categóricas se representan como porcentajes y las continuas como medianas con sus rangos intercuartílicos. ^aEl test de Wilcoxon se empleó para ver diferencias entre la condición basal (BL) y final del tratamiento (FT) dentro de un mismo grupo. ^b Los test Chi-square test y U de Mann-Whitney se usaron para encontrar diferencias entre distintos grupos del estudio.

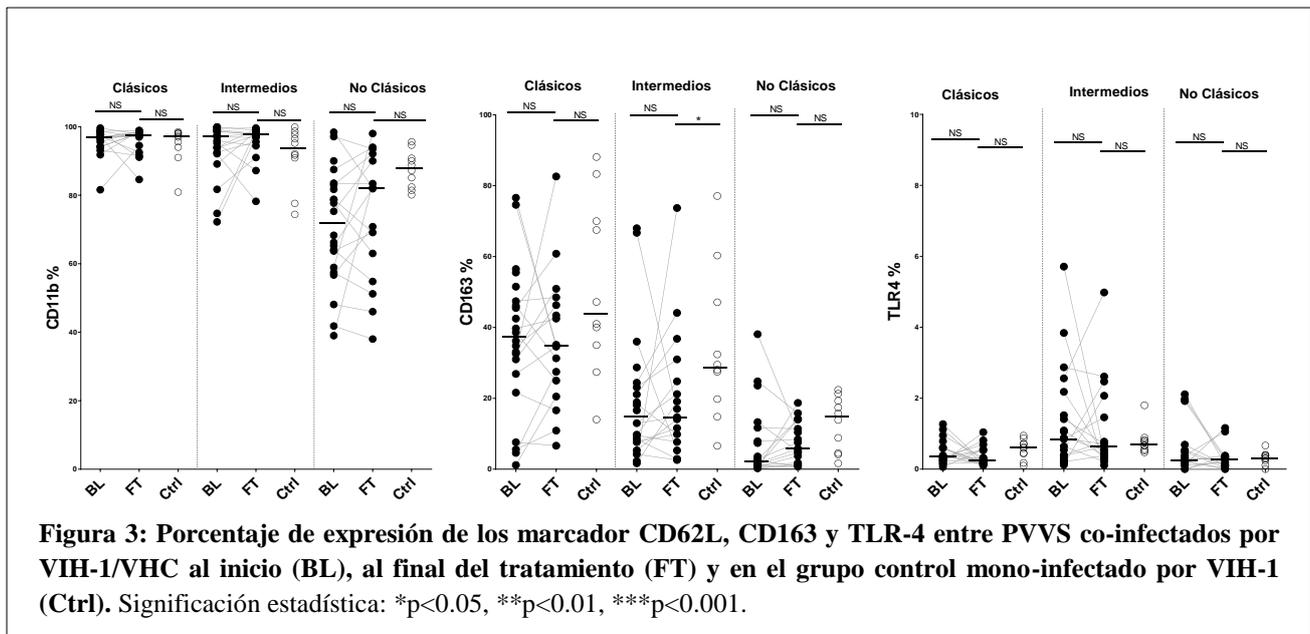
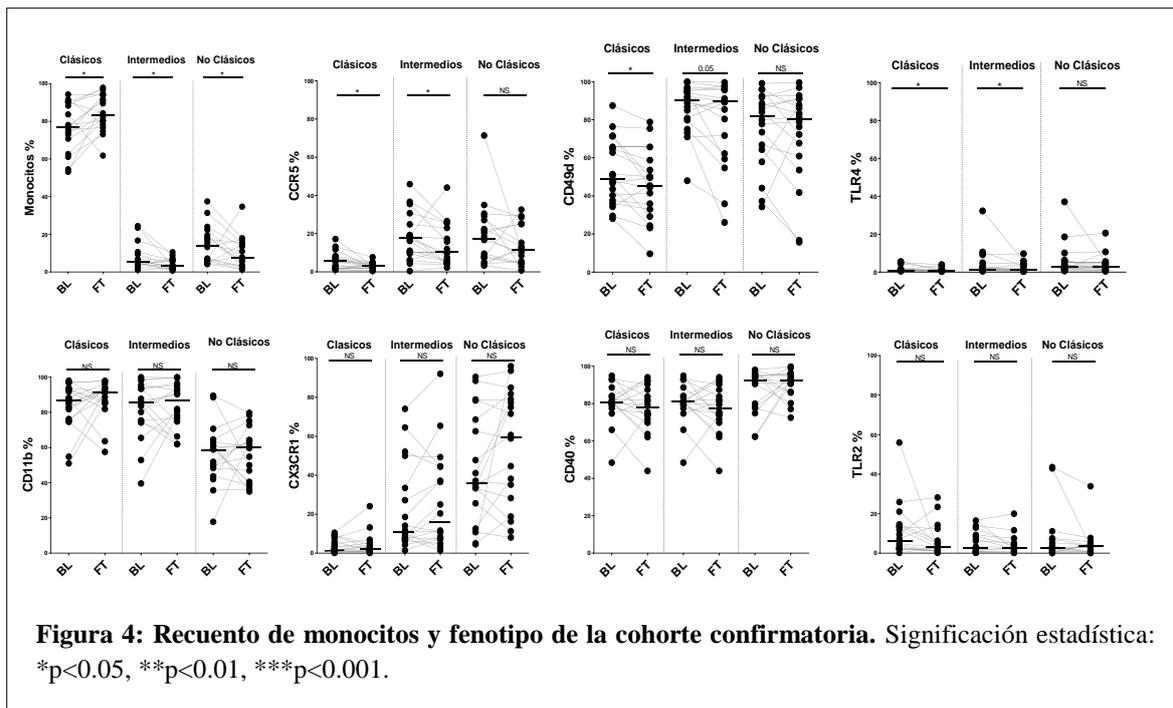


Figura 3: Porcentaje de expresión de los marcador CD62L, CD163 y TLR-4 entre PVVS co-infectados por VIH-1/VHC al inicio (BL), al final del tratamiento (FT) y en el grupo control mono-infectado por VIH-1 (Ctrl). Significación estadística: *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

Tabla 2: Características de los integrantes de la cohorte

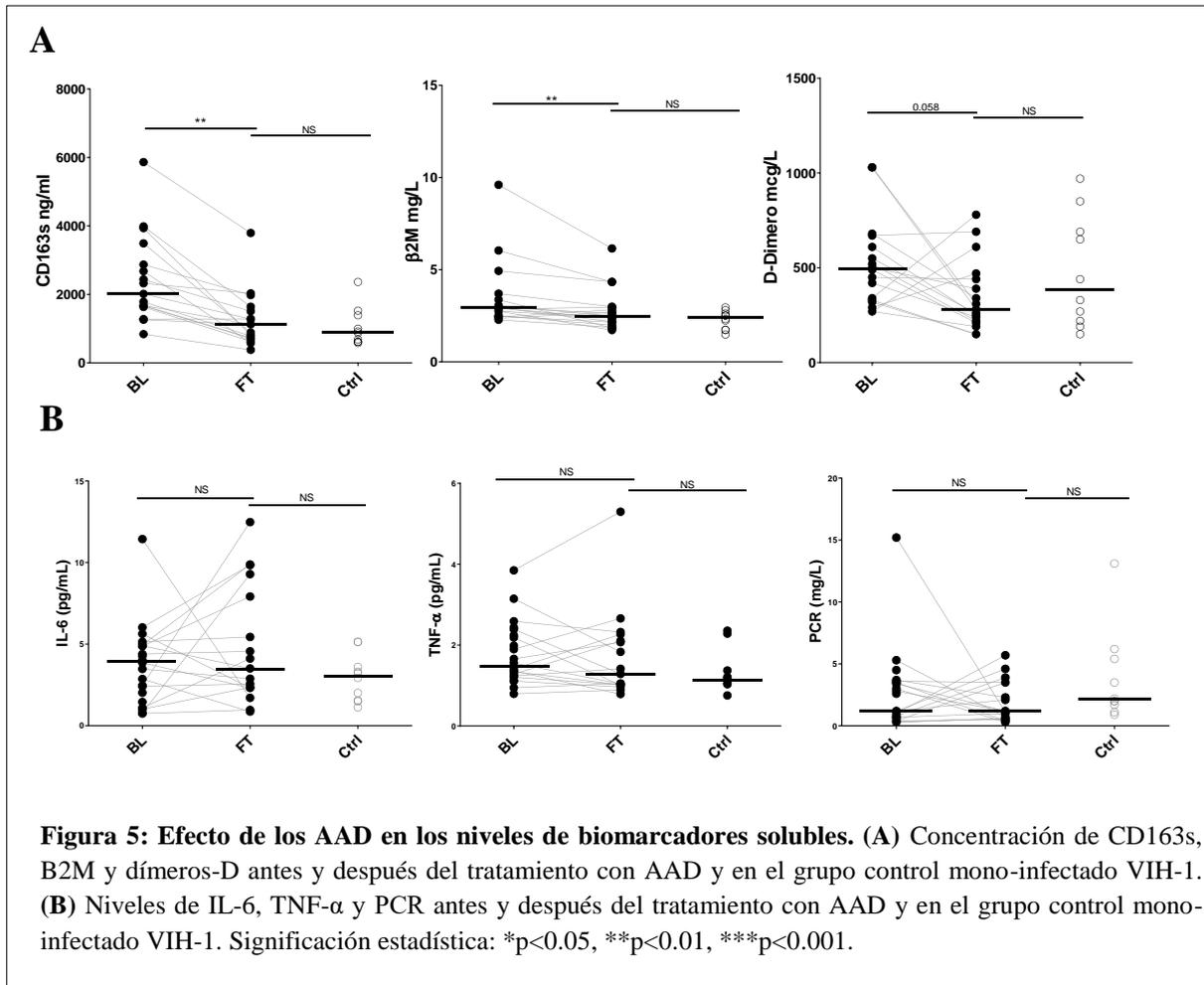
Características	VIH-1/VHC BL (n=18) <i>Cohorte confirmatoria</i>	VIH-1/VHC BL (n=22)	P Valor
Sexo (Hombres), %	83	55	0.053
Edad, años	51 [46-54]	47 [44-51]	0.186
CD4 Nadir recuento, células/ μ L	64 [19-121]	172 [50-393]	0.009
Linf. T-CD4 ⁺ Recuento, células/ μ L	637 [325-781]	671 [446-957]	0.196
Linf. T-CD8 ⁺ Recuento, células/ μ L	870 [575-1537]	1038 [607-1310]	0.701
Ratio Linf. T-CD4 ⁺ /CD8 ⁺	0.69 [0.36-0.94]	0.72 [0.45-0.99]	0.540
RNA VIH-1 (Log ₁₀ copias/mL)	1.3 [1.3-1.3]	1.3 [1.3 - 1.3]	1
RNA VHC (Log ₁₀ copias/mL)	6.4 [5.7 – 6.8]	6.8 [6.2 – 7.2]	0.020
VHC genotipo-1, %	72.2	77.8	0.714
Fibrosis, %			
0-1	38.9	44.4	0.735
2	11.1	44.4	0.026
3	16.7	5.5	0.289
4	33.3	5.5	0.035
Cirrosis, %	33.3	5.5	0.035

Se incluyeron 18 PVVS co-infectadas bajo TAR con carga viral indetectable para VIH-1 de los cuales se habían recogido muestras de PBMCs antes y después del tratamiento con AAD. Las características basales de nuestro estudio presentaban niveles más bajos de fibrosis hepática y recuento de linfocitos T CD4⁺ en comparación con los sujetos de la cohorte de confirmación.



La erradicación el VHC produce una disminución de los niveles de $\beta 2$ -microglobulina y CD163

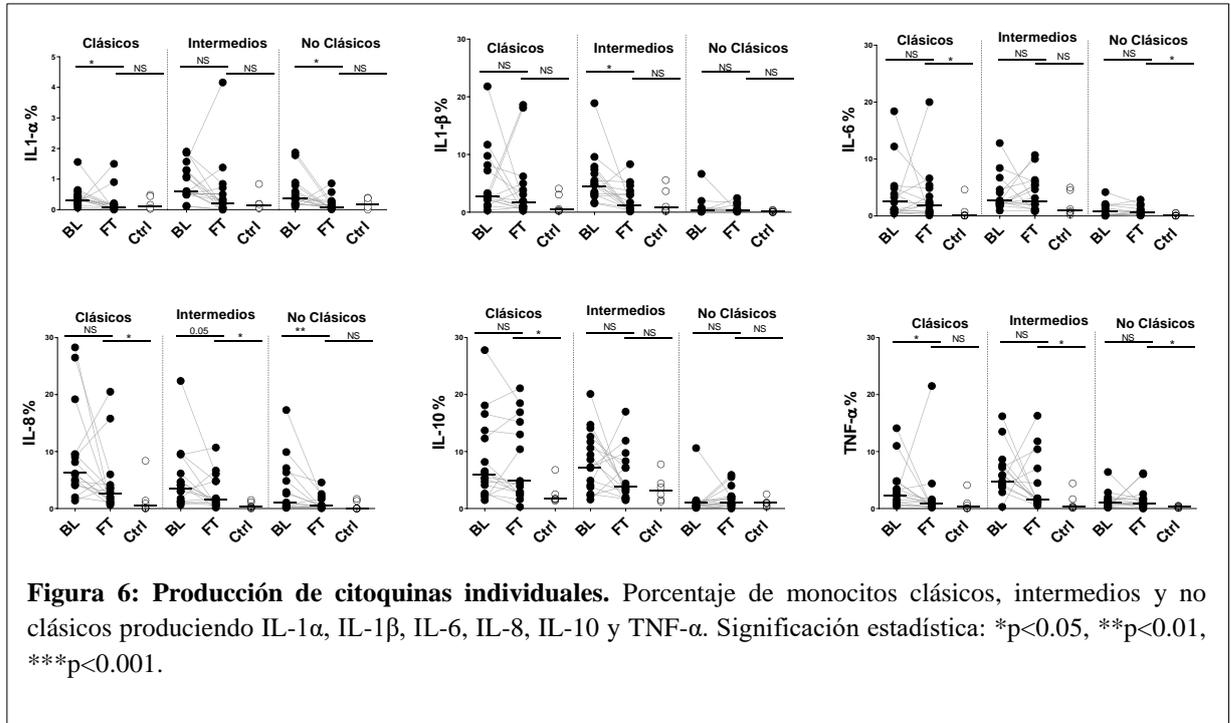
Los niveles de CD163 soluble y de B2M disminuyeron después del tratamiento con AAD alcanzando niveles similares al grupo control mono-infectado VIH-1. Aunque solo observamos una tendencia en los niveles del marcador de coagulación D-dímero a lo largo del tratamiento con AAD, no observamos diferencias entre los niveles tras el tratamiento respecto al grupo control mono-infectado VIH-1 (Figura 5A). Tras el aclaramiento del VHC tampoco encontramos diferencias en los niveles de PCR, IL-6 y TNF- α observándose niveles muy similares al grupo control mono-infectado VIH-1 (Figura 5B).



Producción de citoquinas individuales por monocitos estimulados con LPS

El siguiente paso fue analizar la capacidad de producción de citoquinas (IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 y TNF- α) por las tres subpoblaciones de monocitos en respuesta a LPS (agonista de TLR-4) (Figura 6). Tras el tratamiento con AAD no se encontraron diferencias en IL-1 α y IL-1 β respecto al grupo control mono-infectado VIH-1 en todas las subpoblaciones de monocitos. Por otro lado, no encontramos diferencias en la producción de IL-6, IL-8 e IL-10 por parte de los monocitos clásicos tras el tratamiento para VHC. De hecho, los niveles de estas interleuquinas permanecieron elevados respecto al grupo control. La producción de IL-8 y TNF- α por los monocitos intermedios también se mantuvo elevada y de la misma forma los monocitos no clásicos

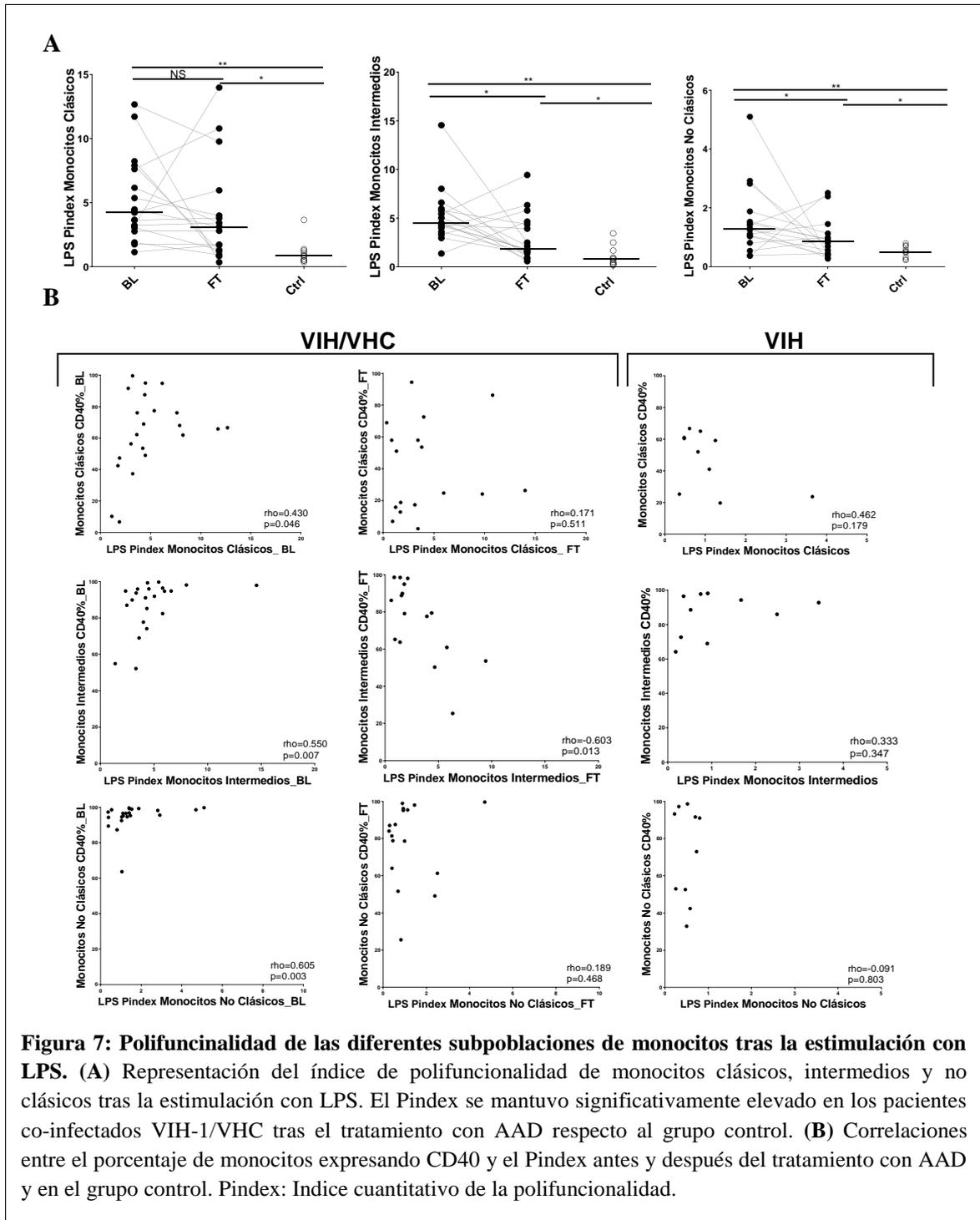
tampoco disminuyeron la producción de IL-6 y TNF- α respecto al grupo control mono-infectado VIH-1 (Figura 6). En conclusión, no todas las citoquinas alcanzaron los niveles del grupo control mono-infectado VIH-1.



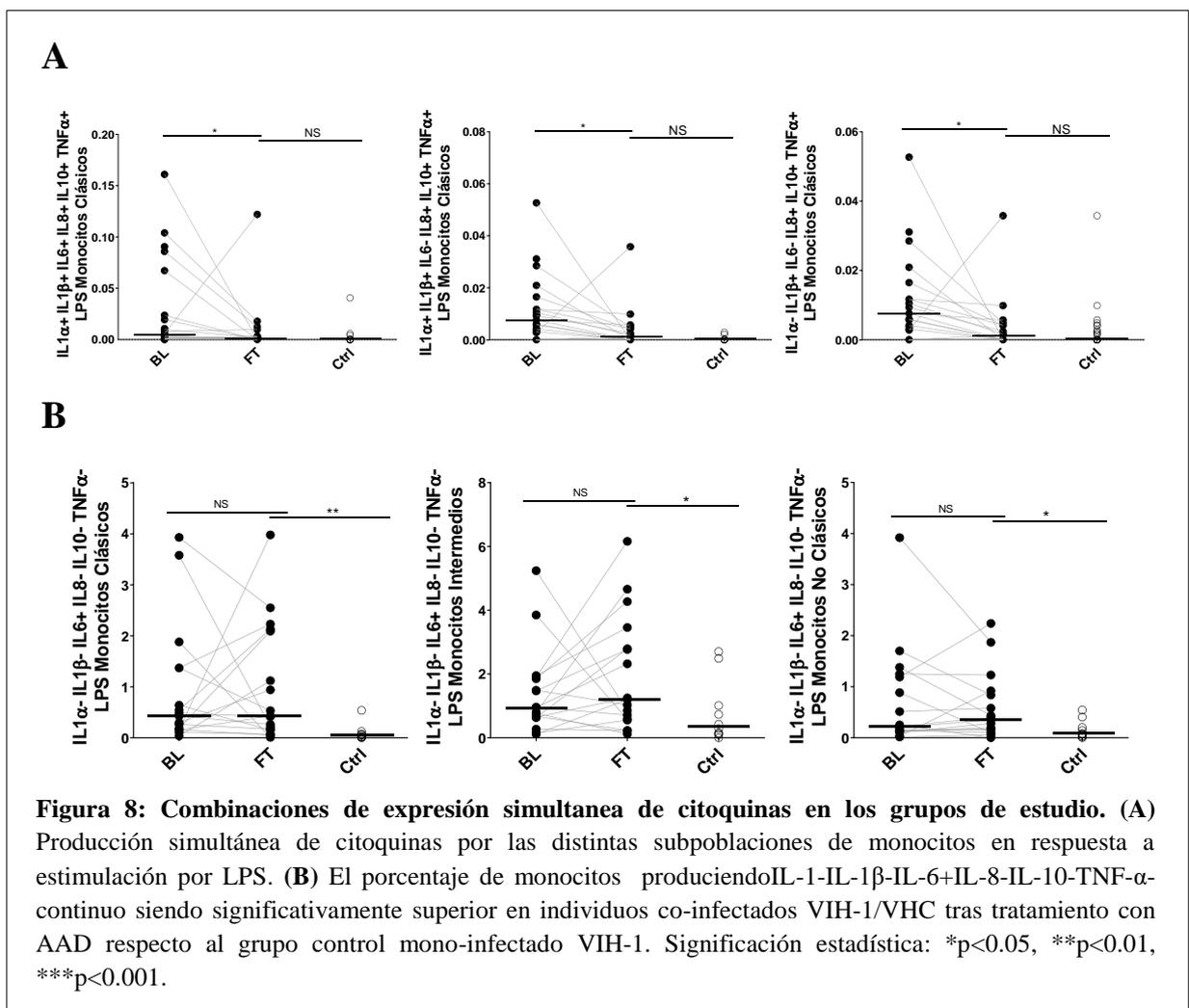
Niveles de polifuncionalidad de monocitos en respuesta a LPS tras la erradicación del VHC

Analizamos la polifuncionalidad entendida como la producción simultánea de IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 y TNF- α por las distintas subpoblaciones de monocitos tras la estimulación con LPS. El índice de polifuncionalidad, entendido como un índice numérico directamente proporcional a la producción simultánea de citoquinas o polifuncionalidad, disminuyó en los monocitos intermedios y no clásicos tras la erradicación de VHC. Sin embargo, al final del tratamiento el índice de polifuncionalidad continuaba significativamente elevado respecto al grupo control mono-infectado VIH-1 (Figura 7A). Además, observamos una correlación positiva entre el índice de polifuncionalidad y los porcentajes de monocitos clásicos, intermedios y no

clásicos expresando las moléculas coestimuladoras CD40 antes de iniciar el tratamiento con AAD. Estas correlaciones directas no se mantuvieron tras concluir el tratamiento ni las observamos en el grupo control mono-infectado VIH-1 (Figura 7B).

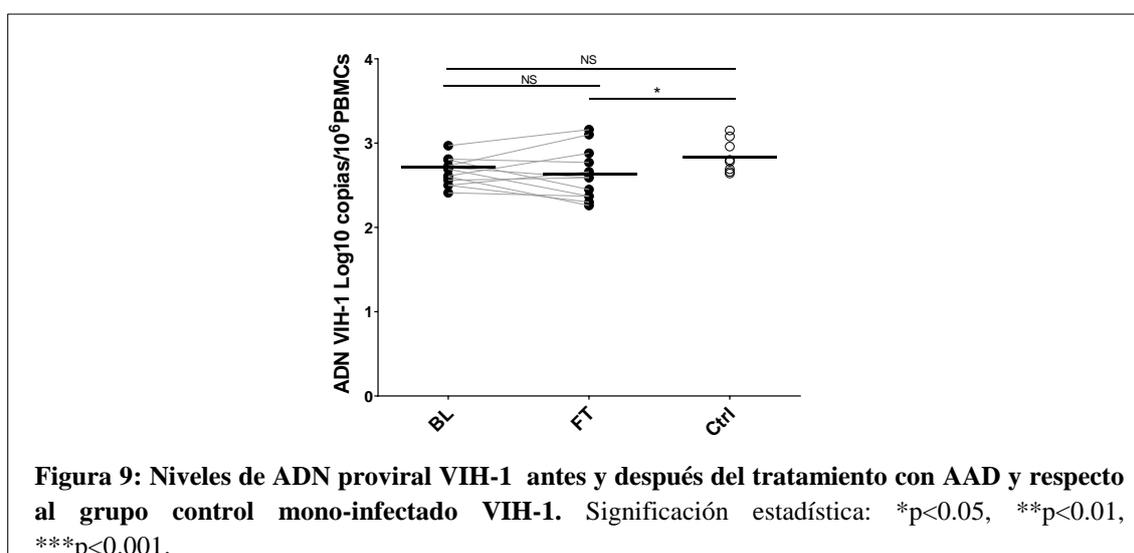


También analizamos las 63 posibles combinaciones de citoquinas tras la erradicación del VHC respecto al grupo control en las tres subpoblaciones de monocitos (Tabla suplementaria 1). A pesar de que no observamos diferencias en los valores del índice de polifuncionalidad tras el tratamiento con AAD en los monocitos clásicos, sí que detectamos una disminución de la expresión simultánea de 6, 5 y 4 citoquinas conjuntas alcanzando los niveles del grupo control tras finalizar el tratamiento (Figura 8A). Sin embargo, al mismo tiempo, los monocitos clásicos fueron los que mayores diferencias mostraron al final del tratamiento respecto al grupo control (Tabla suplementaria 1). La combinación que incluía solo la producción de IL-6 (IL-1-IL-1 β -IL-6+IL-8-IL-10-TNF- α -) se mantuvo elevada en las tres subpoblaciones de monocitos al final del tratamiento respecto al grupo control (Figura 8B).

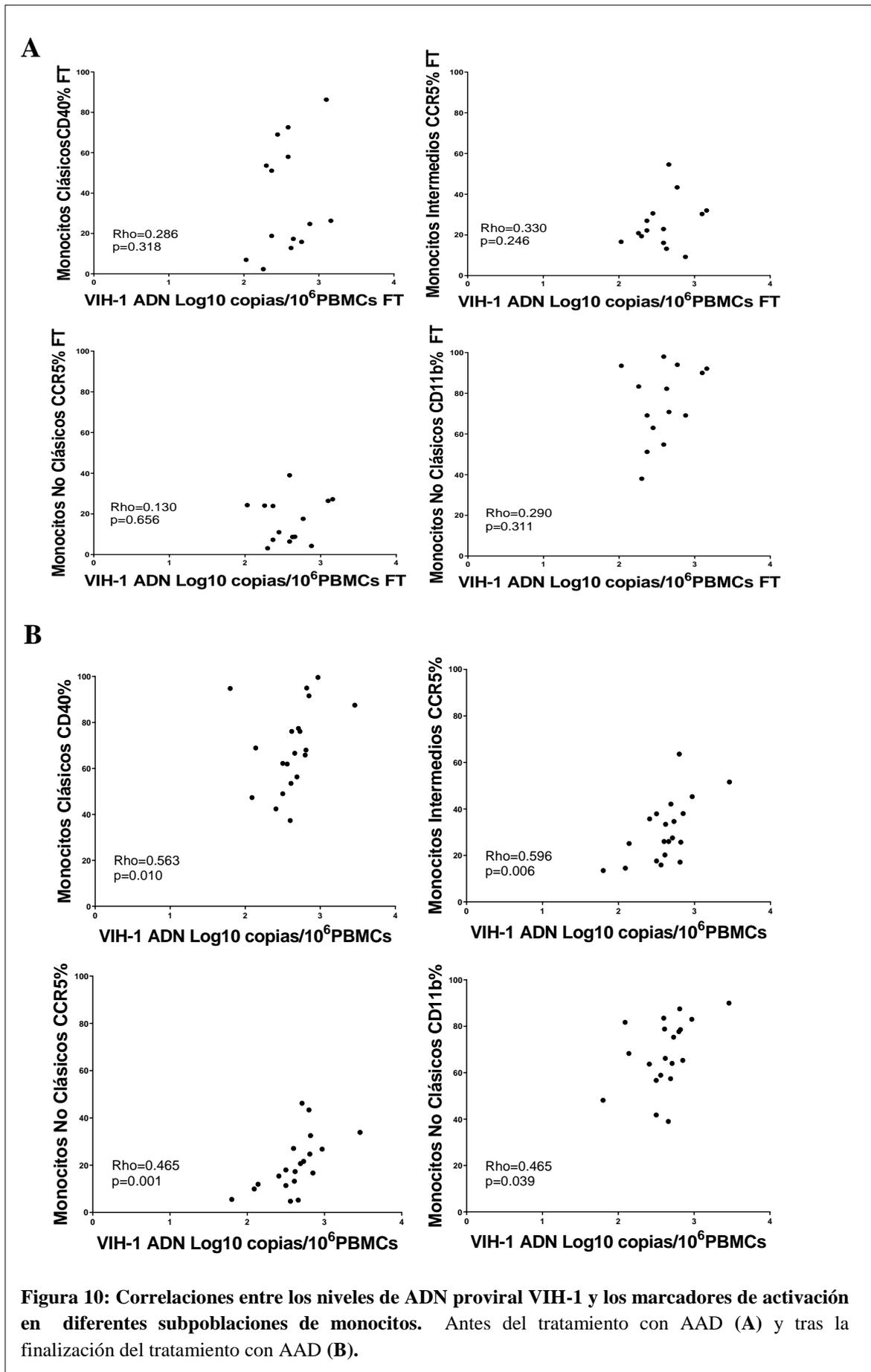


Cuantificación del ADN proviral VIH-1 tras el tratamiento con AAD

Los niveles de ADN proviral VIH-1 se mantuvieron estables a lo largo del tratamiento con AAD. A pesar de que no observamos diferencias antes y después del tratamiento con AAD en los pacientes co-infectados VIH-1/VHC, los niveles de ADN proviral fueron significativamente inferiores en este grupo respecto al grupo control mono-infectado VIH-1 (Figura 9).



Finalmente, es interesante destacar las correlaciones entre los niveles de ADN proviral y algunos biomarcadores de inflamación y activación en los pacientes co-infectados VIH-1/VHC antes de recibir el tratamiento con AAD como: la expresión de CD40 en monocitos clásicos, la expresión de CCR5 en monocitos intermedios y no clásicos y la expresión de CD11b (Figura 10A), estas correlaciones no se observaron tras el tratamiento (Figura 10B).



DISCUSION

En este trabajo se demuestra que el tratamiento con AAD es capaz de modular el fenotipo y función de los monocitos, logrando una redistribución de las subpoblaciones de monocitos con un perfil menos proinflamatorio y con una menor activación y polifuncionalidad de los monocitos. Sin embargo, a pesar de la erradicación del VHC, algunos parámetros permanecieron elevados en comparación con los sujetos mono-infectados VIH-1.

El estado de coinfección por los virus VIH-1 y VHC induce un estado de disfunción inmunitaria que conduce a un aumento de la activación inmunitaria a niveles superiores a los que presentan los sujetos infectados por VIH-1. Esto podría explicar el aumento de la inflamación y de la fibrosis hepática y el mayor riesgo de eventos cardiovasculares en individuos co-infectados (99, 100). Anteriormente nuestro grupo ya describió que la erradicación del VHC reducía la activación de los linfocitos T CD4+ y CD8+ y de biomarcadores asociados con la activación del sistema inmunitario innato (47). Los monocitos se han postulado como una posible fuente de estos biomarcadores inflamatorios; por lo tanto, es vital saber si los AAD pueden reducir la activación de los monocitos y su función proinflamatoria a través de la eliminación del VHC. Esto es aún más importante desde que estos marcadores solubles de inflamación, y no los niveles de activación de los linfocitos T, se han asociado con la presencia de ENOS en PVVS (23, 101). En este estudio hemos observado una redistribución de las subpoblaciones de monocitos hacía un perfil menos proinflamatorio, en concordancia con resultados ya publicados en individuos co-infectados VIH-1/VHC (102). Además, G. Ning *et al* obtuvieron también resultados similares en individuos mono-infectados VHC respecto a donantes sanos (95). Hay que tener en cuenta que los monocitos CD16⁺ se han asociado con riesgo a desarrollar eventos cardiovasculares en sujetos mono-infectados VHC y co-

infectados VIH-1/VHC (91, 92). Además, también hemos observado que el aclaramiento del VHC por los AAD produce una disminución en la expresión de muchos marcadores de activación como en CD49d, CD40 y CX3CR1 o el incremento en el caso de CD62L. Este perfil se aproxima a la reversión del perfil de inmunosenescencia, ya descrito, que tiene lugar en los monocitos durante el envejecimiento cronológico (29, 97). Estos resultados indican que, la infección por VHC induce un perfil de inmunosenescencia adicional al perfil de la infección por VIH-1.

Junto con los marcadores de activación de monocitos también se vieron disminuidos algunos biomarcadores solubles. Los niveles de CD163s disminuyeron tras el tratamiento con AAD y sin encontrarse diferencias con el grupo control mono infectado VIH-1. Otros estudios ya habían descrito este hallazgo pero solo con individuos mono infectados VHC (94, 103, 104). Esto puede deberse a una disminución de la activación los macrófagos hepáticos. La glicoproteína CD163 es un receptor de membrana celular expresado por la mayoría de macrófagos tisulares entre los que se encuentran en el hígado o células de Kupffer. Este receptor se desprende de la membrana celular en respuesta a LPS incrementando los niveles en suero de su forma soluble (CD163s) (104, 105). Esta mejora en los biomarcadores se ha asociado con una mejora a nivel tisular reflejada en los niveles de fibrosis hepática (106). Además, es importante destacar que los altos niveles de CD163s, dímeros-D y β 2-microglobulina se han relacionado directamente con la mortalidad durante la infección por VIH (35, 107).

En esta línea, también se ha descrito que la función del endotelio vascular se ve beneficiada por la disminución en los niveles de dímeros-D y en la activación de los monocitos tras la erradicación del VHC por los AAD (108). Todos estos resultados muestran la multitud de efectos beneficiosos no solo hepáticos que tiene erradicar el

VHC, especialmente en la disminución del riesgo cardiovascular y para la mejora del daño cognitivo (102).

Una forma de analizar la funcionalidad de los monocitos es mediante la caracterización de la producción intracelular de citoquinas en respuestas a estímulos. La producción simultánea de múltiples citoquinas por los monocitos se denomina polifuncionalidad, en este caso el estímulo utilizado fue LPS (20, 93). En general, y en concordancia con los resultados observados en el fenotipo, hemos encontrado una disminución de la polifuncionalidad en respuesta a LPS tras el tratamiento con AAD. Muchas de las combinaciones de citoquinas disminuyeron. Sin embargo, el Pindex no llegó a igualarse en ninguna de las subpoblaciones de monocitos respecto a los participantes mono-infectados VIH-1. De hecho, algunas combinaciones que incluían la expresión única de TNF- α , IL-6 e IL-10 permanecieron elevadas en las tres subpoblaciones de monocitos respecto a los individuos mono-infectados tras la erradicación del VHC. Estos resultados coinciden con los observados al analizar la producción individual de citoquinas donde los niveles de TNF- α , IL-6 e IL-10 permanecieron elevados en todas las subpoblaciones. Este perfil anormal de producción de citoquinas es similar al encontrado en la desregulación que se origina en los PVVS mono-infectados en comparación a donantes sanos apareados por edad (20). Nuestros resultados muestran ese perfil exacerbado de producción de citoquinas incluso tras la erradicación del VHC, sin embargo, no encontramos diferencias en los niveles plasmáticos de estas citoquinas. Los niveles plasmáticos de IL-6 se han considerado un potente marcador predictivo de la progresión en la infección por VIH-1 debido tanto a la progresión a SIDA como al desarrollo de ENOS (36, 109).

También analizamos los niveles de ADN-VIH-1 asociado a células sin encontrar una disminución de los niveles tras la erradicación del VHC. Sin embargo, en un estudio

anterior sí que observamos una disminución de estos tras el tratamiento con AAD (47). Esta discrepancia también la hemos detectado en la literatura (47, 94, 110). Se ha descrito anteriormente que los individuos co-infectados VIH-1/VHC poseen mayores niveles de ADN-VIH-1 proviral respecto a los individuos mono-infectados VIH-1 (111). Presumiblemente se cree que este aumento en los niveles de reservorio puede deberse a un aumento en la activación inmunitaria, incluyendo niveles muy elevados de inflamación hepática que se traduce en un aumento de fibrosis hepática. Esto puede explicar las diferencias encontradas en los niveles de inflamación y activación inmunitaria de las diferentes cohortes de individuos estudiadas. En nuestro estudio anterior (47), los sujetos presentaban niveles más elevados de cirrosis. Esto puede explicar los niveles más altos de ADN de VIH-1 asociado a células y de activación antes del tratamiento con AAD, lo cual le confiere un rango más amplio para disminuir estos niveles. Sin embargo, los individuos con bajos niveles de inflamación tendrán también niveles más bajos de ADN de VIH-1 asociado a células, como es el caso de la cohorte incluida en este estudio. De hecho, tras concluir el tratamiento con AAD nuestra cohorte alcanza incluso niveles más bajos que el grupo control de PVVS monoinfectadas VIH-1. Sin embargo, es importante destacar que algunas asociaciones entre marcadores de activación de monocitos y el reservorio periférico de ADN solo se observaron antes del tratamiento con AAD. Estas asociaciones sugieren una relación directa entre la activación de monocitos y la preservación del reservorio ADN del VIH-1 en condiciones de niveles elevados de activación inmunológica, como puede ser la condición de co-infección por VHC.

Este estudio presenta algunas limitaciones. No se realizó un seguimiento más amplio de los participantes tras el tratamiento. Por lo cual, no sabemos si los parámetros que continúan elevados se terminan normalizando con el tiempo. Además, al no poseer un

grupo de individuos no infectados, no podemos saber si los niveles de activación de monocitos tras el tratamiento se normalizan a niveles de individuos no infectados con VIH-1 o VHC. Anteriormente, si hemos encontrado diferencias en el nivel de activación de los monocitos de PVVS mono-infectadas e individuos no infectados por VIH-1 (92). Aunque la no normalización y algunos parámetros respecto a individuos mono-infectados VIH-1 ya nos vaticina que seguramente nuestra cohorte presente niveles de activación de monocitos superiores a individuos no infectados. Este estudio está restringido a individuos con bajo grado de fibrosis. Sin embargo, incluso en esta cohorte hemos podido observar una disminución de la activación de monocitos como consecuencia de la erradicación del VHC.

Podemos concluir, por lo tanto, que la erradicación del VHC como consecuencia al tratamiento con AAD en PVVS bajo TAR con carga viral indetectable ejerce un efecto anti-inflamatorio en las distintas subpoblaciones de monocitos. Sin embargo, no se produce una completa normalización de todos los parámetros en relación a individuos mono-infectados VIH-1. Estos resultados generan conocimiento sobre los efectos deletéreos que la infección por VHC y la importancia de su erradicación para disminuir el riesgo de desarrollar ENOS en este grupo de PVVS.

CAPITULO 2

INCREMENTO DE LA RESPUESTA VIH-ESPECÍFICA EN LINFOCITOS T A TRAVÉS DE CÉLULAS DENDRÍTICAS PLAMACITOIDES ESTIMULADAS CON AGONISTAS DE RECEPTORES TIPO “TOLL” EN DIVERSOS FENOTIPOS DE PROGRESIÓN DE LA INFECCIÓN POR VIH-1.

Parte de este capítulo ha sido publicado en:

Maria Reyes Jimenez-Leon, Carmen Gasca-Capote, Laura Tarancon-Diez Beatriz Dominguez-Molina, Macarena Lopez-Verdugo, Ryan Ritraj, Ana I. Alvarez-Rios Ana, Joana Vitalle, Sara Bachiller, Alberto Perez-Gomez, Nuria Espinosa, Cristina Roca-Oporto, Mohamed Rafii-El-Idrissi Benhnia, Alicia Gutierrez-Valencia, Luis F. Lopez-Cortes LF, Ezequiel Ruiz-Mateos. Agonists Enhance HIV-Specific T-Cell Response Mediated by Plasmacytoid Dendritic Cells in Diverse HIV-1 Disease Progression Phenotypes, 01 July 2022, PREPRINT available at Research Square [<https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1741647/v2>]

INTRODUCCIÓN

El TAR para la infección contra el VIH-1 ha incrementado radicalmente la supervivencia de las PVVS (15, 112). A pesar de que los tratamientos actuales son altamente efectivos a la hora de suprimir la replicación viral, el reservorio latente del virus persiste y conduce a un rápido aumento de la carga viral cuando este se interrumpe (113). Este reservorio se encuentra principalmente en los linfocitos de memoria T CD4+ en los cuales el virus está transcripcionalmente silenciado y no puede ser detectado por el sistema inmunitario del individuo (114). En los últimos años se han realizado muchos esfuerzos para entender como potenciar los efectos de la inmunidad adaptativa frente al virus con el objetivo de eliminar este reservorio. Sin embargo, se ha prestado menos atención a los elementos que componen el nexo de unión entre la inmunidad innata y la adaptativa. El sistema inmunitario innato constituye la primera línea de defensa del organismo frente al virus y el control de la infección. Las pDCs, que representan menos del 1% de las PBMCs, juegan un papel fundamental en la comunicación entre la inmunidad adaptativa e innata. Las pDCs son las principales productoras de interferón tipo I (IFN- α , β , ϵ , κ y ω) tras la estimulación de los TLR -7 y -9, confiriéndoles una gran actividad antiviral (115). Estos TLR son receptores intracelulares que reconocen ácidos nucleicos de origen microbiano e inducen rápidamente una respuesta inmunitaria caracterizada por la producción de citoquinas de fase aguda y determinados factores antivirales (116). La producción de IFN-I activa los factores de restricción antivirales (117, 118) y también interviene en la activación de otros tipos celulares como las células asesinas naturales (NK) o las mDCs (119). Las pDCs se han asociado también con el control espontáneo de la infección por VIH-1 mediante la producción de IFN- α y la inducción de la apoptosis de los linfocitos T CD4+ infectados por VIH-1 (73, 74).

Además, en estudios anteriores hemos observado como el IFN- α producido por las pDCs tras la estimulación de los TLR-7 y -9 disminuía la infectividad del VHC (75). Estas pDCs estimuladas a través de los TLR-7 y -9 exhibían un fenotipo maduro activado, con un aumento en la expresión de marcadores relacionados con la presentación antigénica y la migración a ganglios linfáticos (75). Por lo tanto, una mejor caracterización de cómo este tipo de estimulación dirigida a través de los TLR sobre las pDCs puede modular la actividad de los linfocitos T produciendo una respuesta antiviral más efectiva es esencial para el desarrollo de las estrategias de erradicación del VIH-1. Los agonistas de TLR-7 y -9 se han usado recientemente como moléculas inmunomoduladoras demostrando un aumento en la funcionalidad de las pDCs y en la respuesta adaptativa antiviral. Buitendijk et al. En estudios *in vitro* con PBMCs, han observado que los agonistas de TLR-3, TLR-7, TLR-8 y TLR-9 pueden inhibir la infección por VIH-1 e inducir la expresión de genes estimulados por IFN- α (ISGs) (76). GS-9620 es un potente agonista oral de TLR-7 que activa selectivamente la producción de IFN- α y citoquinas proinflamatorias (77). Se ha documentado recientemente que la administración oral de un análogo de GS-9620 en macacos infectados por el virus de la inmunodeficiencia de simios (SIV) bajo TAR reducía el contenido de ADN viral en los tejidos linfoides y tras la IAT se establecían “set points” virales muy bajos (120). Además, en el modelo de macacos infectado por SHIV (virus quimera, del inglés *simian-human immunodeficiency virus*) la co-administración de GS-9620 junto con el potente anticuerpo neutralizante PGT121 retrasaba el rebote de la carga viral e inducía el control del virus tras la IAT en el 55% de los monos (121). Recientemente un estudio en humanos también mostraba que GS-9620 podía contribuir a un modesto retraso en el rebote de la carga viral tras la IAT (122). Los mecanismos celulares y moleculares por los cuales la estimulación mediada por TLR puede modular la replicación del VIH-1 no

están del todo claros. En este estudio hemos diseñado un sistema de co-cultivos con pDCs (previamente estimuladas con agonistas de TLR-7 y -9) con linfocitos T autólogos procedentes de PVVS con diversos fenotipos clínicos para incrementar los conocimientos sobre estos mecanismos. El objetivo de este trabajo era investigar como los agonistas de TLR-7 y-9 pueden servir como potenciadores de la actividad de la pDCs y consecuentemente incrementar la respuesta específica antiviral de los linfocitos T.

MATERIALES Y MÉTODOS

Características de los participantes del estudio

Este proyecto se desarrolló en la unidad de enfermedades infecciosas y microbiología del Hospital Universitario Virgen del Rocío (Sevilla, España). Las PVVS que participaron en este estudio pertenecen a la cohorte de dicha unidad y se clasificaron en función de la progresión clínica de la infección por VIH-1 en cuatro grupos:

- 1) PVVS Controladores de Elite (EC): Este grupo se definió como PVVS con carga viral indetectable (<40 copias ARN-VIH-1 /ml) sin recibir TAR durante al menos el último año.
- 2) PVVS Virémicos (VIR): Definidos como PVVS que nunca han recibido TAR con carga viral elevada por encima de $-1 \cdot 10^4$ copias ARN-VIH /ml
- 3) PVVS Respondedores Inmunológicos (IR): Individuos bajo TAR con carga viral indetectable (<40 copias ARN-VIH-1 /ml) y con un recuento de linfocitos T CD4+ por encima de 350 células/mm³ durante los últimos seis meses como mínimo.
- 4) PVVS No Respondedores Inmunológicos (INR): Individuos bajo TAR con carga viral indetectable (<40 copias ARN-VIH-1/ml) pero que no han conseguido recuperar con un recuento de linfocitos T CD4+ por encima de 350 células/mm³ en los últimos dos años.
- 5) Donantes Sanos (HD): También se incluyó un grupo de individuos no infectados, seronegativos para VIH-1 y VHC procedente del centro regional de transfusiones sanguíneas y banco de tejido de Sevilla-Huelva (Sevilla, España)

Todos los participantes firmaron su correspondiente consentimiento informado antes de la extracción de sangre. El estudio fue aprobado por el comité ético del Hospital Universitario Virgen del Rocío (Código Interno: 0628-M1-21, Código del estudio: PI19/01127).

Determinaciones de laboratorio

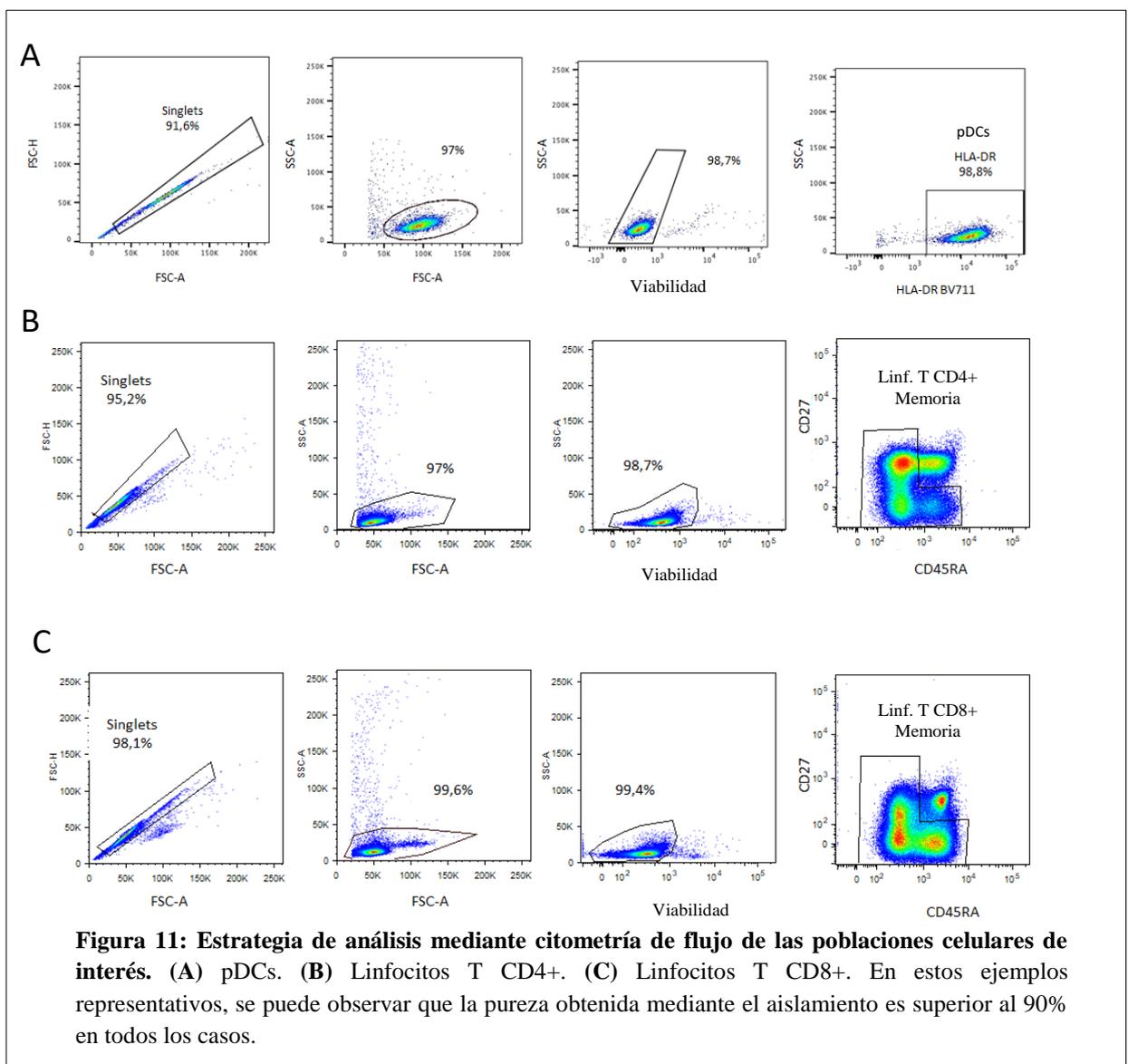
El recuento de linfocitos T CD4+ y CD8+ se realizó mediante el citómetro de flujo FC500 (Beckman-Coulter, Brea, CA). Los niveles plasmáticos de carga viral ARN-VIH-1 se cuantificaron mediante PCR cuantitativa (Cobas AmpliPrep/Cobas TaqMan HIV-1 test; Roche Molecular Systems, Basel, Switzerland) (Límite de detección: 40 copias ARN VIH-1/ml). La carga viral ARN-VHC se cuantificó mediante PCR (COBAS Amplicor, Roche Diagnosis) con un límite de detección de 10 IU/ml. La exposición al VHC, determinada por la presencia de anticuerpos anti-VHC, se detectó usando un ELISA específico de VHC (Siemens Healthcare Diagnosis, Malven, Pennsylvania, USA). Todos estos procedimientos se realizaron según las recomendaciones del fabricante.

Determinaciones de marcadores solubles

Las muestras de suero se recogieron en tubos separadores de suero y las de plasma en tubos con EDTA. Tanto los sueros como los plasmas fueron preservados a -20°C hasta la determinación de los siguientes marcadores: PCR, B2M y dímeros-D. Los niveles de PCR y B2M se determinaron mediante un ensayo en suero de inmunoturbidimetría usando el analizador Cobas 701 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Los dímeros-D se cuantificaron mediante un inmuensayo automatizado (HemosIL D-dimer HS 500; Instrumentation Laboratory, Bedford MA). Todos los ensayos se desarrollaron según las instrucciones del fabricante.

Aislamiento y cultivo de leucocitos en sangre

Los experimentos se desarrollaron en PBMCs aislados mediante gradiente de densidad con ficoll a partir de 450ml de sangre total. Los linfocitos T CD4+, CD8+ y las pDCs se obtuvieron mediante aislamiento negativo (pureza >90%) a partir de PBMCs usando los kits de aislamientos EasySep Human CD4+, EasySep Human CD8+ T-cell y EasySep Human Plasmacytoid DC enrichment kit (Stem Cell) respectivamente y siguiendo las instrucciones del fabricante (Figura 11).



Estimulación de las pDCs y co-cultivo

Para las estimulaciones de pDCs con agonistas de TLR-7 y -9 se cultivaron 2×10^5 pDCs aisladas en medio R10 (RPMI 1640 suplementado con suero fetal bobino al 10% y 1% de penicilina-estreptomicina L-glutamina) en presencia y ausencia de:

- **AT-2:** VIH-1 inactivado con alditriol-2. Agonista de TLR-7. (AT-2, 20 ng/ml)
- **CpG-A:** CpG-ODN 2216 clase A. Agonista de TLR-9. InvivoGen (CpG-A, 1Mm)
- **CpG-C:** CpG-ODN M362 clase C. Agonista de TLR-9. InvivoGen (CpG-C, 1Mm)
- **GS-9620:** Agonista TLR-7. Cayman Chemical Company. (GS-9620, 10ng/ml)

El agonista de TLR-7, AT-2 fue amablemente suministrado por el Dr. Jeffrey Lifson del National Cancer Institute, Frederick, EEUU.

Las pDCs estuvieron en cultivo con estos agonistas durante 18h (*Overnight*, ON) a 37°C y un 5% de CO₂. Tras este tiempo de incubación, las pDCs estimuladas y no estimuladas se co-cultivaron con linfocitos T CD4⁺ o CD8⁺ autólogos en una ratio 1:20. Todas las condiciones del co-cultivo fueron estimulados con anti-CD28 (1µg/ml), anti-CD49d (1µg/ml), brefeldina A (BFA) (10µg/ml) y monesina (0.7µg/ml). También se sometió al co-cultivo a la presencia y ausencia de un pool de péptidos GaG específicos de VIH-1 (NIH AIDS Research and Referenced Reagent Program <https://www.hivreagentprogram.org/>) durante seis horas a 37°C y 5%CO₂. Justo al principio del cultivo también se añadió el anticuerpo monoclonal conjugado con el fluorocromo BV605 CD107a.

Análisis de expresión génica en las pDCs

Tras la incubación ON, parte de la pDCs se destinaron al co-cultivo con linfocitos T CD4+ o CD8+ y parte al análisis de la expresión génica y cuantificación de citoquinas. Los cultivos fueron centrifugados congelando por separado pellet (análisis genético) y sobrenadantes (perfil de citoquinas) a -80°C. Los pellets se descongelaron y se lisaron con el kit de lisis *Real Time ready Cells Lysis Kit* (Roche). La síntesis de cDNA se realizó inmediatamente después de la lisis con el kit *Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit* (Roche) según las recomendaciones del fabricante. Se diseñaron cebadores específicos para la cuantificación mediante PCR de los siguientes genes: IFN- α , IRF-3, IRF-7, IFNL3, TLR-7, TLR-9, TRIM5 α , TNF- α , BST-2, HDAC6, APOBEC3G, SAMHD1 y TRAIL (Tabla 3). Las PCR cuantitativas se realizaron en Roche Light Cycler 480. Los valores se normalizaron según el método delta-delta CT ($2^{2-\Delta\Delta Ct}$).

Tabla 3: Secuencia de los cebadores y sondas utilizados para el análisis de la expresión génica de las pDCs aisladas y estimuladas con agonistas de TLR.

IRF3	5'-GAGGTGACAGCCTTCTACCG-3'
	5'-TGCCTCACGTAGCTCATCAC-3'
	FAM-TCTTCCAGCAGACCATCTCC-BBQ
IRF7	5'-AGGTGAGACCAGAGCCTCAA-3'
	5'-CTAGGTGCACTCGGCACAG-3'
	Cy5-TACACCGGGTCACTGACAGA-BBQ
IFNL3	5'-CTGCTGAAGGACTGCAAGTG-3'
	5'-GAGGATATGGTGCAGGGTGT-3'
	Cy5-ACGCTGAAGTTTCTGGAGG-BBQ
IFN α	5'-GGGATGAGACCCTCCTAGACAAATT-3'
	5'-ACACAGGCTTCCAGGTCA TTCAG-3'
	FAM-CTGCACCGAACTCTAC-BBQ
TNF α	5'-TCCTTCAGACACCCTCAACC-3'
	5'-AGGCCCCAGTTTGAATTCTT-3'
	FAM-GATTCAGGAATGTGTGGCCT-BBQ
TLR7	5'-CCTTGAGGCCAACAACATCT-3'
	5'-GTAGGGACGGCTGTGACATT-3'
	FAM-CTCTACCTGGGCCAAAAGTGG-BBQ
TLR9	5'-GCTAGACCTGTCCCACAATAA-3'
	5'-CAAGTCCAGCCAGATCAAA-3'
	FAM-ACAACAACATCCACAGCCAA-BBQ
Trim5 α	5'-GAGAGACATCCTGGACTGGG-3'
	5'-TGAAGCAGCTCCATCACTGA-3'
	Cy5-AACTGAGATGGTGCAGCAGA-BBQ
BST2	5'-TGCTGGGGATAGGAATTCTG-3'
	5'-TCAGCTCTTGTGTCAGGAGA-3'
	FAM-GGGGTGCCCTTGATTATCTT-BBQ
HDAC6	5'-AAGTAGGCAGAACCCCAAGT-3'
	5'-GTGCTTCAGCCTCAAGGTTT-3'
	Cy5-CAGTGTCACCTCGAAGCGAA-BBQ
SAMHD1	5'-AGCGATTGGTTCAAATCCAC-3'
	5'-TCGATTGTGTGAAGCTCCTG-3'
	FAM-AATGATCCTATCCATGGCCA-BBQ
APOBEC3G	5'-GAGCGGCCTGTCTTTATCAG-3'
	5'-TGCTCCAAGCTTCTGGTTTT-3'
	Cy5-GGAGGTCACCTTAGGGAGGG-BBQ
TRAIL	5'-GGAACCCAAGGTGGGTAGAT-3'
	5'-TCTCACCACACTGCAACCTC-3'
	Cy5-AATTAGCTGGGTGTGTTGGC-BBQ

Cuantificación de citoquinas

Los sobrenadantes procedentes de los cultivos de estimulaciones de pDCs se recogieron y congelaron a -80°C . Mediante Milliplex HCYTA-60K Human Cyto-Panel A (Merck Millipore) se cuantificaron las siguientes citoquinas: TNF- α , IFN- γ , IL-6, IP-10, MIP-1 α y MIP-1 β según las recomendaciones del fabricante. Los niveles de IFN- α se determinaron mediante ELISA convencional IFN- α Multi-Subtype ELISA kit (PBL Interferon Source) según las recomendaciones del fabricante.

Inmunofenotipado y tinción intracelular de citoquinas

Se utilizaron PBMCs recién aisladas a partir de sangre periférica para la cuantificación y caracterización de las pDCs presentes en sangre periférica. Las PBMCs se lavaron con PBS e incubaron con el marcador de viabilidad Live/Dead Fixable Aqua Dead Cell Stain (Life Technologies) y los marcadores extracelulares anti-human lineage cocktail 2 (LIN-2) (CD3, CD14, CD19, CD20, CD56) FITC, anti-CD86 BV421, anti-CCR7 BV786, anti-PDL1 PE CF594, anti-CD141 PE-Cy7, anti-CD11c BV650, anti-HLA-DR BV711, anti-CD123 AF700, anti-CD1c APC-Cy7, anti-integrina $\beta 7$ APC, anti-CD4 PerCP-Cy5.5 y anti-CD16 BV605. Posteriormente se lavaron las células y se permeabilizaron usando el kit Fixation/Permeabilization FoxP3 kit (eBioscience) según las recomendaciones del fabricante. Las células fueron teñidas intracelularmente con anti-IDO PE y lavadas y fijadas con PBS al 4% de paraformaldehído (PFA).

Las pDCs *ex vivo* recién aisladas a partir de PBMCs y estimuladas se lavaron con PBS y se incubaron con el marcador de viabilidad Live/Dead Fixable Aqua Dead Cell Stain (Life Technologies) y los marcadores extracelulares anti-CD81 FITC, anti-CCR7 BV786, anti-HLA-DR BV711, anti-integrina $\beta 7$ APC, anti-CD4 BV605, anti-CD86

BV650, anti-CD5 APC-Cy7, anti-CD2 PeCy5.5 y anti-TIM3 PE-CF594. Las pDCs se lavaron con PBS y posteriormente se permeabilizaron y fijaron usando Cytotfix/Cytoperm Kit (BD Bioscience) según las recomendaciones del fabricante. Posteriormente las pDCs se tiñeron con anti-IDO PE, anti-TNF- α PE-Cy7, anti-TLR-7 AF700 y anti-TLR-9 405 posteriormente se lavaron y fijaron con PBS al 4% de paraformaldehído (PFA).

Los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ *ex vivo* recién aislados a partir de PBMCs y los procedentes del co-cultivo pDCs-CD4 y pDCs-CD8 se lavaron con PBS y se incubaron con el marcador de viabilidad Live/Dead Fixable Aqua Dead Cell Stain (Life Technologies) y los marcadores extracelulares anti-CD45RA FITC, anti-TIGIT PerCP-Cy5.5, anti-integrina β 7 BV711, anti-LAG3 BV605, anti-CD123 BV510, anti-PD1 BV786, anti-CD27 APC-Cy7 y anti-TIM3 PeCF594. Tras este paso las células lavaron con PBS y posteriormente se permeabilizaron y fijaron usando Cytotfix/Cytoperm Kit (BD Bioscience) según las recomendaciones del fabricante. Posteriormente, las células se tiñeron intracelularmente con anti-IL2 BV421, anti-TNF- α AF700, anti-IFN- γ PCy7 y anti IL17a PE (solo para el caso de linfocitos T CD4⁺) / anti-perforina PE (solo para el caso de linfocitos T CD8⁺); tras la incubación se lavaron y fijaron con PBS al 4% de PFA.

Todos los anticuerpos, clones y casas comerciales se encuentran recogidos en la Tabla suplementaria 2.

Análisis estadístico

Las variables continuas se expresaron como medianas y rangos intercuartílicos. Las categóricas como números y porcentajes. El test de U de Mann-Whitney se usó para analizar diferencias entre grupos de estudios y el test de Wilcoxon entre estímulos

dentro de un mismo grupo de estudio. Las correlaciones se realizaron aplicando el test Spearman. Todos los valores para $p < 0.05$ se consideraron significativos. Los análisis estadísticos se desarrollaron usando el software estadístico para ciencias sociales (SPSS 22.0; SPSS, Chicago, IL, USA). La respuesta VIH específica se calculó como la producción e citoquinas en respuesta al pool de péptidos Gag propios del virus (123, 124). Las múltiples combinaciones de citoquinas se construyeron usando los softwares Pestle versión 1.6.2 y Spice versión 6 (suministrado por M. Roederer, NIH, Bethesda, MD) y cuantificado con el índice de polifuncionalidad (Pindex) usando la versión beta 0.12 del software FunkyCells Boolean Dataminer (Suministrado por Martin Larson (INSERM U1135, Paris, Francia)). Toda la citometría se realizó en el citómetro de flujo LRS-II Fortessa Cytometer (BD Immunocytometry Systems) y analizada con software FlowJo, versión 9.2.

RESULTADOS

Características de los participantes del estudio y condiciones experimentales

Se incluyeron veintitrés PVVS (siete VIR, seis INR, seis IR y cuatro EC) y veintiún HD como grupo control. Las características clínicas, demográficas e inmunoviroológicas se resumen en la tabla 4. Se aislaron linfocitos T CD4+, CD8+ y pDCs a partir de 450ml de sangre total de todos los participantes. Las pDCs se estimularon ON con AT-2, CpG-A, CpG-C y GS-9620. Después, las pDCs se co-cultivaron durante seis horas con sus linfocitos T CD4+ o CD8+ autólogos en presencia y ausencia de péptidos específicos de VIH-1 (pool de péptidos Gag) (Figura 12).

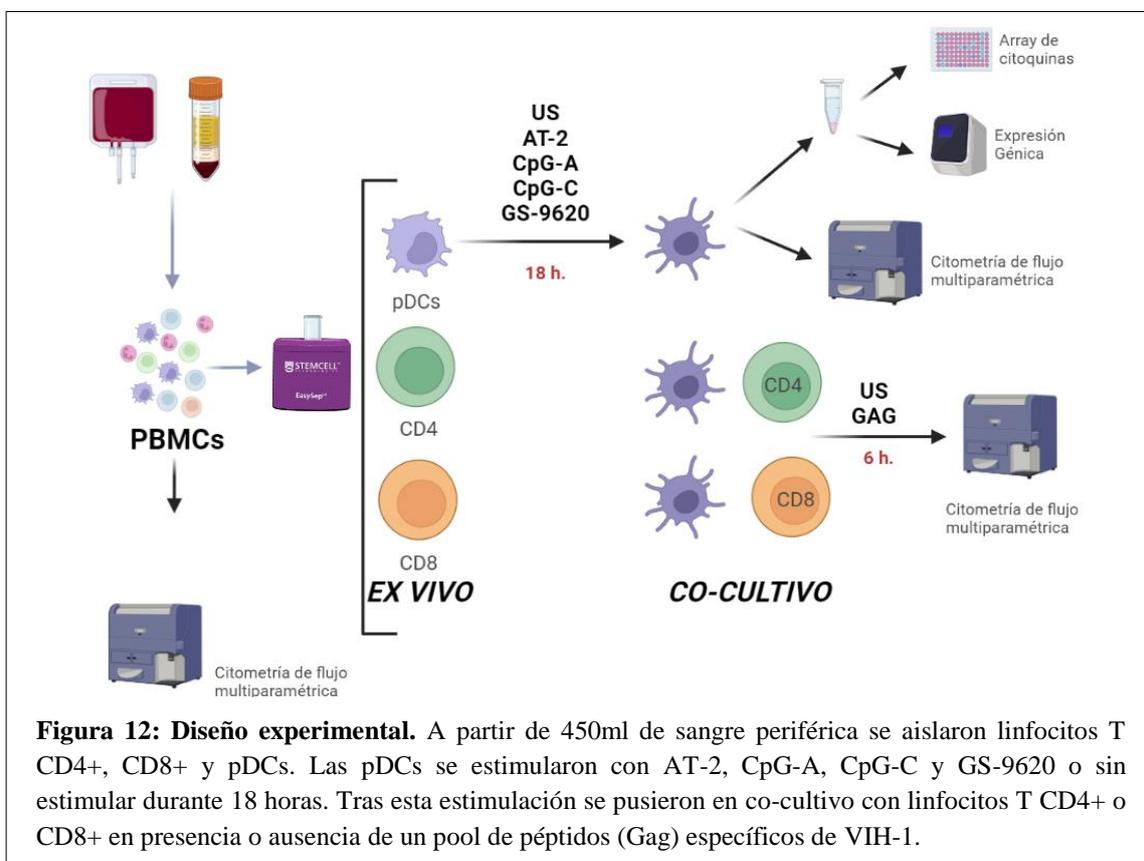


Figura 12: Diseño experimental. A partir de 450ml de sangre periférica se aislaron linfocitos T CD4+, CD8+ y pDCs. Las pDCs se estimularon con AT-2, CpG-A, CpG-C y GS-9620 o sin estimular durante 18 horas. Tras esta estimulación se pusieron en co-cultivo con linfocitos T CD4+ o CD8+ en presencia o ausencia de un pool de péptidos (Gag) específicos de VIH-1.

El aumento de marcadores inflamatorios solubles y de los niveles de agotamiento celular en PVVS se asocia con el nivel de activación de las pDCs

Para analizar la expresión *ex vivo* de marcadores de activación de las DC (pDCs y mDCs) en PVVS y HD se determinaron mediante citometría de flujo multiparamétrica la expresión de los siguientes receptores de migración: integrina $\beta 7$ y CCR7; moléculas de coestimuladoras CD86 y CD4 y marcadores de tolerancia y supresión inmunológica IDO y PDL1 respectivamente. Las mDCs de los INR mostraban una expresión elevada de CCR7, IDO y PDL1 (Figura 13A). Las pDCs de los VIR mostraban un mayor porcentaje de expresión de CCR7 y PDL1 que los HD. (Figura 13B). La expresión de IDO en las mDCs se encontraba aumentadas en VIR, INR, IR y EC en comparación con HD (Figura 13A). También determinamos los marcadores solubles de inflamación la B2M y la PCR, así como el marcador de coagulación D-dímero. Los dímeros-D y la B2M estaban aumentados en INR, VIR, IR y EC respecto a los HD (Figura 13C). Los INR también presentaban niveles de PCR significativamente aumentados respecto a los HD e IR (Figure 13C). INR y VIR destacan *ex vivo* como los grupos de estudio con los marcadores de activación y marcadores solubles más elevados en comparación con HD. También se observaron correlaciones positivas entre el fenotipo de algunos marcadores de activación en las pDCs *ex vivo* y marcadores solubles de inflamación (Figura 13D). Es interesante destacar la correlación positiva entre la expresión de CCR7 por las pDCs y los niveles de dímeros-D, B2M y PCR ($\rho=0.399$, $p=0.035$; $\rho=0.464$, $p=0.12$ y $\rho=0.415$, $p=0.028$ respectivamente).

Respecto a la expresión *ex vivo* de los marcadores de agotamiento celular LAG3, PD1, TIGIT y TIM3 en linfocitos T de memoria CD4+ y CD8+ (Figura 13 E-G). PVVS

presentan una mayor expresión de estos marcadores respecto a los HD (Figura 13 E-F). Calculamos la expresión simultánea de estos marcadores, que denominamos como “fenotipo de agotamiento múltiple” representado a través de un diagrama de sectores. Los grupos de estudio EC e IR presentaban mucho menores de este fenotipo especialmente en linfocitos T CD4 (Figura 14). Además, la expresión conjunta de LAG3, PD1 y TIGIT en los linfocitos T de memoria CD4+ y CD8+ estaba significativamente aumentada en PVVS (Figura 13G). Esta combinación junto con el índice de polifuncionalidad se correlacionaba con la expresión de CCR7 en pDCs *ex vivo* ($\rho=0.400$, $p=0.043$ y $\rho=0.560$, $p=0.002$ respectivamente) (Figura 13H). Estos resultados muestran que el fenotipo activado de las pDCs *ex vivo* se asocia también con el grado de agotamiento celular de los linfocitos T.

Tabla 4_ Características generales de los participantes del estudio.

	HD (n=21)	VIR (n=7)	IR (n=6)	INR (n=6)	EC (n=4)
Sexo masculino, n (%)	15 (71.42)	7(100)	5(83.3)	6(100)	3(75)
Edad, (años)	42 [35-51]	36 [32 - 45]	50 [41 - 62]	56 [49 - 60]	48 [37 - 57]
Linfocitos T CD4+ Nadir (células/μl)	NA	376 [273 - 448]	162 [75 - 310]	42 [36 - 86]	615 [459 - 697]
Linfocitos T CD4+ (células/μl)	NA	354 [299 - 456]	724 [536 - 1022]	277 [157 - 322]	738 [611 - 940]
Linfocitos T CD8+ (células/μl)	NA	773 [527 - 1148]	592 [376 - 1011]	711 [423 - 1561]	543 [477 - 585]
Ratio linfocitos T CD4+/ CD8+	NA	0.5 [0.33 – 0.71]	1.38 [0.91 – 1.41]	0.36 [0.18 – 0.51]	1.3 [1.22 – 1.73]
Anti-VHC n (%)	0(0)	0 (0)	0 (0)	3 (50)	2 (50)
VIH-1 RNA (Log₁₀ copias/ml)	0(0)	4.80 [3.73 – 4.96]	1.60 [1.60 – 1.60]	1.60 [1.60 – 1.60]	1.61 [1.60 – 1.93]

Los valores se muestran para las variables categóricas como números (%) y para las variables continuas se muestran las medianas con sus rangos intercuartílicos [IQR].
 Abreviaciones: NA, no aplica; VHC, virus hepatitis C; VIH-1; virus de la inmunodeficiencia humana; HD, donante sano; VIR, PVVS virémico; IR, PVVS inmuno respondedor; INR, PVVS no inmuno respondedor; y EC, PVV controlador de Élite.

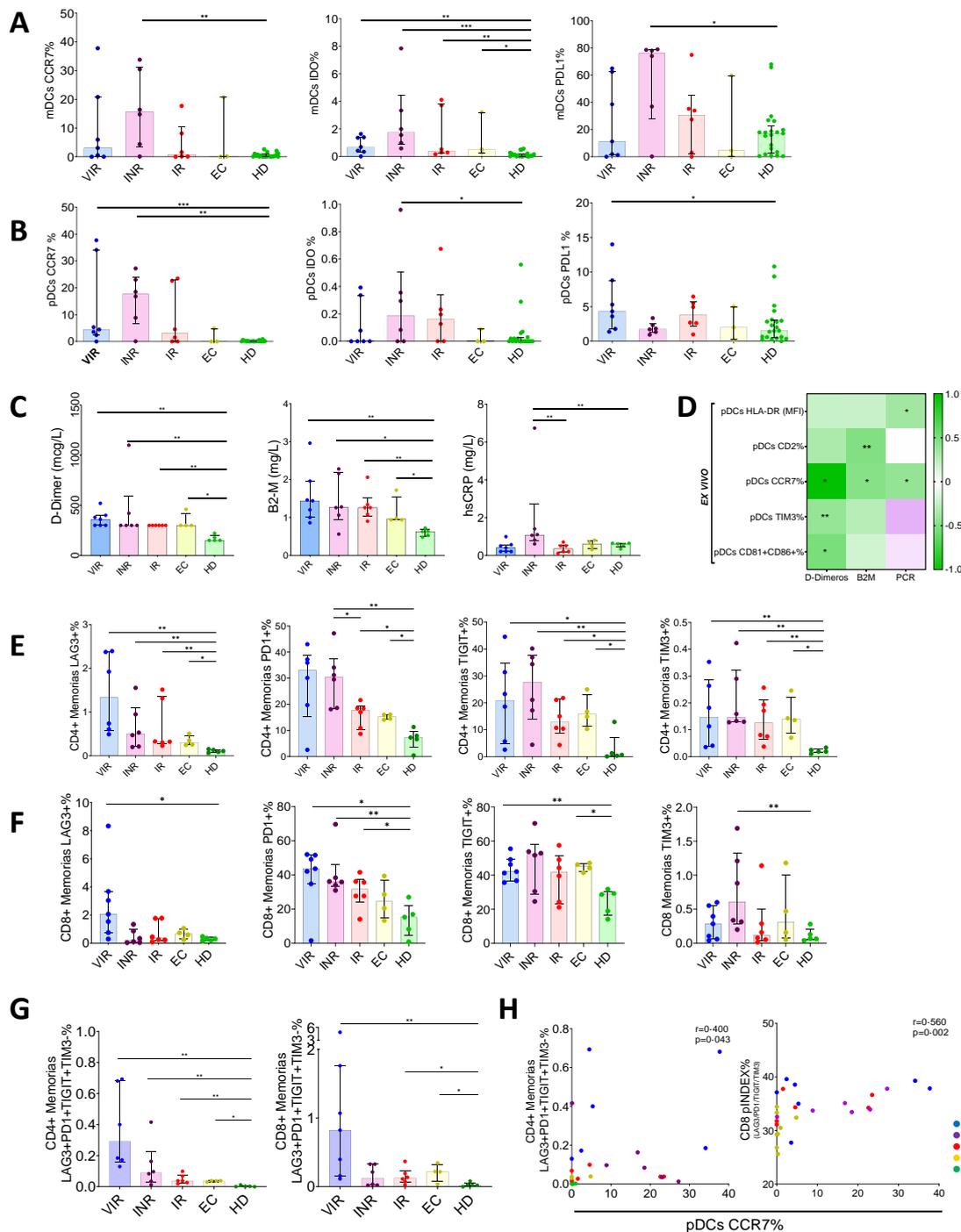


Figura 13: Los linfocitos T y las DC de las PVVS exhiben un fenotipo de activación o agotamiento celular y niveles más elevados de biomarcadores solubles. (A-B) Porcentaje de expresión *ex vivo* de marcadores de activación en pDCs y mDCs. **(C)** Niveles de marcadores solubles de inflamación (PCR y B2M) y el factor de coagulación dímeros-D. **(D)** Mapa de calor representando las asociaciones directas (cuadros verdes) e indirectas (cuadros púrpuras) entre la expresión de marcadores de activación en pDCs y los biomarcadores solubles. **(E-F)** Porcentaje de linfocitos T CD4+ y CD8+ de memoria que expresan *ex vivo* las moléculas de agotamiento celular: LAG3, PD1, TIGIT y TIM3. **(G)** Combinación de marcadores de agotamiento celular en linfocitos T CD4+ y CD8+. **(H)** Correlaciones positivas entre el índice de polifuncionalidad de los marcadores de agotamiento celular y la expresión de CCR7 *ex vivo*. Significación estadística: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

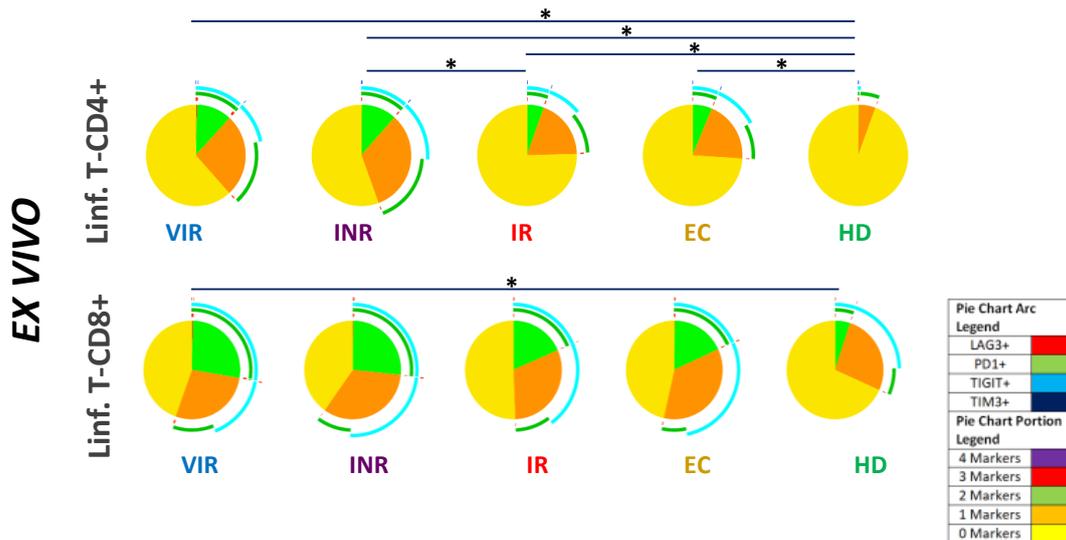


Figura 14: Expresión simultánea de marcadores de agotamiento celular en linfocitos T CD4+ y CD8+. Las PVVS presentaban niveles más elevados de expresión de marcadores de agotamiento celular que HD. Fenotipo de agotamiento celular representado mediante diagramas de sectores en los el tamaño de cada sector es proporcional a la representación de linfocitos T CD4+ o CD8+ expresando simultáneamente 4, 3, 2, 1 o ninguno de estos marcadores. Cada marcador está representado por un arco. Significación estadística: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

La estimulación por agonistas de TLR induce un fenotipo activado en las pDCs

Con el fin de observar la modulación que ejercen los agonistas de TLR sobre las pDCs determinamos en este tipo celular una serie de marcadores relacionados con: presentación antigénica (CD81, CD86), activación (TIM3, HLA-DR) y tolerancia (IDO), migración (CCR7 y la integrina- $\beta 7$), receptores intracelulares (TLR-7 y TLR-9) y producción intracelular de TNF- α (Figura 15A). El primer resultado que observamos fue el incremento de la supervivencia de las pDCs en cultivo mediada por la estimulación con agonistas de TLR (Figura 15B). La intensidad media de fluorescencia (MFI) de la expresión de HLA-DR incrementaba con los diferentes estímulos. Este incremento es especialmente acentuado con los agonistas CpG-C y GS-9620 en los grupos INR y EC. Las principales diferencias entre grupos se observaron en INR

respecto a HD (Figura 15C, panel inferior). Con respecto al marcador de migración CCR7, el marcador de activación CD86, el marcador de tolerancia IDO y la molécula de control inmunitario TIM3 también aumentaron en todos los grupos de estudio tras la estimulación con CpG-A y en particular con CpG-C y GS-9620 (Figura 15D, F y G).

La producción de TNF- α también aumento en todos los grupos de estudio de PVVS respecto a HD tras la estimulación con agonistas de TLR (Figura 15H). En general, todos los marcadores los mayores aumentos de expresión con los agonistas CpG-C y GS-9620, encontrándose la mayoría de las diferencias con los HD.

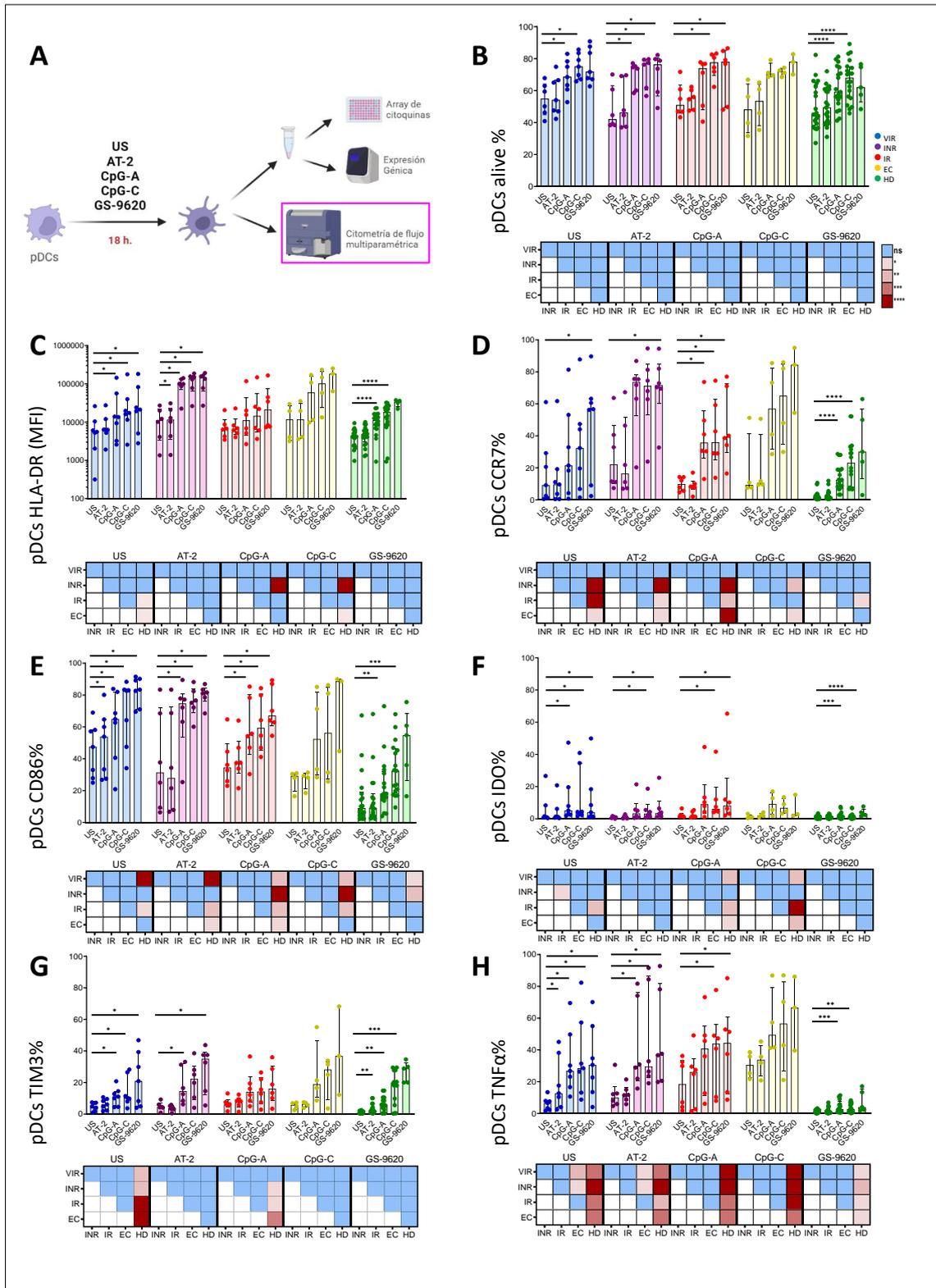
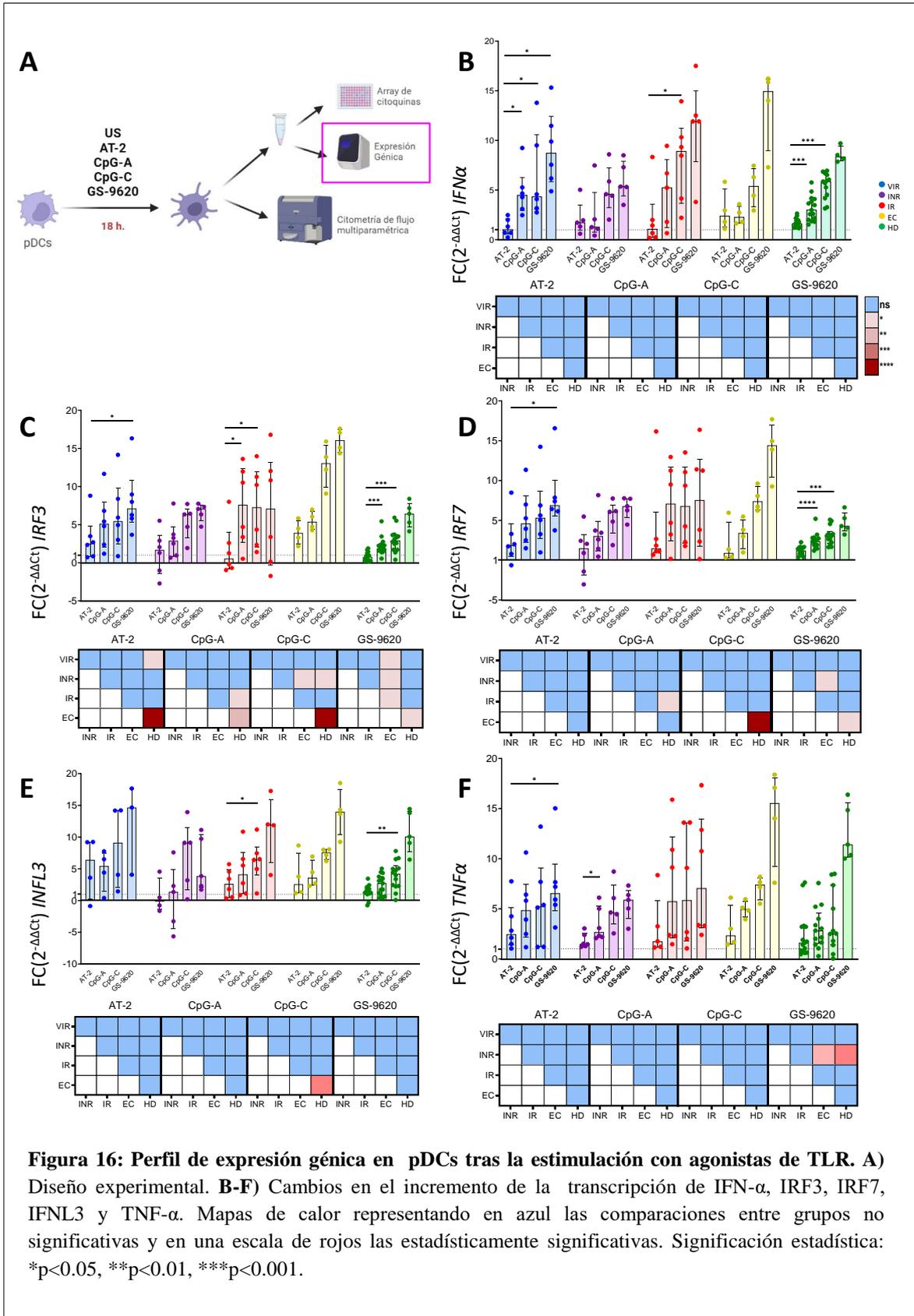
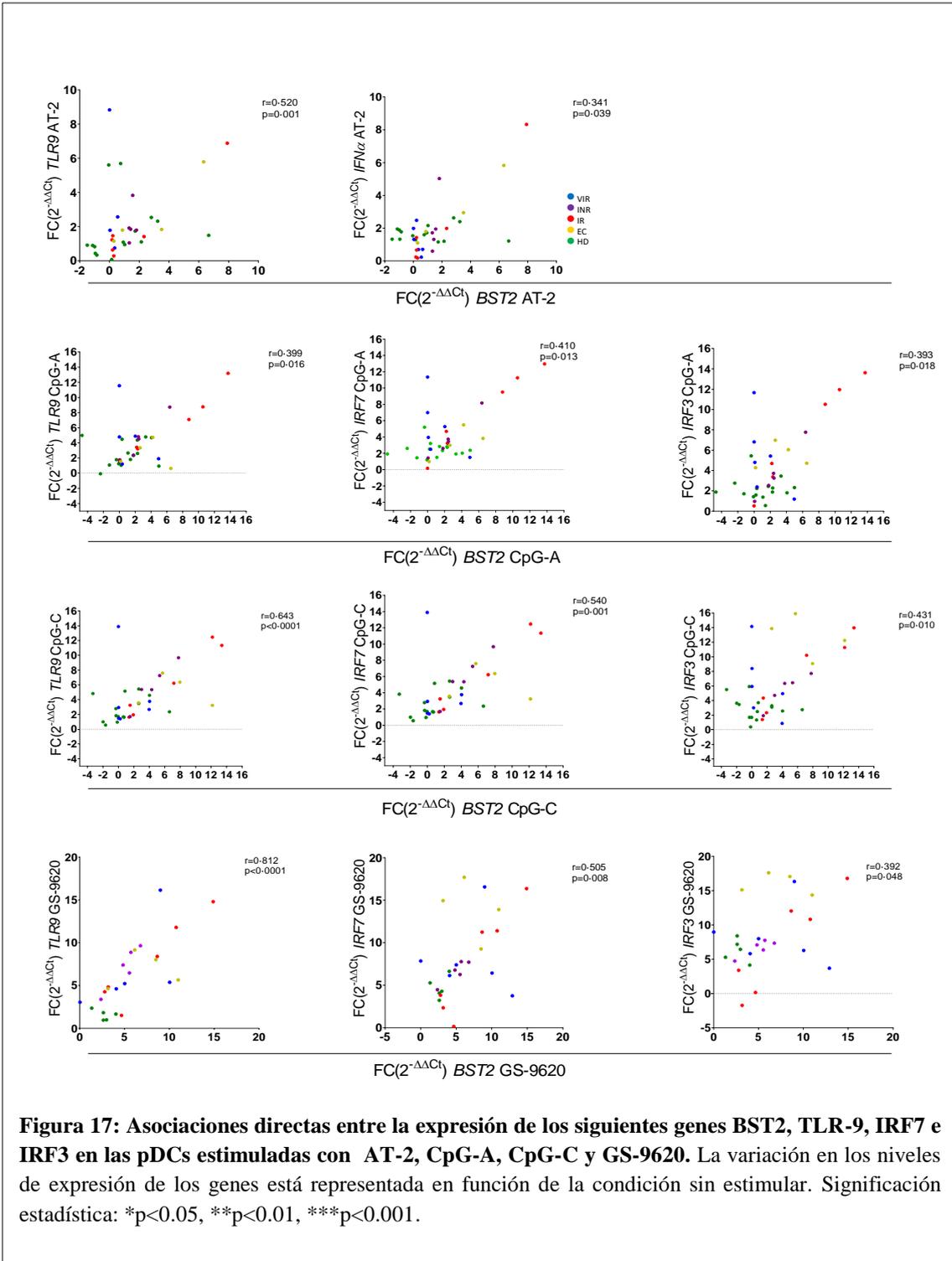


Figura 15: Fenotipo activado de pDCs tras la estimulación con agonistas de TLR. A) Diseño experimental. B-H) Porcentajes de expresión de marcadores de pDCs tras la estimulación con AT-2, CpG-A, CpG-C y GS-9622. Mapas de calor representando en azul las comparaciones entre grupos no significativas y en una escala de rojos las estadísticamente significativas. Significación estadística: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.001$.**

Los agonistas de TLR aumentan la transcripción de IFN- α , los genes reguladores de interferón y factores de restricción viral en pDCs

Adicionalmente también se determinó el perfil de expresión génica de pDCs *in vitro* tras su estimulación (Figura 16A). Se determinaron mediante qPCR la expresión de *IFN- α* , de genes reguladores de interferón (*IRF3*, *IRF7* y *IFNL3*), *TLR-7*, *TLR-9*, *TNF- α* , factores de restricción (*TRIM5 α* , *BST2*, *HDAC6*, *APOBEC3G* y *SAMHD1*) y *TRAIL* (Figura 16). De forma general la transcripción de *IFN- α* , *IRF3*, *IRF7*, *IFNL3* y *TNF- α* aumento con los diferentes estímulos (Figura 16B-F). Los máximos niveles de expresión se obtuvieron con el estímulo GS-9620. De forma llamativa no encontramos diferencias significativas en la transcripción de *IFN- α* entre los grupos de estudio (Figura 16B, panel inferior). Incluso los individuos VIR e INR alcanzaron niveles de expresión de *IFN- α* similares a los observados en EC. También se detectó un perfil parecido en la transcripción de *IFNL3*, solo se detectaron diferencias entre EC y HD tras estimularse con CpG-C (Figura 16E, panel inferior). Curiosamente, se observaron correlaciones positivas entre los niveles de transcripción de *TLR-9*, *IFN- α* , *IRF-7* e *IRF3* y la transcripción de *BST2* con los diferentes estímulos (Figura17).





La producción de citoquinas por pDCs es mayor tras la estimulación con GS-9620

A continuación, analizamos la producción de citoquinas por pDCs en los sobrenadantes de los cultivos (Figura 18A). En primer lugar, observamos un incremento en la producción de IFN- α tras la estimulación con agonistas de TLR (Figura 18B). Las principales diferencias entre los grupos de estudio se detectaron tras la estimulación con CpG-C y GS-9620. La producción de IFN- α por los HD tras la estimulación con CpG-C fue menor en comparación con individuos EC, IR, e INR. Estas diferencias también se observaron en EC e IR tras la estimulación con GS-9620. El mayor incremento en la producción de citoquinas se produjo en pDCs estimuladas con GS-9620 procedentes de individuos EC. No se observaron diferencias en la producción de IFN- α entre pDCs estimuladas con CpG-A, CpG-C y GS-9620 de individuos HD y VIR. Por otro lado, solo se observó un incremento significativo en la producción de IFN- γ por pDCs de individuos IR, encontrándose diferencias entre HD e INR, IR y EC tras la estimulación con CpG-C (Figura 18C). Respecto a la producción de IL-6 y TNF- α , se produjo un incremento en la producción de ambas citoquinas en todos los grupos de estudio (Figura 18D y E). Los niveles de MIP-1 α y MIP-1 β también se vieron incrementados tras la estimulación con agonistas de TLR-7 y -9, alcanzando las máximas concentraciones con GS-9620 (Figura 18F y G). Es importante recalcar que en individuos INR las pDCs secretaron los niveles más elevados de IP-10 tras la estimulación con CpG-C (Figura 18H). Finalmente, el incremento en la expresión de los marcadores de activación CD2, CCR7, TIM3, CD86 y CD81 en las pDCs estimuladas con CpG-A, CpG-C y GS-9620 se correlacionó de forma directa con la producción de citoquinas (Figura 18I). Estos resultados sugieren que los agonistas de TLR podrían actuar como potenciadores de la actividad antiviral natural de las pDCs.

La estimulación mediante agonistas de TLR de las pDCs induce un incremento en la respuesta VIH-1 específica de los linfocitos T

Finalmente, para indagar si estos agonistas pueden servir como potenciadores de la actividad natural de la pDC modulando al linfocito T, analizamos la respuesta VIH-1 específica en estas células. Definimos la respuesta T específica a un antígeno como la frecuencia de células que producen intracelularmente citoquinas (IL-2, TNF- α y IFN- γ) junto con el factor de degranulación CD107a tras la exposición a dicho antígeno, en este caso a un *pool* de péptidos Gag procedentes del VIH-1. Al analizar la respuesta incluimos la determinación de la IL-17 en el caso de los linfocitos T CD4+ y de la proteína citotóxica perforina (PRF) en los linfocitos T CD8+. Para analizar esta respuesta se co-cultivaron las pDCs previamente estimuladas con agonistas de TLR (AT-2, CpG-A, CpG-C y GS-9620) junto con linfocitos T CD4+ o CD8+ autólogos. Este co-cultivo a su vez fue expuesto a un pool de péptidos Gag de VIH-1 (Figura 19A).

Respuesta VIH-1 específica de los linfocitos T CD4+. La estimulación mediada por TLR induce una respuesta de los linfocitos T CD4 VIH-1 específica mediante el incremento en la producción de IL-2, TNF- α e IFN- γ . Los niveles más elevados de respuesta se observaron en los individuos pertenecientes a los grupos de estudio IR y EC cuyas pDCs habían sido previamente estimuladas con GS-9620 (Figura 19B-D). Como medida adicional calculamos la suma de la producción de todas las citoquinas producidas en respuesta a los péptidos Gag. Aunque esta suma fue particularmente alta en los individuos IR y EC, también los sujetos pertenecientes a los grupos de estudio INR y VIR vieron incrementada su respuesta tras el co-cultivo con pDCs previamente estimuladas con GS-9620 (Figura 19E).

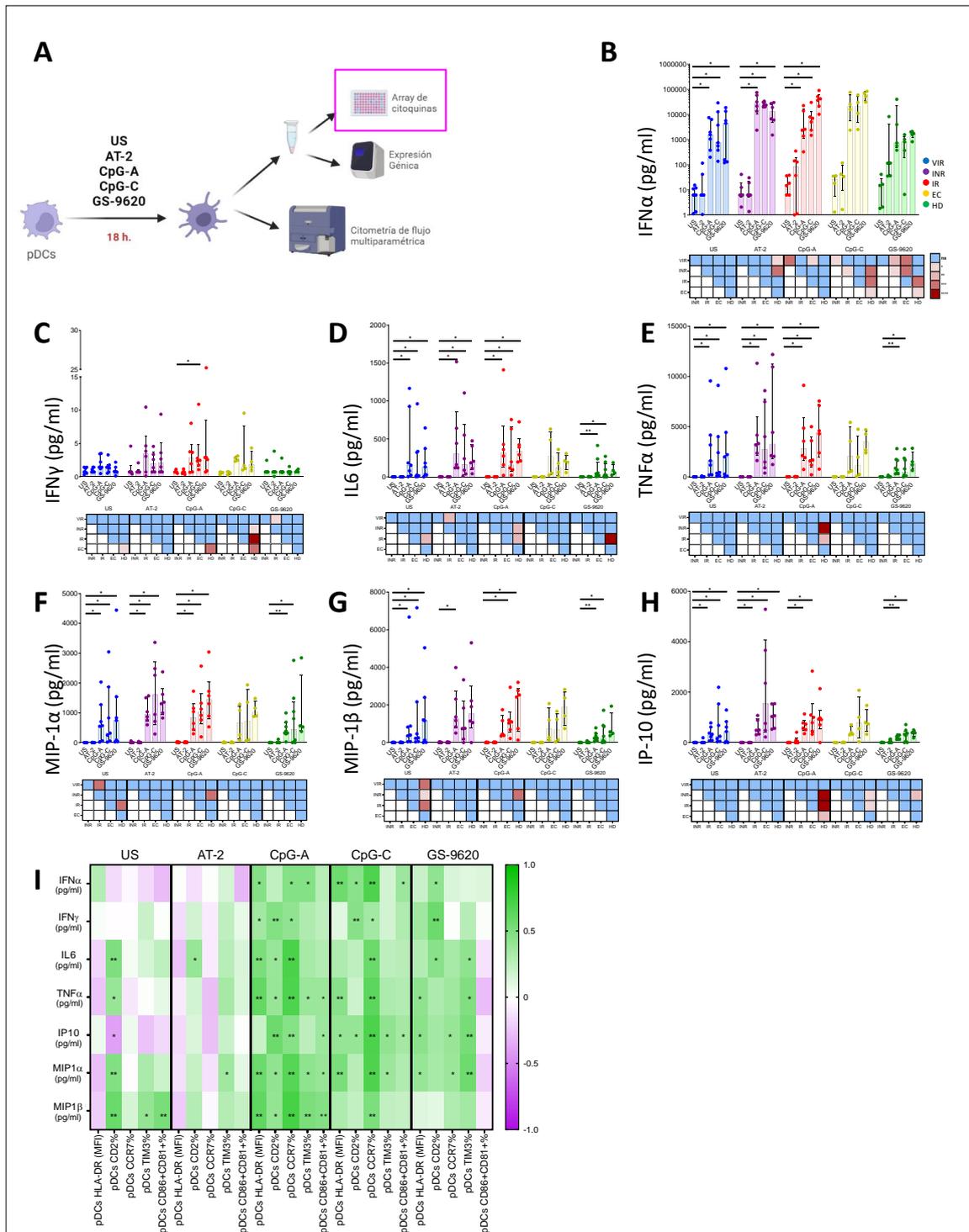


Figura 18: Los agonistas de TLR incrementan la producción de citoquinas por pDCs. A) Diseño experimental. **B-H)** Niveles de IFN- α , IFN- γ , IL-6, TNF- α , MIP-1 α , MIP-1 β e IP-10. Mapas de calor representando en azul las comparaciones entre grupos no significativas y en una escala de rojos las estadísticamente significativas. **I)** Mapa de calor representando en púrpura las correlaciones inversas y en verdes las directas entre los marcadores de activación en pDCs y la producción de citoquinas. Significación estadística: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Cabe destacar que este incremento en la respuesta VIH-1 específica por parte de las células memoria de los linfocitos T CD4⁺ se correlaciono positivamente con la producción por parte de las pDCs estimuladas con CpG-C y GS-9620 de IP-10, TNF- α , IFN- γ e IFN- α (Figura 19E) Además, la producción intracelular de IFN- γ y TNF- α también se correlacionó con el incremento de la transcripción de los factores de restricción BST-2, SAMHD1, APOBEC3G y TRIM5 α por parte de la pDC (Figura 6G).

Respuesta VIH-1 específica de los linfocitos T CD8⁺. También se pudo observar el incremento de la respuesta VIH-1 específica por parte de los linfocitos de memoria T CD8⁺ tras el co-cultivo con pDCs previamente estimuladas. Este incremento se observó tanto en la producción individual de citoquinas como en la suma de todas ellas y las moléculas CD107a y perforina (Figura 20A). En este caso también analizamos la polifuncionalidad o la expresión simultaneas de estas citoquinas (Figura 20B). Los individuos EC presentaron una distribución más polifuncional que los individuos INR y VIR tras el co-cultivo con pDCs previamente estimuladas con GS-9620. No se encontraron diferencias entre individuos EC e IR (Figura 20B, panel superior). La suma de todos los marcadores analizados (IL-2, TNF- α , IFN- γ , CD107a y PRF) se correlaciono con el incremento de la transcripción por parte de la pDC estimulada con GS-9620 de TNF- α , IFN- α , IRF3 e IRF7 (Figura 20C).

Por otro lado, la suma de la producción 3, 4 y 5 citoquinas por los linfocitos de memoria T CD4⁺ en respuesta a péptidos Gag tras el co-cultivo con pDCs previamente estimuladas con CpG-C se asoció con la misma respuesta en CD8⁺, obteniendo los individuos pertenecientes a los grupos IR y EC los niveles más elevados de respuesta (Figura 21A). Finalmente, la suma de las tres citoquinas (IL-2, TNF- α e IFN- γ) se correlaciono de forma inversa con la expresión de los marcadores de agotamiento celular PD1 y TIM3 tras el co-cultivo con pDCs previamente estimuladas con GS-9620

(Figura 21B). Además, tras el co-cultivo, observamos la normalización de los niveles de PD1 por parte de los linfocitos de memoria T CD4+ en individuos IR y EC en relación con HD (Figura 21C).

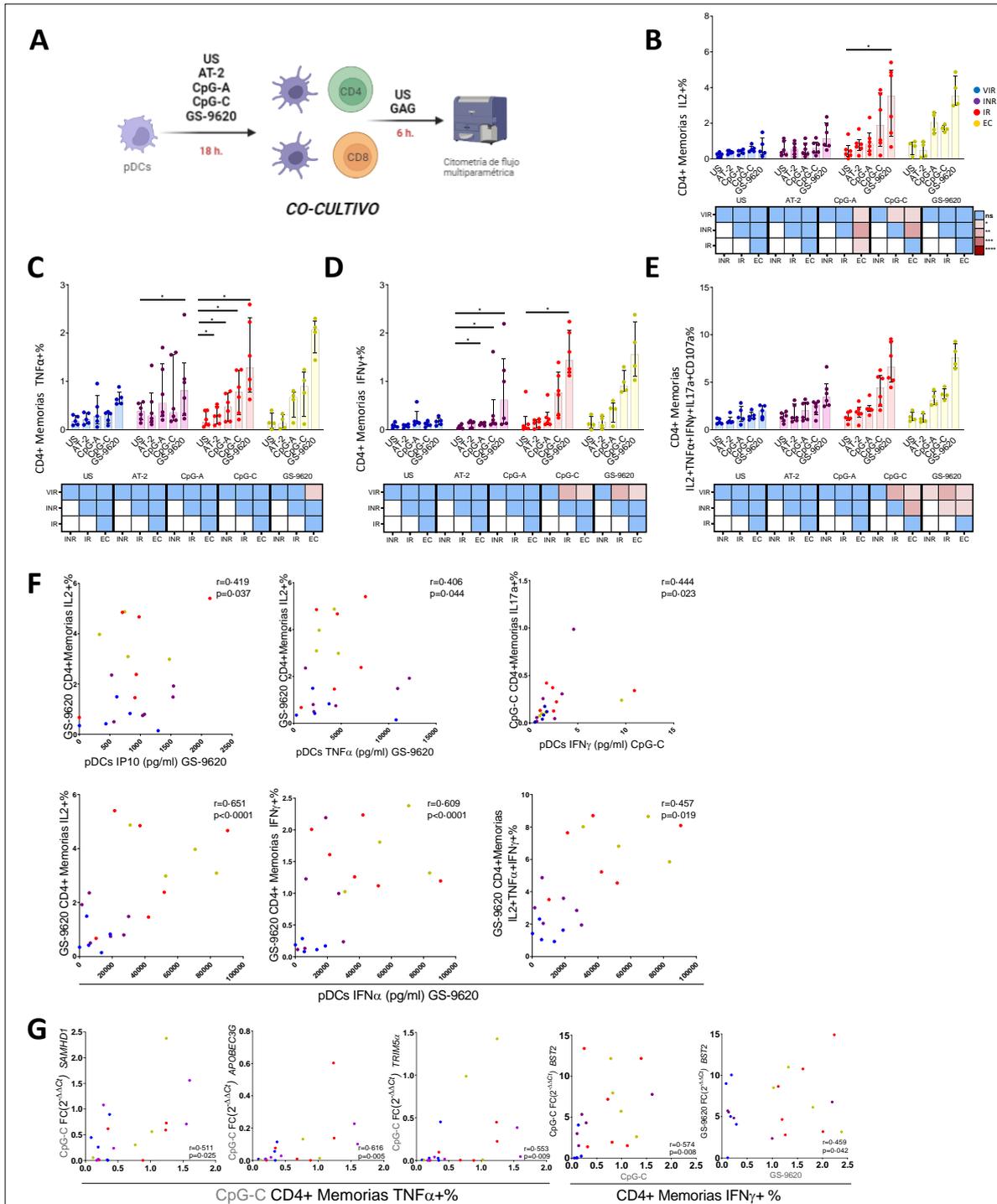
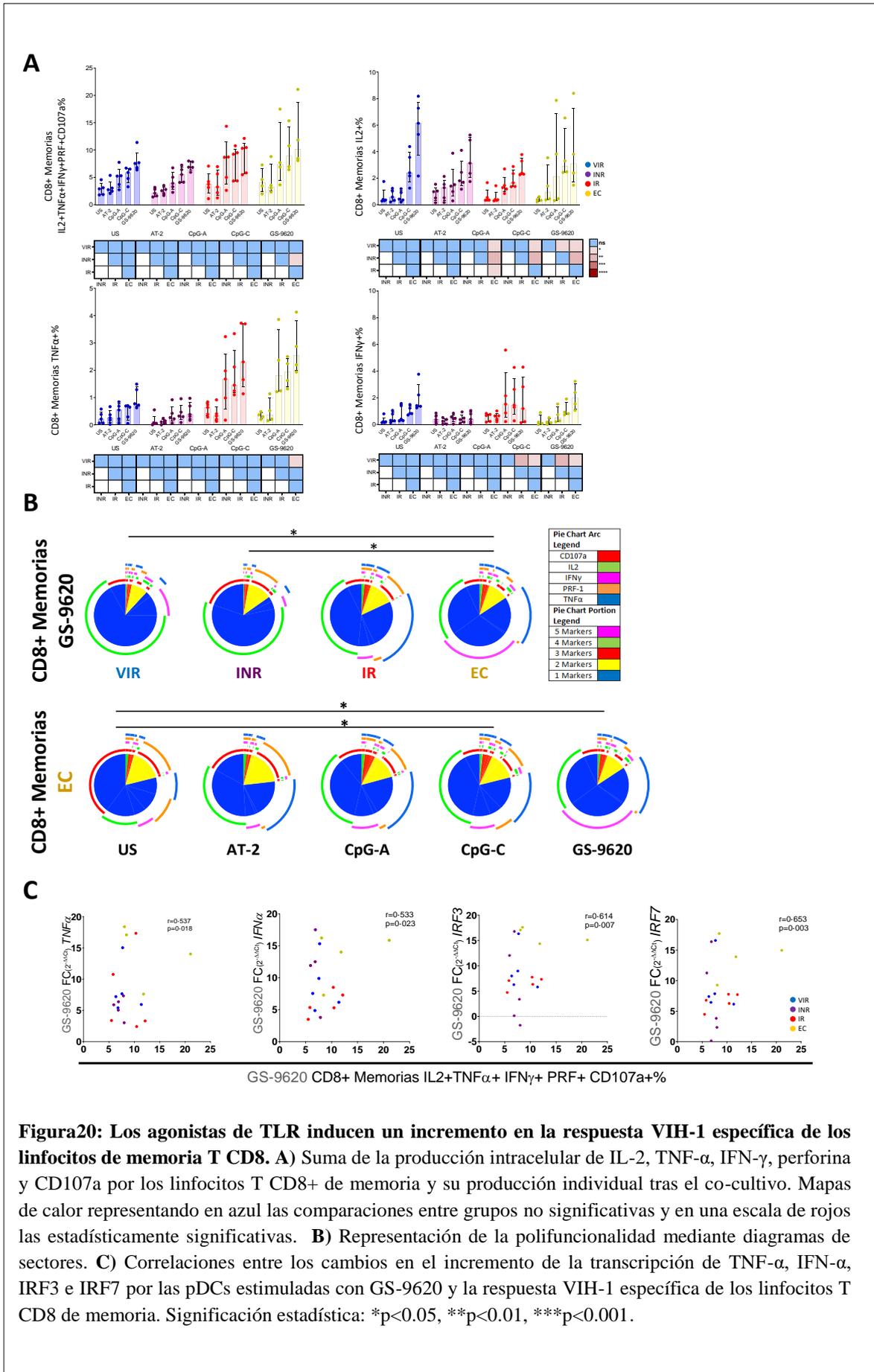
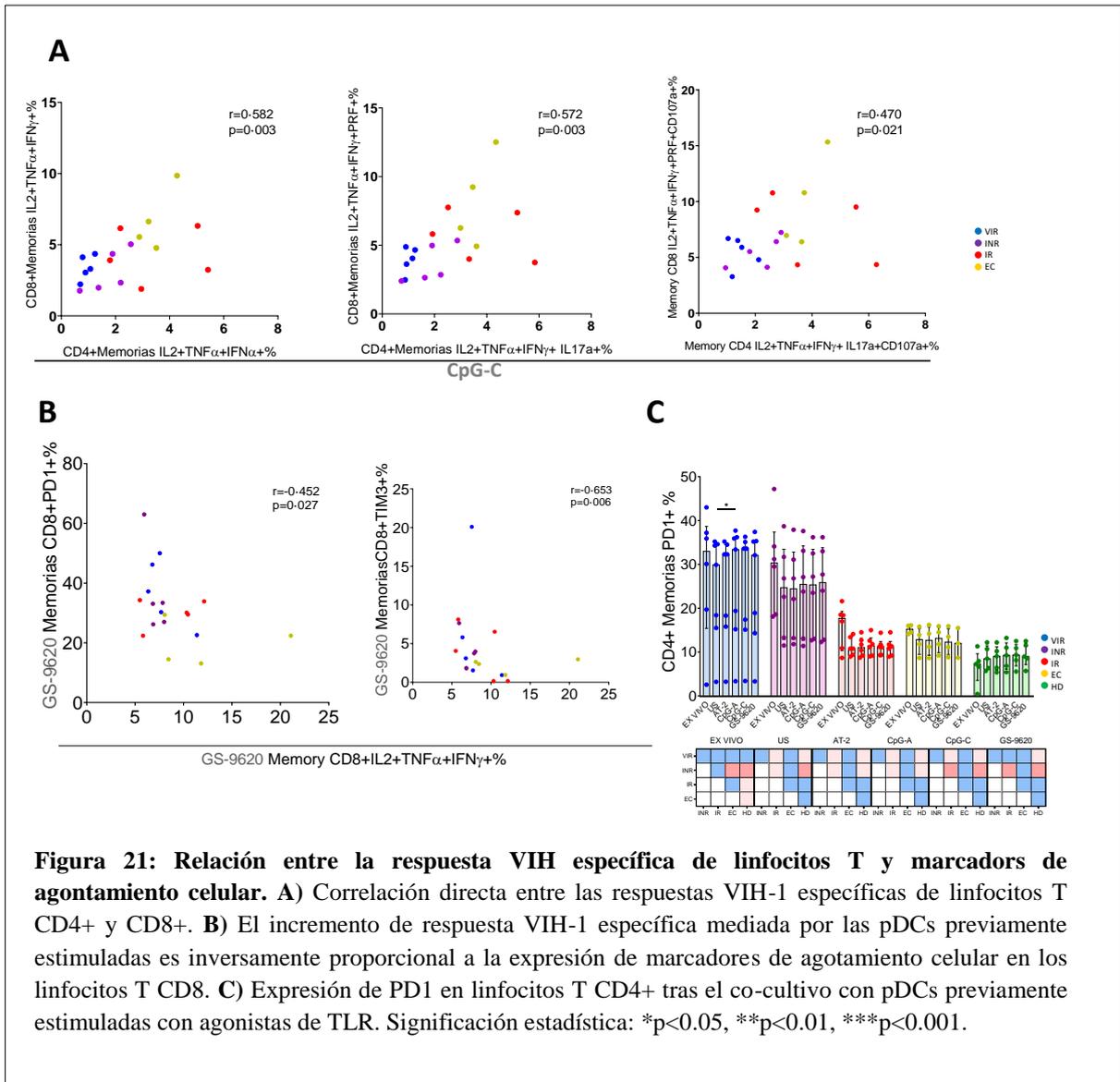


Figura 19: Los agonistas de TLR inducen un incremento en la respuesta VIH-1 específica de los linfocitos T CD4. **A)** Diseño experimental. **B-D)** Producción intracelular de citoquinas por los linfocitos T CD4+ en co-cultivo con pDCs previamente estimuladas con agonistas de TLR en respuesta a un pool de péptidos Gag específicos de VIH-1. **E)** Suma de la producción intracelular de IL-2, TNF- α , IFN- γ , IL17a y CD107a por los linfocitos T CD4+ en co-cultivo con pDCs previamente estimuladas con agonistas de TLR en respuesta a un pool de péptidos Gag específicos de VIH-1. **B-E)** Mapas de calor representando en azul las comparaciones entre grupos no significativas y en una escala de rojos las estadísticamente significativas. **F)** Correlaciones entre la producción de citoquinas por pDCs estimuladas con GS-9620 y la producción de citoquinas por linfocitos T CD4+ tras el co-cultivo con dichas pDCs. **G)** Correlaciones entre el incremento de la transcripción de *BST2*, *SAMHD1*, *APOBEC3G* y *TRIM5 α* por pDCs estimuladas y la producción de citoquinas por linfocitos T CD4+ tras el co-cultivo. Significación estadística: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.





DISCUSION

En este segundo capítulo de la presente tesis doctoral mediante un ensayo *in vitro*, donde hemos podido observar como la estimulación de las pDCs mediante agonistas de TLR produce un incremento en la expresión de marcadores de activación, la transcripción de genes relacionados con la vía del interferón y factores de restricción y la producción de citoquinas por parte de las pDCs. Los agonistas CpG-C y GS-9620 resultaron ser los estímulos más potentes, alcanzando la mayoría de marcadores su expresión máxima con ellos. De hecho, incluso los grupos de estudio VIR e INR lograron alcanzar niveles de activación similares a los observados en EC. También pudimos observar como este fenotipo activado y maduro de la pDC inducido por agonistas de TLR-7 y -9 era capaz de inducir un incremento en la respuesta VIH-1 específica tanto de los linfocitos T CD4+ como CD8+ en todos los grupos de estudio.

Como ya hemos comentado en la introducción global, la infección crónica por VIH-1 se caracteriza por un estado de inflamación permanente que se refleja en niveles elevados de biomarcadores inflamatorios y de agotamiento celular incluso en individuos bajo TAR con carga viral suprimida (125, 126). Estos marcadores solubles de inflamación y coagulación están asociados con un mayor riesgo de morbilidad y mortalidad por ENOS, especialmente en individuos INR (23, 109, 127). Por lo tanto, es crucial diseñar estrategias para disminuir esta inflamación. Las pDCs se han asociado con el control de la infección por VIH-1 pero también con la progresión de la enfermedad (73, 128, 129). De hecho, en este estudio hemos encontrado asociaciones entre el fenotipo de la pDCs *ex vivo*, biomarcadores solubles de inflamación y marcadores de agotamiento celular expresados en linfocitos T. En primer lugar, observamos que los niveles de dímeros-D, B2M, y PCR en PVVS se asociaban con la expresión de CCR7, CD2, CD86, CD81 y

HLA-DR en las pDCs *ex vivo*, mostrando los individuos INR el fenotipo más exhausto y activado, y los EC el que menos. Los grupos de estudio INR y VIR compartían un fenotipo *ex vivo* similar más activado y exhausto. Atendiendo a los niveles de agotamiento celular de los linfocitos T, encontramos correlaciones directas con la expresión de CCR7 por parte de las pDCs y la expresión simultánea de varios de estos marcadores tanto en linfocitos T CD4+ como CD8+. Este estado de agotamiento celular se produce como consecuencia a una exposición constante al antígeno que conduce a una disfunción celular y del sistema inmunitario produciendo: disminución en la proliferación celular, reducción en la secreción de citoquinas, además este fenotipo celular parece contribuir al reservorio celular del VIH-1 (49, 130–133). En trabajos anteriores, se ha identificado a los linfocitos T CD4+ y CD8+ que expresaban estos marcadores de agotamiento celular (PD1, LAG3 y TIM3) antes del inicio del TAR como un nicho preferencial para el establecimiento del reservorio VIH-1 (49). La expresión simultánea de estas moléculas se ha correlacionado fuertemente con la carga viral y con una respuesta VIH-1 específica mediada por citoquinas muy baja (126). De hecho, estos marcadores se han identificado también como fuertes predictores, tras la interrupción del TAR, del rebote de la carga viral en la cohorte de estudio SPARTAC (131). Durante la infección aguda por VIH-1 la expresión de TIM3 por los linfocitos T CD4+ y CD8+ es elevada pero no es así en PVVS bajo TAR con carga viral suprimida, en comparación con individuos no infectados. Esto quiere decir que el TAR podría ser efectivo reduciendo los niveles de TIM3 (133, 134). De hecho, en nuestra cohorte solo observamos diferencias en la expresión de TIM3 entre individuos pertenecientes a los grupos INR y HD. En este trabajo, la expresión simultánea de LAG3, PD1 y TIGIT, pero no de TIM3, se asoció positivamente con la expresión por las pDCs *ex vivo* del marcador de migración CCR7. Estos resultados sugieren que hay una relación entre el

estado de activación de la pDC y el fenotipo de agotamiento celular que presentan los linfocitos T. De hecho, el propio VIH-1 puede inducir directamente una maduración parcial de la pDC y el aumento de expresión de CCR7 induciendo una migración de estas células a los órganos linfoides secundarios (135), por eso los mecanismos inmunomoduladores a través de los agonistas de TLR podrían modificar este estado de agotamiento celular y el establecimiento del reservorio. De hecho, tras el co-cultivo de pDCs y linfocitos T, se observó una normalización en la expresión de PD1 en los linfocitos T CD4+ en los diferentes grupos de estudio, pero especialmente en individuos IR y EC.

Los ensayos preclínicos y clínicos indican claramente que los agonistas de TLR tienen un gran potencial como agentes estimuladores y moduladores del sistema inmunitario. El primer obstáculo para lograr la cura funcional del VIH-1 es la presencia del reservorio latente del virus en las células del sistema inmunitario. Es aquí donde los agonistas de TLR gracias a su potencial función como agente reversores de la latencia se postulan como candidatos en el diseño de estrategias terapéuticas para alcanzar esta cura funcional (136). Alguno de estos agonistas de TLR se están empleando ya en ensayos clínicos en PVVS como es el caso del agonista de TLR, GS-9620 y el de TLR-9, MGN1703 (122, 137–139). Recientemente, también se ha publicado que la administración conjunta del potente anticuerpo neutralizante PGT121 junto con GS-9620 durante el inicio temprano del TAR produce un retraso en la reaparición de la carga viral plasmática tras la interrupción del tratamiento en macacos infectados por SVIH-1. Esta combinación inducía también la eliminación por completo del reservorio viral en algunos animales y el control de la infección (121). Sin embargo, los mecanismos moleculares del efecto inmunomodulador de estas moléculas son en su mayoría desconocidos. Los resultados obtenidos en este trabajo arrojan luz sobre estos

mecanismos subyacentes de activación de la pDCs a través de diferentes agonistas de TLR. De hecho, nuestro grupo ya ha descrito que tras la estimulación de los TLR, las pDCs aumentan la expresión de algunas moléculas claves como HLA-DR, CCR7, CD40 y CD86 lo cual se asociaba al control del VHC (75). En el presente trabajo, tras la estimulación con agonistas de TLR las PVVS han alcanzado mayores niveles de expresión de los marcadores de activación y mayor producción de TNF- α e IFN- α que los HD. Cabe destacar que este efecto se produjo independientemente del fenotipo de infección por VIH-1, la mayoría de PVVS, lograron alcanzar niveles similares de activación a los de los EC. Este resultado sugiere que el potenciamiento de la funcionalidad de la pDC a través de la estimulación de TLR puede alcanzar un fenotipo similar al del control espontáneo del VIH-1. Este incremento fue especialmente significativo bajo los estímulos CpG-C y GS-9620. Además, del incremento esperado en la producción de IFN- α , es importante destacar la producción de TNF- α . La secreción de TNF- α de forma autocrina y paracrina es capaz de activar las células latentemente infectadas por VIH-1 reduciendo el reservorio viral (140). También hemos observado un incremento en la transcripción de genes relacionados con el interferón. Esto es muy importante porque esta activación parece revertir los déficits inducidos por la infección por VIH-1 en la producción de IFN- α a través de la vía de IRF7 en las pDCs (141). Además, del aumento en la transcripción de los genes relacionados con interferón se correlacionaba directamente con la transcripción del factor de restricción BST2. BST2/Teterina inhibe fuertemente la liberación del VIH-1 de la célula infectada, impidiendo la transmisión del virus célula a célula (142–144). La secreción de interferón de tipo I permite a la pDC activar tanto una respuesta inmunitaria innata como adaptativa mediante la inducción de la migración de células NK, la maduración de células dendríticas (DC), macrófagos o linfocitos T y presentación antigénica y

maduración de las células plasmáticas a células productoras de anticuerpos (145, 146). Por otro lado, el aumento de la expresión del complejo principal de histocompatibilidad (CPH) y de moléculas coestimuladoras de linfocitos T como HLA-DR y CD86 permiten a las pDCs maduras la presentación de antígenos y la activación de los linfocitos T (147). Sin embargo, también se ha descrito que una exposición prolongada a interferón de tipo I puede dañar el proceso de hematopoyesis produciendo linfopenia (148) y aumentando el riesgo de padecer procesos autoinmunes (149). De hecho, Baenziger S. et al. observaron que la estimulación continua de TLR-7 en ratones conducía a una activación inmunitaria y a la disrupción del sistema linfoide (150). En este contexto, BST2 puede contribuir a controlar la sobreproducción de IFN-I por las pDCs tras la infección viral y/o una respuesta inflamatoria persistente (151, 152). Nuestros resultados muestran que los agonistas de TLR consiguen una activación efectiva de las pDCs y, además, activan mecanismos de control de la respuesta mediante el incremento de la transcripción de BST2 como efecto antiviral adicional.

Aunque la pDCs se han caracterizado clásicamente por su capacidad de producir IFN- α , estas células también actúan como presentadoras de antígenos (153, 154). Las pDCs pueden procesar y presentar antígenos tanto endógenos como exógenos mediante los CPH-I y -II que inducen una activación antígeno específica tanto de linfocitos T CD4+ como CD8+ (155–159). Recientemente se ha publicado que la administración del agonista de TLR-9 MGN1703 en PVVS potencia el fenotipo activado tanto de pDCs como de linfocitos T (139). Este estudio va más allá al explorar el impacto que tiene la estimulación de la pDC mediante AT-2, CpG-A, CpG-C y GS-9620 en la respuesta VIH-1 específica, mostrando que la pDC estimulada de esta forma induce un incremento en la respuesta VIH-1 específica. Estos resultados en combinación con otros estudios (160, 161) muestran el importante papel de las pDCs como células

presentadoras de antígenos capaces de inducir eficientemente una respuesta T debido a su capacidad para presentar antígenos eficientemente (162). Por el contrario, hay autores como Ram et al. que no observaron este incremento en la respuesta específica T mediada por la estimulación con GS-9620 *in vivo* (122, 162). En el presente estudio, aunque la mayor respuesta de los linfocitos T se observó en individuos pertenecientes a los grupos de estudio IR y EC, es interesante destacar que incluso los sujetos INR y VIR (probablemente con mayor reservorio) consiguieron incrementar su respuesta tras el cocultivo con pDCs previamente estimuladas con GS-9620. En este sentido, la inducción de la transcripción en la pDCs mediante CpG-C y GS-9620 de *BST2*, *SAMHD1*, *APOBEC3G* y *TRIM5α* se correlacionó directamente con la producción intracelular de IFN- γ y TNF- α por parte de los linfocitos T CD4⁺ de memoria. *BST2*, *APOBEC3G* y *Trim5α* actúan directamente sobre el VIH-1 ejerciendo una actividad antiviral (163–165). Mientras que *SAMHD1* reduce el pool intracelular de desoxirribonucleótidos interfiriendo con la retrotranscripción del VIH-1 (166). El perfil de expresión de estos factores de restricción por parte del hospedador juega un papel muy importante en el tamaño de su reservorio (167). De hecho, previamente se ha descrito que una disminución significativa en la frecuencia de células que albergan VIH-1 intacto en PVVS bajo TAR tratadas con Vesatolimod (molécula Gilead GS-9620) que se asoció con un retraso en el repunte de la carga viral tras la interrupción del TAR (122). En esta línea nuestros resultados muestran un incremento de la respuesta VIH-1 específica por parte de los linfocitos T CD8⁺ en PVVS que además se asoció con el incremento de la transcripción de TNF- α , IFN- α , IRF3 e IRF7 por parte de las pDCs estimuladas por GS-9620.

Incluso mostrando algunas limitaciones, nuestro estudio puede representar las bases moleculares de los mecanismos para la implementación presente y futura de estas

terapias inmunomoduladoras en humanos. En primer lugar, el diseño del estudio no incluyó otras poblaciones de DC. Aunque la principal diana del VIH-1 son los linfocitos T CD4+, las pDCs representan una subpoblación de DC con un papel crucial en la infección por VIH-1 debido a su papel como principales productoras de IFN- α , expresión de factores de restricción y su actividad como célula presentadora de antígeno (168). La segunda limitación es el bajo número de participantes incluidos en cada grupo de estudio. La complejidad de los experimentos y la baja representación de las pDCs en sangre periférica (<1%) requirieron la extracción de 450ml de sangre total lo cual limitó el número de participantes. Sin embargo, éstos se seleccionaron cuidadosamente con unos criterios de inclusión estrictos y representativos de cada fenotipo de progresión de la infección por VIH-1.

Este estudio proporciona abundantes datos fenotípicos y funcionales novedosos por los cuales los agonistas de TLR actúan como potenciadores de las pDCs para inducir una fuerte respuesta VIH-1 específica en los linfocitos T. En conjunto, estos hallazgos sugieren que los agonistas de TLR podrían desempeñar un papel importante en estrategias de curación del VIH-1. Este estudio, junto con los recientes hallazgos respaldan que para mejorar aún más el efecto anti-VIH-1 de CpG-C y GS-9620, se deben desarrollar estrategias inmunoterapéuticas combinando estas moléculas con intervenciones inmunológicas adicionales.

CAPITULO 3

**ENSAYO CLÍNICO EN FASE II PARA EVALUAR LA
SEGURIDAD Y EFICACIA DE VEDOLIZUMAB COMBINADO
CON TAR PARA CONSEGUIR LA CURACIÓN FUNCIONAL EN
PVVS SIN TAR PREVIO.**

INTRODUCCION

Los TAR actuales son capaces de suprimir la replicación del VIH-1 hasta niveles indetectables de carga viral plasmática, sin embargo, son ineficientes en la erradicación del virus (113). El VIH-1 es capaz de permanecer latente en reservorios tanto anatómicos como celulares (169, 170). Tras la interrupción del TAR, este reservorio se reactiva rápidamente aumentando la replicación del virus y conduciendo a un rápido aumento de la carga viral plasmática en la mayoría de las PVVS (171). Las alternativas terapéuticas actuales se basan en conseguir la erradicación de virus o la supresión permanente de la carga viral plasmática en ausencia de TAR también conocida como cura funcional, tal y como ocurre en las PVVS controladoras de élite (124). El GALT está especialmente enriquecido de linfocitos T CD4+, los cuales representan la principal diana del VIH-1 (172). Una de las rutas más usadas para el tráfico de los linfocitos T CD4+ a GALT es a través de la interacción entre la integrina $\alpha 4\beta 7$ expresada en la superficie de los linfocitos T CD4+ y la molécula de adhesión celular MadCAM-1 (del inglés “*mucosal vascular adhesion molecule 1*”) expresada principalmente en las vénulas del endotelio alto (80). Los viriones VIH-1 también son capaces de incorporar la integrina $\alpha 4\beta 7$ a su membrana (173). Asimismo, la proteína gp120 del VIH-1 puede unirse a la integrina $\alpha 4\beta 7$ expresada en la superficie de los linfocitos T CD4+ activando la molécula LFA-1 y promoviendo el establecimiento de la sinapsis virológica favoreciendo así la transmisión de la infección célula a célula (174). Los hallazgos de estudios anteriores sugieren que los linfocitos T CD4+ con mayor expresión de la integrina $\alpha 4\beta 7$ pueden ser infectados preferencialmente por el VIH-1 (175). Esto es un aspecto clave en la inmunopatogénesis del VIH-1 que debe tenerse en cuenta en el diseño de estrategias para la obtención de una remisión virológica sostenida ya que la mayoría de las células dianas para el VIH-1 se encuentran en el GALT. En esta línea,

también se ha descrito en ensayos con macacos que los linfocitos T CD4+ $\alpha 4\beta 7+$ poseen hasta 3 veces más reservorio que los $\alpha 4\beta 7-$ (176). Además, el bloqueo de la integrina $\alpha 4\beta 7$ reducía significativamente los niveles de reservorio en GALT (81, 176–178). Sin embargo, la asociación entre los niveles de reservorio en sangre periférica y en GALT y el bloqueo de la integrina $\alpha 4\beta 7+$ en PVVS no está clara. Los hallazgos más importantes relacionados con el papel que juega la expresión de la integrina $\alpha 4\beta 7$ en la infección, provienen de las evidencias que muestran que la susceptibilidad a infectarse por VIH-1 aumenta en relación a la proporción de linfocitos T CD4+ $\alpha 4\beta 7+$ (179–181). De acuerdo con estos hallazgos, la integrina $\alpha 4\beta 7$ parece ser una opción como diana terapéutica para la prevención o el tratamiento del VIH-1. En este contexto se publicó la supresión virológica permanente tras la IAT en macacos que recibieron una intervención conjunta de TAR y un anticuerpo monoclonal que bloquea la integrina $\alpha 4\beta 7$ (81). Estos resultados no han podido ser reproducidos (82–84). El éxito en el modelo de simios hizo al anticuerpo frente a la integrina $\alpha 4\beta 7$ un perfecto candidato como adyuvante al TAR con la finalidad de obtener la cura funcional. De hecho, ya existía un anticuerpo monoclonal frente a la integrina $\alpha 4\beta 7$ (Vedolizumab) aprobado para el tratamiento de enfermedades inflamatorias intestinales (78, 79). En base a estos hallazgos, se realizó un ensayo clínico para evaluar la eficacia de Vedolizumab en PVVS con infección crónica y carga viral suprimida bajo TAR (NCT02788175) (85). Simultáneamente, desde el Hospital Virgen del Rocío iniciamos el primer ensayo clínico para evaluar la seguridad y eficacia de Vedolizumab combinado con TAR para alcanzar la remisión virológica permanente en PVVS en infección reciente sin TAR previo tras la IAT. El objetivo principal del estudio fue evaluar la seguridad y eficacia de Vedolizumab para alcanzar la remisión virológica permanente en PVVS en infección reciente tras IAT. Como objetivos secundarios se planteó la caracterización exhaustiva

del perfil inmunológico asociado a los niveles de reservorio VIH-1 tanto en sangre periférica como en GALT tras el bloqueo la integrina $\alpha 4\beta 7$ *in vivo*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño del estudio

Se trata de un ensayo clínico en fase 2, abierto y de brazo único para evaluar la seguridad y eficacia virológica de Vedolizumab (Entyvio) combinado con TAR en sujetos con fecha conocida de infección por VIH-1 y sin TAR previo (Figura 1). Vedolizumab fue gentilmente suministrado por el Hospital Virgen del Rocío de Sevilla y el régimen de TAR escogido consistió en dolutegravir (DTG), tenofovir alafenamida (TAF) y emtricitabina (FTC). Este ensayo se llevó a cabo en el seno de la unidad de Enfermedades Infecciosas, Microbiología y Parasitología junto con la unidad de ensayos clínicos fase I/II del Hospital Universitario Virgen del Rocío (Sevilla, España). Los criterios de inclusión fueron:

- PVVS con una edad comprendida entre los 18 y 65 años.
- Viremia detectable superior a 10^4 copias ARN VIH-1-1/ml.
- Recuento de linfocitos T CD4+ superior a 350 células/ μ l.
- Aceptar la IAT.
- Firmar el correspondiente consentimiento informado.

Todos los participantes se incluyeron entre septiembre de 2018 y junio de 2019 comenzando simultáneamente el TAR y las infusiones intravenosas mensuales de Vedolizumab en las semanas 0, 4, 8, 12, 16, 20 y 24. Vedolizumab es un anticuerpo monoclonal humanizado antagonista de la integrina $\alpha 4\beta 7$ que impide su interacción con MadCAM-1 (182). El TAR y las infusiones de Vedolizumab se interrumpieron simultáneamente en la semana 24 de seguimiento. Todos los participantes se les realizó una colonoscopia con toma de muestra en íleon y ciego antes de comenzar el

tratamiento y en el momento de la interrupción de este; basal (BL) y semana 24 (S24). Durante la fase de interrupción se realizó una visita de seguridad mensual a todos los participantes donde se monitorizó, entre otros parámetros, el recuento de linfocitos T CD4+ y la viremia plasmática hasta la semana 48. Los criterios de reintroducción del TAR durante esta fase fueron:

- La disminución del recuento de linfocitos T CD4+ por debajo de las 350 células/ μ l.
- Cargas virales por encima de 10^5 copias ARN VIH-1-1/ml en dos visitas consecutivas.

Se determinaron estos criterios de reintroducción del TAR para poder observar un potencial control de la viremia tras un repunte de la carga viral después de la IAT. Se aconsejó reiniciar el TAR a los sujetos que alcanzaron el final del ensayo (semana 48) sin TAR pero con carga viral detectable (>20 copias ARN VIH-1-1/ml). Todos los efectos adversos y su gravedad fueron documentados según los criterios recogidos en: *“Division of AIDS Table for Grading the Severity of Adult and Pediatric Adverse Events, version 2.0, November 2014”*.

Este ensayo clínico fue aprobado por el comité ético de investigación en fármacos provincial de Sevilla (NCT: 03577782; Código interno: FIS-VED-2017-01, Código del estudio: N° EudraCT: 2018-000497-30) y autorizado por la agencia española del medicamento y productos sanitarios (AEMPS).

Determinaciones de laboratorio

El recuento de linfocitos T CD4+ y CD8+ absolutos se realizó mediante el citómetro de flujo FC500 (Beckman-Coulter, Brea,CA). Los niveles plasmáticos de carga viral RNA-

VIH-1 se cuantificaron mediante PCR cuantitativa (Cobas AmpliPrep/Cobas TaqMan HIV-1 test; Roche Molecular Systems, Basel, Switzerland) (Límite de detección: 40 copias ARN VIH-1/ml). Todos estos procedimientos se realizaron según las recomendaciones del fabricante.

Determinaciones de marcadores solubles y ácido retinoico

Las muestras de suero se recogieron en tubos separadores de suero y las de plasma en tubos con EDTA. Tanto los sueros como los plasmas fueron preservados a -20°C hasta la determinación de los siguientes marcadores: PCR, B2M y dímeros-D. Los niveles de PCR y B2M se determinaron mediante un ensayo en suero de inmunturbidimetría usando el analizador Cobas 701 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Los dímeros-D se cuantificaron mediante un inmunoensayo automatizado (HemosIL D-dimer HS 500; Instrumentation Laboratory, Bedford MA). Los niveles plasmáticos de ácido retinoico se determinaron mediante UHPLC-MS/MS según el método previamente descrito en la literatura científica (183–185).

Aislamiento de células mononucleares periféricas

El aislamiento de PBMCs se realizó usando tubos Vacutainer CPT Mononuclear Cell Preparation Tubes (con heparina sodio) mediante centrifugación con gradiente de densidad. Las muestras fueron extraídas antes de iniciar ambos tratamientos, una semana antes de cada infusión de Vedolizumab y en las semanas 28, 32, 36, 40, 44 y 48 del seguimiento tras IAT. Las PBMCs se conservaron en nitrógeno líquido hasta su procesamiento.

Aislamiento de células mononucleares procedentes de tejido gastrointestinal

Las biopsias de íleon y ciego se obtuvieron durante las colonoscopias realizadas en basal y semana 24 del seguimiento. Estas dos localizaciones fueron biopsiadas debido a sus diferentes características inmunitarias; más inductoras de la tolerancia o efectoras, respectivamente (186). Entre 10-13 biopsias se preservaron en medio R10 y se procesaron inmediatamente después del procedimiento. Estas biopsias se lavaron con PBS y EDTA al 14% durante 30 minutos a 37°C en agitación. Las biopsias se disgregaron de forma mecánica con cuchillas. Después, se incubaron con R10 y 20mg de colagenasa tipo IV (Sigma-Aldich) durante 30 minutos a 37°C en agitación suave. Durante esta incubación, se disgregó el tejido mediante pases con jeringuillas y agujas finas cada 15 minutos hasta quedar completamente disgregado. Tras esta incubación filtramos la suspensión celular obtenida con filtros de 70µm y lavamos abundantemente con medio R10. Las células resultantes se preservaron en nitrógeno líquido hasta su procesamiento. También se conservaron dos biopsias intactas y en *RNA later* a -80°C para la extracción de ADN y ARN respectivamente.

Inmunofenotipado y cuantificación de las células $\alpha 4\beta 7$

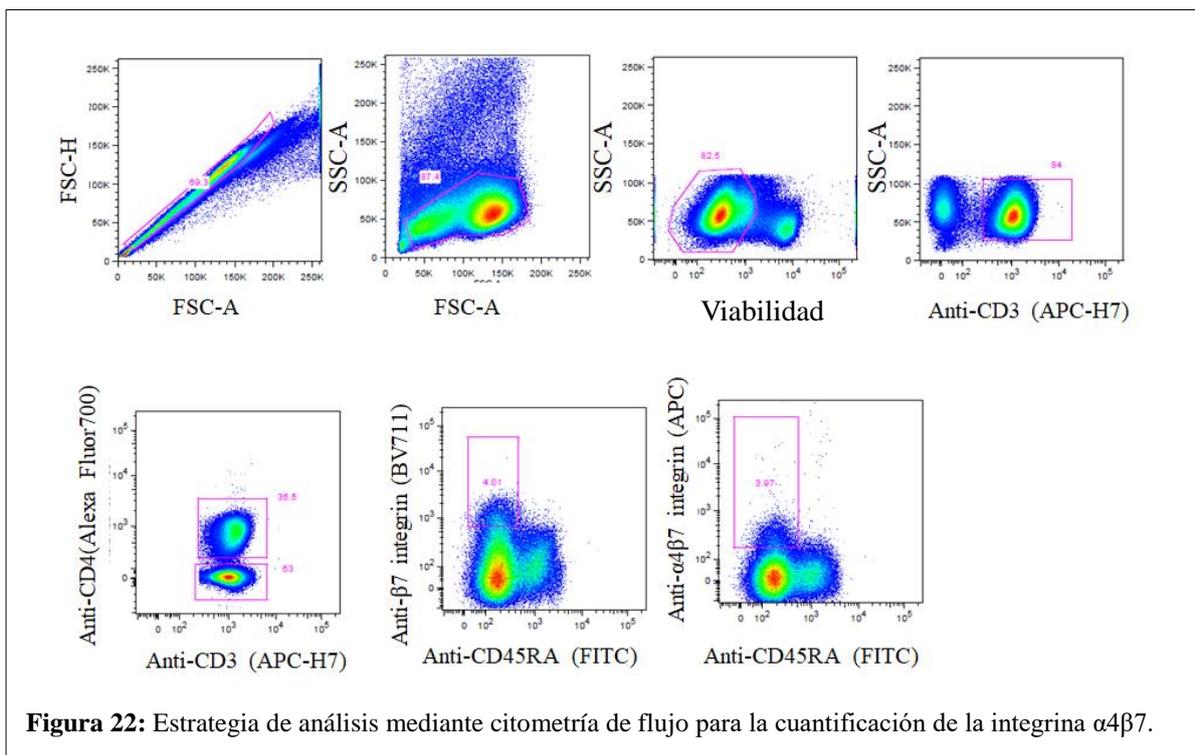
PBMCs: Tras descongelarse y lavarse con PBS se incubaron con el marcador de viabilidad *LIVE/DEAD Fixable Aqua Dead Cell Stain* (Life Technologies) y con los anticuerpos extracelulares anti-CD45RA (FITC), anti-TIGIT (PercpCy 5.5), anti-LAG3 (BV605), anti-PD1 (BV510), anti- $\beta 7$ (BV711), anti-CD27 (BV786), anti-CD38 (BV650), anti-CD3 (APCH7), anti- $\alpha 4\beta 7$ (APC), anti-TIM3 (PeCF594), anti-HLA-DR (BV570), anti-CD4 (AF700), anti-CD19, anti-CD14 y anti-CD56 (Pacific Blue). Tras la incubación se lavaron las células y se permeabilizaron con *Fixation/Permeabilization*

FoxP3 Kit (eBioscience) según las recomendaciones del fabricante. Las células se tiñeron con anti-Ki67 (PE), posteriormente se lavaron con el tampón de lavado correspondiente y se fijaron en PBS con PFA al 4%. Las muestras se adquirieron en el citómetro de flujo LSR-II Fortessa Cytometer (BD Immunocytometry Systems) y se analizaron usando el software FlowJo, version 9.2.

Células procedentes de tejido gastrointestinal: Tras descongelarse y lavarse con PBS se incubaron con el marcador de viabilidad LIVE/DEAD fixable Violet Dead cell stain y se incubaron con los siguientes anticuerpos extracelulares anti-CCR6 (Alexa Fluor 647), anti-CD45RA (FITC), anti-CD25 (PE-Cy7), anti-CXCR5 (BV421), anti-LAG3 (BV605), anti-CXCR3 (PerCP-Cy5.5), anti-PD1 (BV510), anti-CD127 (BUV737), anti-CD45 (BUV805), anti-CD8 (BUV615), anti-CD69 (BB700), anti-CD103 (BV480), anti-CCR7 (BUV563), anti-CD3 (APC-H7), anti-TIM3 (PE/DAZZLE 594), anti- α 4 β 7 (APC), anti-CD123 (Alexa Fluor700), anti-CD11c (BV650), anti-HLA-DR (BV570), anti- β 7 (BV711), anti-CD27 (BV786), anti-CD19, anti-CD14, anti-CD20 y anti-CD56 (Pacific Blue). Tras la incubación se lavaron las células y se permeabilizaron con Fixation/Permeabilization FoxP3 Kit (eBioscience) siguiendo las recomendaciones del fabricante y se incubaron con anti-FoxP3 (PE-Cy5) y anti-Ki67 (PerCP-eFluor 710), posteriormente se lavaron con el tampón de lavado correspondiente y se fijaron en PBS con PFA al 4%. Las muestras se adquirieron usando el citómetro espectral Cytex Aurora Spectral Cytometer 4L (Cytex Biosciences) y se analizaron usando el software FlowJo, version 9.2.

Todos los anticuerpos, clones y casas comerciales se encuentran recogidos en la Tabla suplementaria 3.

El anticuerpo monoclonal anti- $\alpha 4\beta 7$ (APC; clon ACT-1) nos lo proporciono gentilmente los doctores Danlan Wei y James Arthos del National Institute of Allergy and Infectious Disease (NIAID-NIH). Este anticuerpo comparte el mismo epítipo que Vedolizumab. La cuantificación de los niveles de integrina $\alpha 4\beta 7$ se realizó mediante este anticuerpo en el punto basal y a lo largo del seguimiento mediante la siguiente estrategia de análisis: CD4+CD45RO+ $\beta 7$ +. Numeroso estudios han demostrado que la población de linfocitos CD4+CD45RO+ $\beta 7$ son un >99% $\alpha 4\beta 7$ en sangre periférica; por lo cual hemos utilizado este análisis para cuantificar la expresión de $\alpha 4\beta 7$ en los linfocitos T CD4+ (175, 179, 187, 188). El porcentaje de integrina $\alpha 4\beta 7$ bloqueada por Vedolizumab se calculó usando esta población como referencia y combinando los anticuerpos anti- $\alpha 4\beta 7$ (APC; clon ACT-1) y anti- $\beta 7$ (BV711; clon FIB504).



Aislamiento de linfocitos T CD4+ α 4 β 7+

A partir de PBMCs se aislaron los linfocitos T CD4+CD45RO+ β 7+ y β 7- usando el separador celular BD FACSAria Fusion Flow Cytometer (BD Immunocytometry Systems) y el software de análisis FlowJo, version 9.2. Tras descongelarse y lavarse con PBS, las PBMCs se incubaron con el marcador de viabilidad LIVE/DEAD Fixable Aqua Dead Cell Stain (Life Technologies) y con los anticuerpos extracelulares antibodies anti-CD45RA (FITC), anti- β 7 (BV711), anti- α 4 β 7 (APC), anti-CD27 (BV786), anti-CD3 (APCH7), anti-CD4 (AF700), anti-CD19, anti-CD14 y anti-CD56 (Pacific Blue). Tras la incubación las células se lavaron y se preservaron en PBS hasta su separación.

Todos los anticuerpos, clones y casas comerciales se encuentran recogidos en la Tabla suplementaria 3.

Concentración plasmática de Vedolizumab e inmunogenicidad

La concentración plasmática de Vedolizumab y la presencia de anticuerpos anti-Vedolizumab se determinó mediante el uso de los inmunoensayos tipo ELISA RIDASCREE VDZ Monitoring (r-biopharm) según las recomendaciones del fabricante.

Cuantificación de ADN y RNA VIH-1-1 asociado a célula

Los niveles de ADN y ARN de VIH-1-1 se cuantificaron mediante ddPCR a partir de ADN y ARN extraído usando el lector BIO-RAD QX200 Droplet Reader. El ADN genómico procedente de PBMCs se extrajo utilizando el kit Blood DNA Mini Kit (Omega, Bio-Tek). Para las células CD4+CD45RO+ β 7+ y β 7- se usó el kit QIAamp DNA Micro Kit (Qiagen). Para el ARN a partir de PBMCs se usó el kit NucleoSpin

RNA purification kit (Macherey-Nagel) y para las células CD4+CD45RO+ β 7+ y β 7- el kit RNeasy Micro Kit (Qiagen). Las concentraciones de ADN y ARN se determinaron mediante Qubit Assay (ThermoFisher Scientific) y se llevaron todas a una concentración de 30ng/ μ l. La PCR se realizaron con una temperatura de anillamiento de 58°C usando el sistema Bio-Rad QX200 ddPCR y el número de copias se calculó mediante el software de análisis Bio-Rad QuantaSoft software v.1.7.4. Como genes de referencia para normalizar el número de copias se utilizó el RPP30, en el caso del ADN y el TBP en el caso de ARN.

Secuenciación proviral completa en PBMCs (FLIP-seq)

El ADN genómico, extraído a partir de PBMCs se diluyó en genomas provirales individuales en base los resultados de la ddPCR y la distribución estadística de Poisson, por lo que un provirus estaba presente en aproximadamente el 20-30% de los pocillos. Posteriormente, el ADN se sometió a la amplificación del genoma casi completo del VIH-1 utilizando una aproximación de PCR anidada de amplicón único. La reacción estaba compuesta por: una unidad por cada 20 μ l de reacción de Invitrogen Platinum Taq (catalog 11302-029), tampón 1x, MgSO₄ 2mM, dNTP 0.2mM, y cebadores a 0.4 μ M. Los productos de PCR se visualizaron mediante electroforesis en geles de agarosa. Las secuencias que parecían completas se sometieron a secuenciación mediante Illumina MiSeq. Mediante “Python programming language (<https://github.com/BWH-Lichterfeld-Lab/Intactness-Pipeline>)” se identificaron grandes deleciones perjudiciales, inserciones o codones de parada prematuros (189). La presencia o ausencia de mutaciones asociadas a APOBEC-3G/3F se determinó usando la base de datos Los Alamos National Laboratory (LANL) HIV Sequence Database Hypermut 2.0 program

(190). Las secuencias virales sin ninguna de las mutaciones citadas se clasificaron como secuencias intactas.

Determinación de ADN proviral intacto (IPDA) en células GI

El ADN genómico previamente extraído procedente de las biopsias de ileon y ciego se usó para la determinación de provirus intactos mediante IPDA. Esta técnica consiste una ddPCR para cuantificar provirus intactos, deleciones 5' y 3' y/o hipermutaciones (191).

Análisis estadístico

Las variables continuas se expresaron como medianas y rangos intercuartílicos. Las categóricas como números y porcentajes. El test de U de Mann-Whitney se usó para analizar diferencias entre muestras no apareada y el test de Wilcoxon para muestras apareadas. Las correlaciones se realizaron aplicando el test Spearman. Todos los valores para $p < 0.05$ se consideraron significativos. Los análisis estadísticos se realizaron usando el software estadístico para ciencias sociales (SPSS 22.0; SPSS, Chicago, IL, USA). La expresión simultánea de marcadores de agotamiento celular se analizó usando los softwares Pestle versión 1.6.2 y Spice versión 6 (suministrado por M. Roederer, NIH, Bethesda, MD) y se cuantificado mediante el índice de polifuncionalidad (Pindex) usando la versión beta 0.12 del software FunkyCells Boolean Dataminer (Suministrado por Martin Larson (INSERM U1135, Paris, Francia)) (192).

RESULTADOS

Características de los participantes y seguridad de Vedolizumab y TAR en PVVS

Entre septiembre y junio de 2019 se incluyeron en el ensayo clínico 10 PVVS recientemente infectadas sin TAR previo (9 hombres y una mujer) (Figura 23). Se administraron un total de siete infusiones de Vedolizumab a cada participante sin registrar ningún efecto adverso ni durante, ni tras la administración del fármaco. Ningún sujeto abandonó o tuvo que ser excluido del ensayo sin completar las 48 semanas. Ningún sujeto presentaba anticuerpos anti-Vedolizumab al inicio del ensayo (BL) ni los desarrollaron posteriormente (datos no mostrados). La mediana de tiempo de infección fue de 75 días (rango intercuartílico, 40-82). El tiempo de infección se calculó como el tiempo medio entre un test VIH negativo y el positivo (encontrándose las dos determinaciones dentro de una ventana temporal de seis meses) y/o 15 días antes del inicio de síntomas compatibles con el síndrome retroviral agudo. Las características demográficas e inmunológicas más importantes de los participantes están recogidas en la tabla 5. Podemos concluir que Vedolizumab es un fármaco seguro y bien tolerado en PVVS que no están bajo TAR.

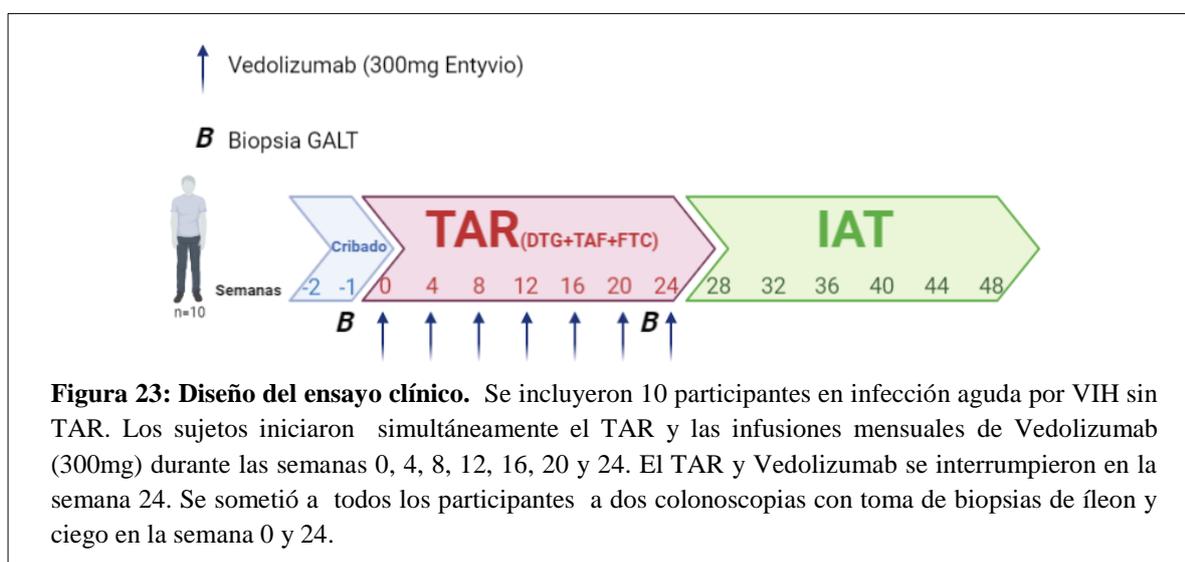


Figura 23: Diseño del ensayo clínico. Se incluyeron 10 participantes en infección aguda por VIH sin TAR. Los sujetos iniciaron simultáneamente el TAR y las infusiones mensuales de Vedolizumab (300mg) durante las semanas 0, 4, 8, 12, 16, 20 y 24. El TAR y Vedolizumab se interrumpieron en la semana 24. Se sometió a todos los participantes a dos colonoscopias con toma de biopsias de íleon y ciego en la semana 0 y 24.

Tabla 5: Características basales de los 10 sujetos incluidos en el ensayo clínico. El recuento de linfocitos T CD4+ y CD8+ y la carga viral plasmática basal se determinaron en la analítica de cribado en la semana -1 antes de comenzar el ensayo clínico.

Participantes	Edad	Sexo	Tiempo de infección (días)	Recuento Linf. T-CD4 (Células/μl)	Recuento Linf. T-CD8 (Células/μl)	Ratio CD4/CD8	Carga Viral (Log10 Copias ARN VIH-1/ml)
P 1	44	Masculino	71	569	454	1.25	6.80
P 2	23	Masculino	92	478	1285	0.37	6.09
P 3	40	Masculino	75	571	552	1.03	5.29
P 4	33	Masculino	75	728	973	0.74	4.01
P 5	43	Masculino	28	370	1138	0.32	6.12
P 6	42	Femenino	74	396	1112	0.35	5.15
P 7	42	Masculino	38	757	1294	0.58	7.00
P 8	28	Masculino	40	403	1074	0.37	7.00
P 9	23	Masculino	78	891	1716	0.51	5.09
P 10	40	Masculino	275	511	620	0.82	4.92

Eficacia tras la interrupción analítica del tratamiento

Ningún sujeto permaneció con carga viral suprimida sin TAR a la semana 48 de seguimiento (Figura 24A). Durante la fase de IAT, cuatro de ellos reiniciaron el TAR tras sufrir un repunte de la carga viral plasmática en dos determinaciones consecutivas ($>10^5$ copias ARN- VIH-1/ml). Los otros seis completaron el seguimiento sin cumplir criterios de reintroducción de TAR y con las siguientes cargas virales 1590 (participante 1, P1), 6250 (P4), 4670 (P6), 10000 (P8), 36450 (P9) y 4300 (P10) copias ARN- VIH-1/ml (Figura 24A). El sujeto P7 reintrodujo TAR en la semana 36, pero sufrió otro repunte de la carga viral en la semana 40. Este individuo informo de una falta de adherencia al TAR durante el ensayo y por lo cual fue excluido de los análisis virológicos. De hecho no se detectó ninguna mutación de resistencia a TAR en BL ni en las semanas 24, 28 y 48 en este sujeto. A nivel inmunológico, no solo no observamos una disminución del recuento de linfocitos T CD4+ a lo largo del seguimiento, sino que detectamos un incremento significativo de éstos en las semanas 24, 28 y 48 respecto al punto basal (Figura 24B). En resumen, no observamos una remisión virológica completa tras la interrupción de la administración conjunta de TAR y Vedolizumab en PVVS recientemente infectados.

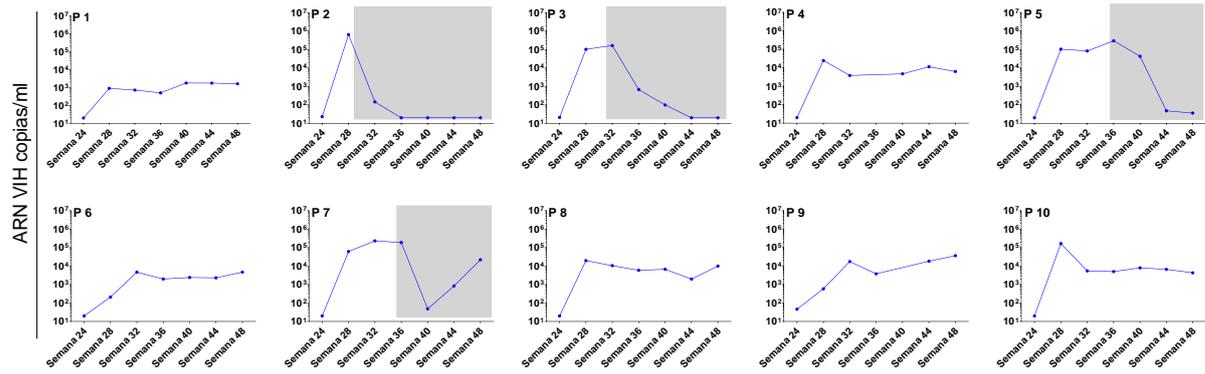
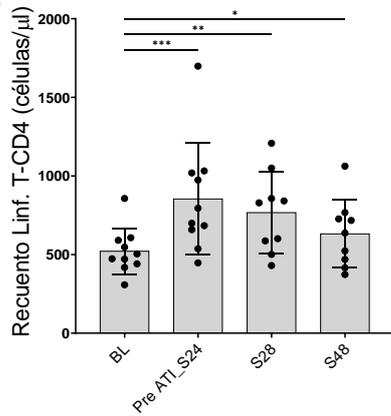
A**B**

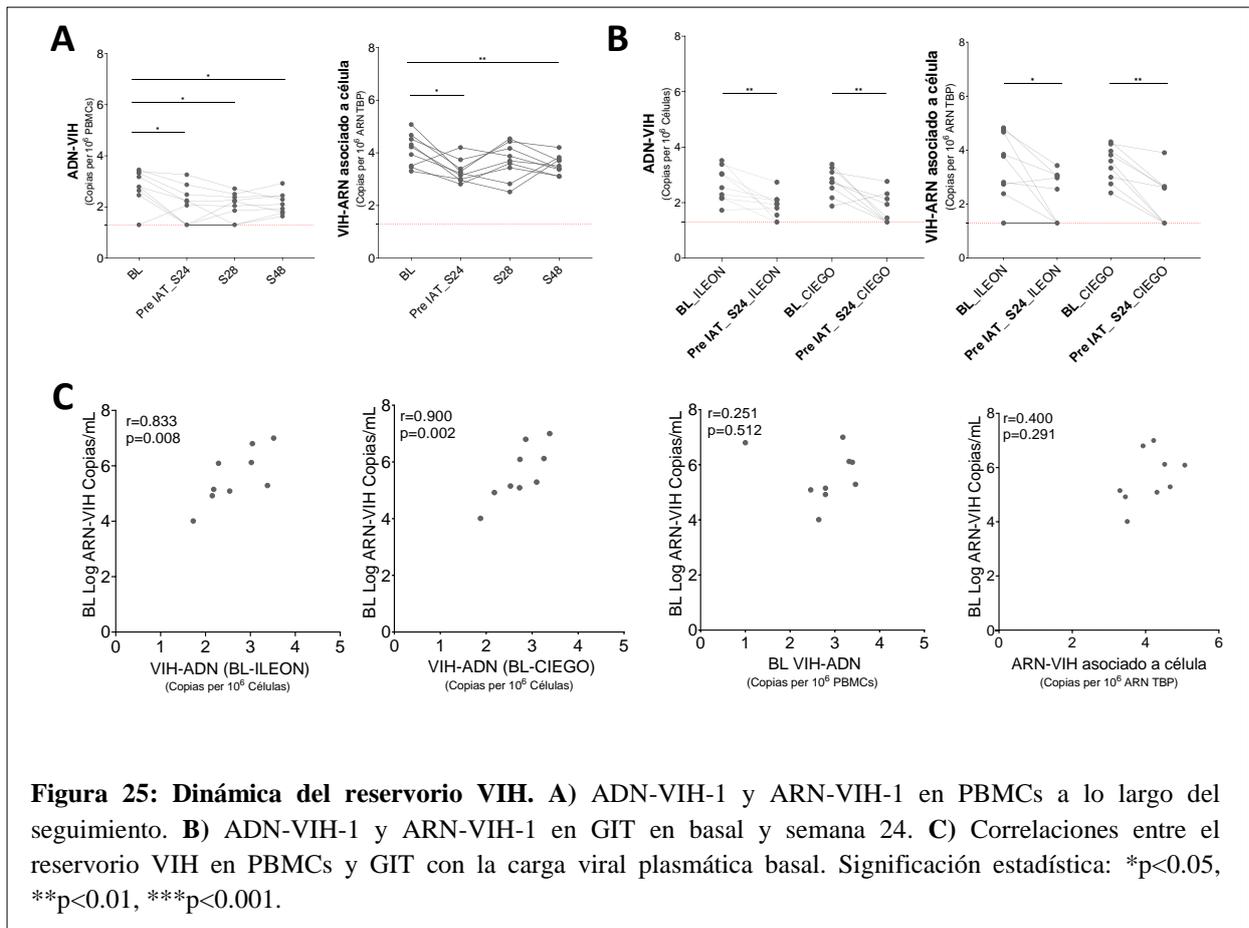
Figura 24: Efecto de la intervención en la viremia y el recuento de linfocitos T CD4+. Evolución de la carga viral tras la IAT (A) y el recuento de linfocitos T CD4+ durante el ensayo (B). Significación estadística: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

La terapia combinada disminuyó los niveles de reservorio VIH-1

A pesar de no obtener una remisión virológica completa, el diseño del ensayo nos permitió analizar los factores inmunológicos, centrándonos en la integrina $\alpha 4\beta 7$, asociados a los niveles de reservorio VIH-1 tanto en sangre periférica como en GIT. En primer lugar, analizamos los niveles de reservorio VIH-1; observando una disminución en los niveles de ADN-VIH-1 total de PBMCs en las semanas 24, 28 y 48 en relación con el punto basal (Figura 25A, panel izquierdo). Una dinámica similar se detectó también a nivel de ARN-VIH-1, excepto en la semana 28 (Figura 25A, panel derecho). Esto puede deberse a que en esta semana ningún participante se encontraba bajo TAR pero presentaban carga viral detectable. Es interesante destacar que los sujetos que cumplieron criterios de reintroducción de TAR mostraron niveles mayores de ADN-VIH-1 a lo largo de todo el seguimiento en comparación con los que alcanzaron la semana 48 sin TAR (Figura 26A, panel izquierdo). Respecto a los niveles de ARN-VIH-1 asociado a células solo se observaron estas diferencias en el punto basal y en la semana 28 (Figura 26A, panel derecho). En células procedentes de las biopsias de íleon y ciego también pudimos determinar los niveles de reservorio VIH-1 (Figura 25B). En este caso tanto los niveles de ADN-VIH-1 como ARN-VIH-1 asociados a células disminuyeron significativamente en ambas localizaciones en la semana 24 respecto al punto basal. No encontramos diferencias en los niveles de reservorio VIH-1 entre las dos localizaciones. En este caso, no encontramos diferencias entre los sujetos que completaron el ensayo sin TAR y los que reintrodujeron TAR, presentado niveles similares de reservorio VIH-1 en GIT (Figura 26B). También pudimos observar una potente correlación positiva entre el reservorio ADN-VIH-1 en íleon y ciego y la carga viral plasmática basal (Figura 25C panel izquierdo) que no se detectó con el reservorio VIH-1 en PBMCs (Figura 25C panel derecho).

Efecto de la intervención terapéutica en la expresión de la integrina $\beta 7$

La cuantificación de $\alpha 4\beta 7$ se realizó siguiendo la estrategia de análisis anteriormente citada: $CD4+CD45RO+\beta 7+$ (175, 177, 187, 188), sin observar diferencias significativas en su expresión a lo largo del ensayo en PBMCs (Figura 27A). Sin embargo, en los sujetos a los que se les reintrodujo el TAR presentaban un porcentaje mayor de células $CD4+CD45RO+\beta 7+$ en PBMCs en la semana 24 (Figura 28A).



Además, estas células se correlacionaron directamente con el reservorio VIH-1 en PBMCs en este punto del estudio (Figura 27B). También pudimos cuantificar los niveles de provirus intactos y defectivos dentro del total de ADN-VIH-1 en PBMCs, observando una asociación directa entre los provirus defectivos y el porcentaje de células $CD4+CD45RO+\beta 7+$ en la semana 24 (Figura 27C y 28B). A diferencia de lo

que ocurre en PBMCs (Figura 27A), sí que observamos una disminución en el porcentaje de células CD4+CD45RO+ β 7+ presentes en íleon y ciego en la semana 24 respecto al punto basal del ensayo (Figura 27D). Hay que destacar que no se observó una disminución en el porcentaje de linfocitos T CD4 totales en GIT (Figura 28C) ni tampoco diferencias entre los participantes que completaron en ensayo sin criterios de reintroducción de TAR y los que sí lo reintrodujeron (Figura 28D). Con el fin de analizar en profundidad el papel de la integrina α 4 β 7 en el establecimiento del reservorio se procedió a su cuantificación en las células CD4+CD45RO+ β 7+ y β 7- sorteadas en los puntos basal y semana 24 (Figura 27E). Las células CD4+CD45RO+ β 7+ contenían niveles superiores de ADN y ARN-VIH-1 asociado a células comparado con las CD4+CD45RO+ β 7- en ambos puntos del ensayo. Es importante destacar que solo se observó una disminución significativa del reservorio en las células CD4+CD45RO+ β 7+ en la semana 24 respecto al inicio del ensayo y no en las CD4+CD45RO+ β 7-.

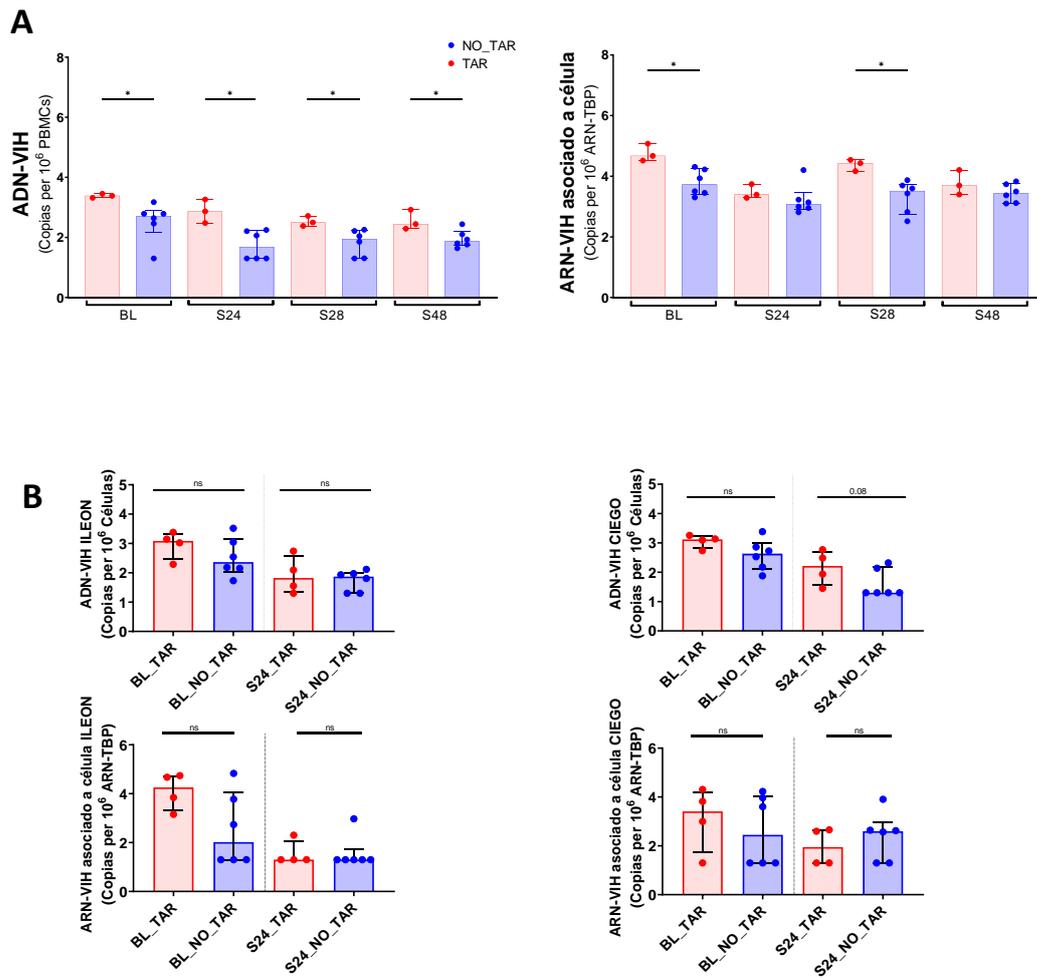


Figura 26: Comparación en la dinámica del reservorio ADN y ARN-VIH-1 asociado a células entre participantes que concluyeron el ensayo sin reiniciar TAR (NO TAR) y los que sí lo hicieron (TAR). PBMCs (A). Íleon y ciego (B). Significación estadística: *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

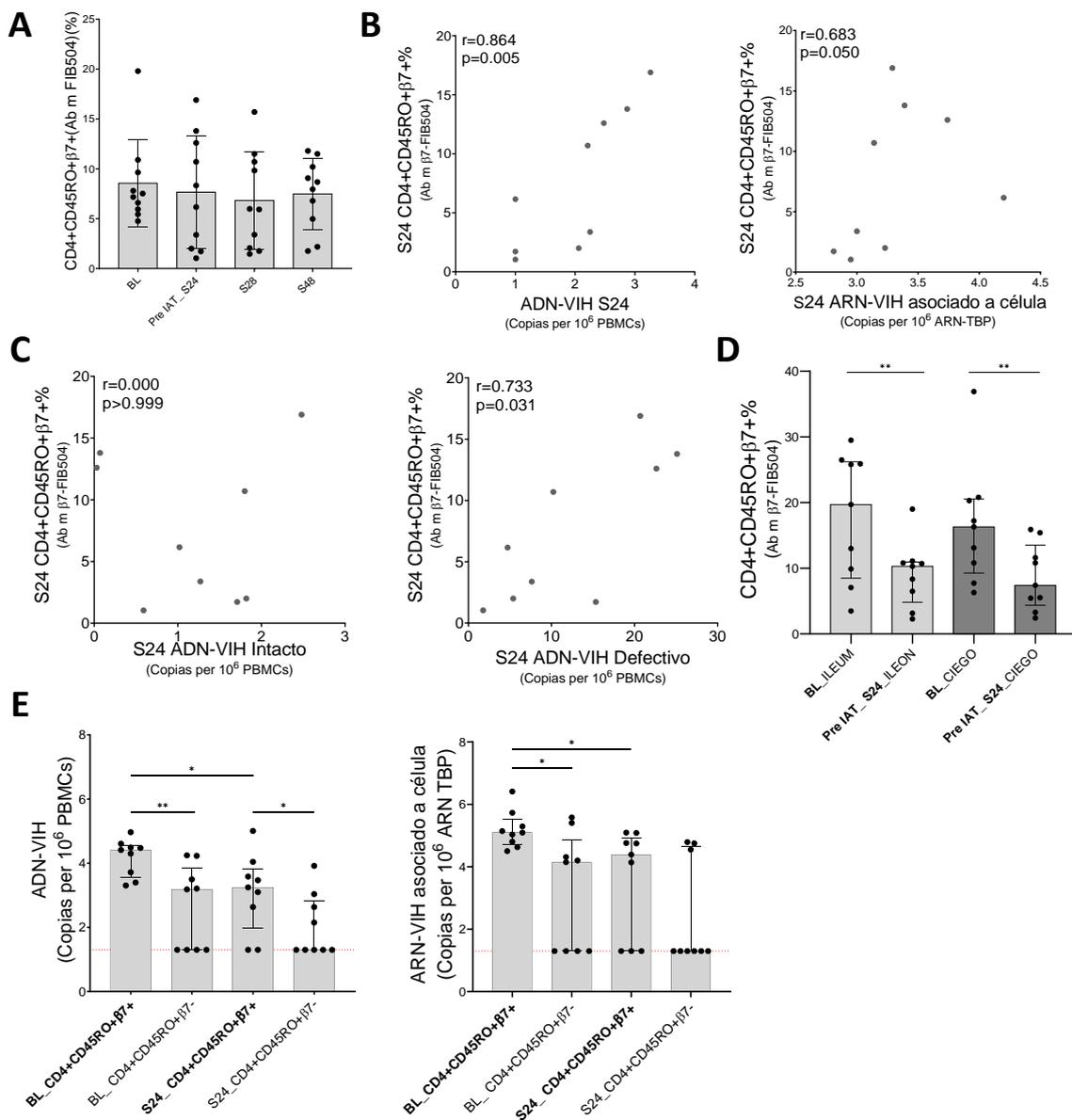


Figura 27: Asociación entre el tamaño y la calidad del reservorio VIH-1 en relación con la expresión de la integrina $\alpha 4\beta 7$. **A)** Dinámica en la expresión de la integrina $\alpha 4\beta 7$ en linfocitos de memoria T CD4 a lo largo del seguimiento en PBMCs. **B)** Asociaciones entre el reservorio VIH-1 y el porcentaje de células CD4+ $\alpha 4\beta 7$ + en PBMCs en la semana 24. **C)** Asociaciones entre provirus VIH-1 intactos y defectivos y el porcentaje de células CD4+ $\alpha 4\beta 7$ + en PBMCs en la semana 24. **D)** Dinámica en la expresión de la integrina $\alpha 4\beta 7$ en linfocitos de memoria T CD4 a lo largo del seguimiento en íleon y ciego. **E)** Niveles de ADN y ARN-VIH-1 en células sorteadas CD4+CD45RO+ $\alpha 4\beta 7$ + y CD4+CD45RO+ $\alpha 4\beta 7$ -. Significación estadística: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

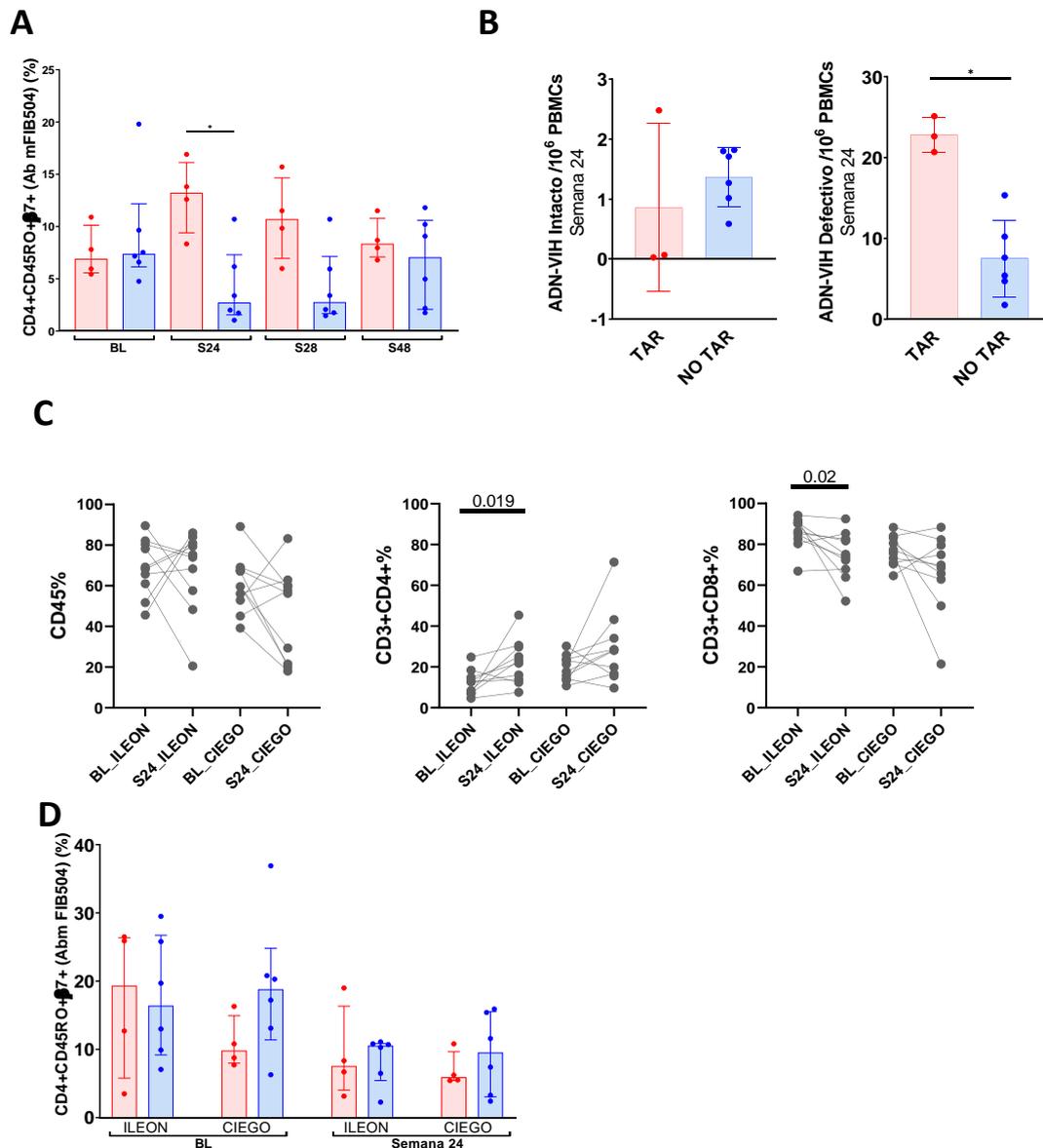


Figura 28: Niveles de integrina α 4 β 7 y calidad del reservorio VIH. Comparación en la expresión de la integrina α 4 β 7 entre los participantes que concluyeron el ensayo sin reiniciar TAR (NO TAR) y los que sí lo hicieron (TAR) en PBMCs a lo largo del seguimiento (A). Comparación entre los niveles de provirus intactos y defectivos entre los participantes que concluyeron el ensayo sin reiniciar TAR (NO TAR) y los que sí lo hicieron (TAR) en PBMCs (B). Porcentaje de leucocitos (CD45), linfocitos T CD4+ y CD8+ en íleon y ciego en los puntos basal y semana 24 del ensayo (C). Comparación en la expresión de la integrina α 4 β 7 entre los participantes que concluyeron el ensayo sin reiniciar TAR (NO TAR) y los que sí lo hicieron (TAR) en íleon y ciego, en los puntos basal y semana 24 del ensayo (D). Significación estadística: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

El bloqueo de la integrina $\alpha 4\beta 7$ se asocia con los niveles de reservorio

VIH-1

Se cuantificaron los niveles séricos de Vedolizumab antes de cada una de las siete infusiones hasta la semana 32 (Figura 29A). Las concentraciones obtenidas fueron muy similares a aquellas observadas en ensayos clínicos sobre enfermedad inflamatoria intestinal (78, 79), aunque la concentración media fue ligeramente inferior a la observada en PVVS en infección crónica (85). Esto puede deberse a que Vedolizumab también se puede estar uniendo a la integrina $\alpha 4\beta 7$ presente en la envuelta de los virus al poseer los participantes niveles elevados de carga viral plasmática. A pesar de esto, Vedolizumab fue capaz de bloquear completamente la integrina $\alpha 4\beta 7$ presente en los linfocitos T CD4+ de sangre periférica pero no fue así en íleon y ciego (Figura 29B). En este contexto, es importante destacar la asociación directa entre la fracción no bloqueada de CD4+CD45RO+ $\alpha 4\beta 7$ por Vedolizumab y el tamaño del reservorio VIH-1 en GIT, esta observación fue posible gracias al uso del anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$ (clon ACT-1) con el mismo epítipo que Vedolizumab (Figura 29C, panel izquierdo). Sin embargo, cuando usábamos el anticuerpo anti- $\beta 7$ (con un epítipo diferente a Vedolizumab, clon FIB504) que nos permitía identificar la población total CD4+CD45RO+ $\alpha 4\beta 7$ (células bloqueadas y no bloqueadas por Vedolizumab), no observábamos esta asociación (Figura 29C, panel derecho). En base a estos datos pudimos calcular el porcentaje de células CD4+CD45RO+ $\alpha 4\beta 7$ que presentaban la integrina $\alpha 4\beta 7$ bloqueada por su unión a Vedolizumab. No obtuvimos diferencias en el porcentaje de bloqueo entre íleon y ciego, ni entre individuos que finalizaron el ensayo sin TAR y los que requirieron reintroducirlo en la semana 24 (Figura 30). De forma esperable y tal y como ocurre la figura 29C, también encontramos una asociación entre el porcentaje de células CD4+CD45RO+ $\alpha 4\beta 7$ bloqueadas tanto en íleon como en

ciego y el tamaño del reservorio VIH-1. Otro resultado que es importante destacar es la correlación inversa entre los niveles totales de ADN-VIH-1 en íleon y la concentración sérica de Vedolizumab en la semana 24 (Figura 29E).

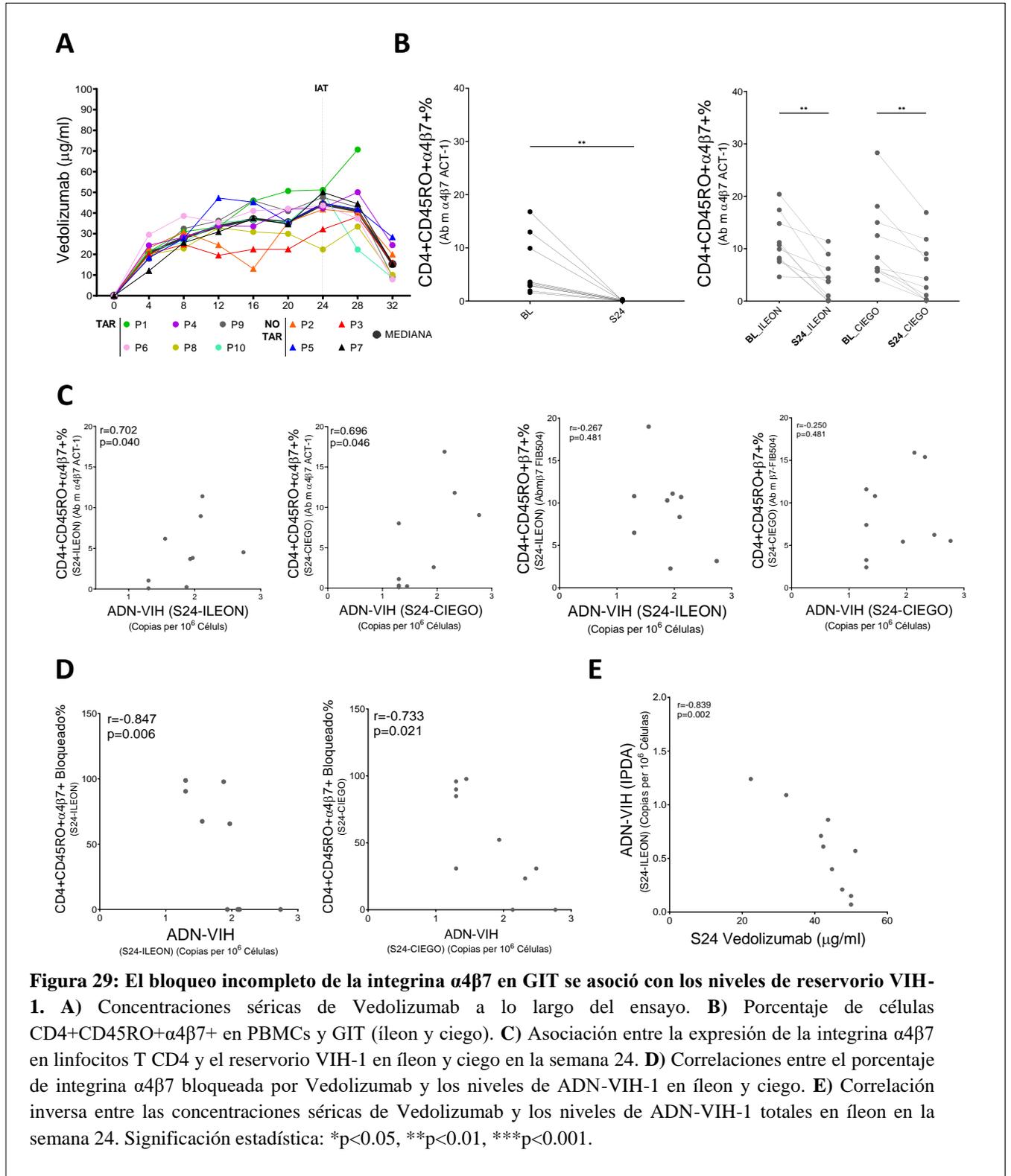


Figura 29: El bloqueo incompleto de la integrina α4β7 en GIT se asoció con los niveles de reservorio VIH-1. **A)** Concentraciones séricas de Vedolizumab a lo largo del ensayo. **B)** Porcentaje de células CD4+CD45RO+α4β7+ en PBMCs y GIT (íleon y ciego). **C)** Asociación entre la expresión de la integrina α4β7 en linfocitos T CD4 y el reservorio VIH-1 en íleon y ciego en la semana 24. **D)** Correlaciones entre el porcentaje de integrina α4β7 bloqueada por Vedolizumab y los niveles de ADN-VIH-1 en íleon y ciego. **E)** Correlación inversa entre las concentraciones séricas de Vedolizumab y los niveles de ADN-VIH-1 totales en íleon en la semana 24. Significación estadística: *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

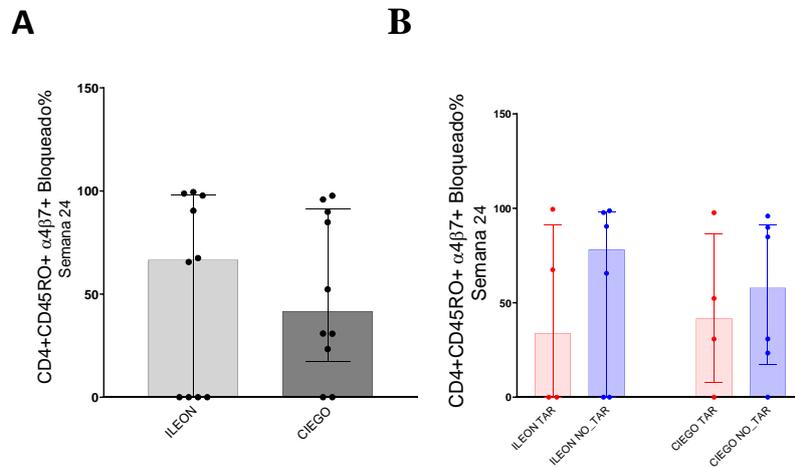


Figura 30: Porcentaje de integrina $\alpha 4\beta 7$ bloqueada por Vedolizumab. En los linfocitos T CD4+CD45RO+ $\alpha 4\beta 7$ + en íleon y ciego en la semana 24 de seguimiento (A). Comparación en el porcentaje de bloqueo de la integrina $\alpha 4\beta 7$ entre los participantes que concluyeron el ensayo sin reiniciar TAR (NO TAR) y los que sí lo hicieron (TAR) en íleon y ciego en la semana 24 de seguimiento (B). Significación estadística: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Los marcadores de agotamiento celular están asociados con el reservorio VIH-1 y la integrina $\alpha 4\beta 7$

Los marcadores de agotamiento celular se han asociado con los niveles de reservorio VIH-1 (49). En este trabajo hemos podido cuantificar la expresión de PD1, TIM3, TIGIT y LAG3 en los linfocitos T CD4 de memoria tanto en PBMCs como en células procedentes de GIT y analizar su asociación con la expresión de la integrina $\alpha 4\beta 7$ y con el reservorio VIH-1. Siguiendo la misma dinámica que la expresión de $\alpha 4\beta 7$ en sangre periférica (Figura 27A) no observamos diferencias en la expresión de PD1 a lo largo del seguimiento, mientras que los niveles de TIGIT (Figura 31A) y LAG3, pero no de TIM3 se redujeron significativamente en sangre periférica en la semana 24 (Figura 32A). La expresión de PD1 y TIGIT en los linfocitos T CD4+ de memoria se correlacionó positivamente con el porcentaje de células CD4+CD45RO+ $\beta 7$ + y con los

niveles de reservorio periférico VIH-1 (Figura 31B y C). Al calcular la expresión conjunta de estos marcadores más la integrina $\beta 7$, mediante el índice cuantitativo Pindex, pudimos observar que su expresión simultánea se correlacionaba con el porcentaje de células $CD4+CD45RO+\beta 7+$ y con el reservorio periférico VIH-1, presentando los individuos que necesitaron reiniciar el TAR los niveles más elevados (puntos rojos) (Figura 31D y Figura 32B). Profundizando más en el análisis de estas células $\alpha 4\beta 7+$, con elevado reservorio VIH-1 y fenotipo exhausto, encontramos que también se asociaban con marcadores solubles de inflamación como dímeros-D, PCR y B2M (Figura 31E). Los niveles de B2M disminuyeron a lo largo de ensayo, asociándose en la semana 24 con la expresión de PD1 y la integrina $\alpha 4\beta 7$ en los linfocitos T CD4 de memoria, de la misma forma que los niveles de dímeros-D se asociaron con el reservorio ADN-VIH-1 en el mismo punto del ensayo (Figura 31F).

Finalmente, también analizamos estos parámetros en el GIT. En este caso, y de forma opuesta a lo que observamos en PBMCs (Figura 31A), sí que observamos una disminución significativa en la expresión de HLA-DR, LAG3, TIM3 (Figura 32C) y PD1 (Figura 31G) en los linfocitos T CD4 de memoria en la semana 24 respecto al punto basal. Por otro lado hay que tener en cuenta que los linfocitos T CD4 foliculares (Tfh) expresan PD1 y la integrina $\alpha 4\beta 7$ (175) y aunque no observamos una variación en su porcentaje en GIT a lo largo del seguimiento (Figura 31H), esta subpoblación linfocitaria se asoció directamente con la fracción de linfocitos T $CD4+ \alpha 4\beta 7+$ no bloqueados por Vedolizumab en la semana 24. También observamos una tendencia con el reservorio ADN-VIH-1 en íleon.

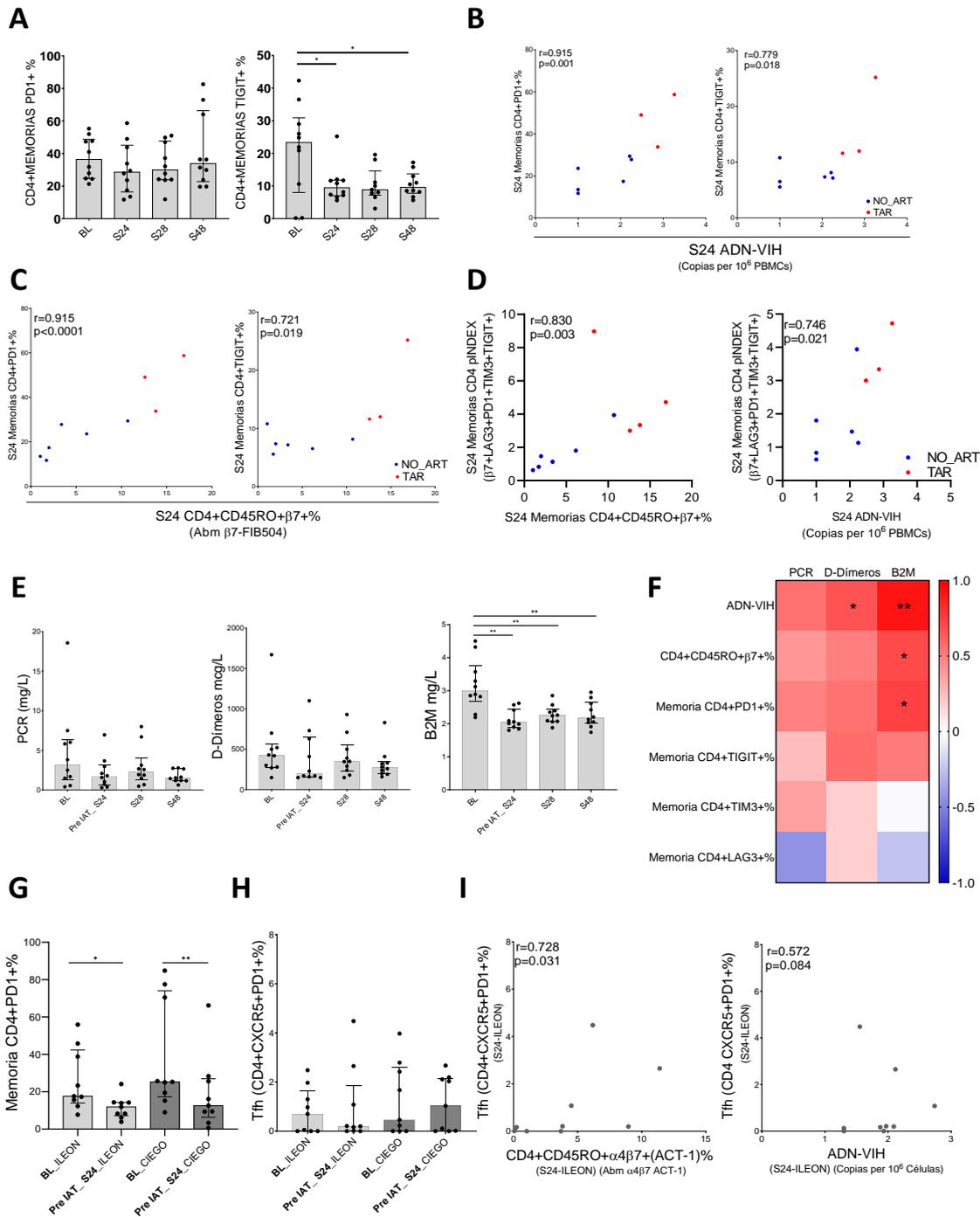
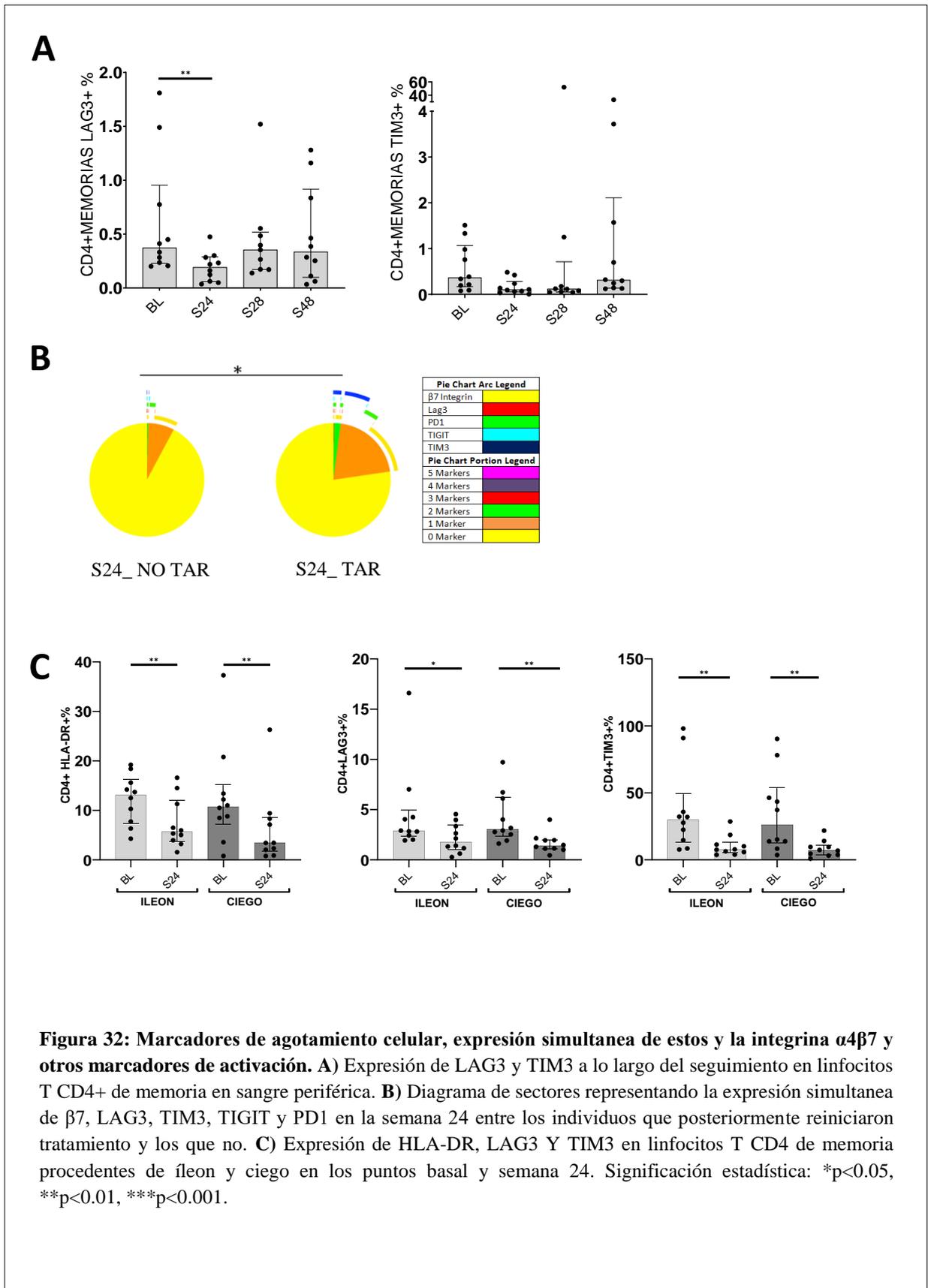
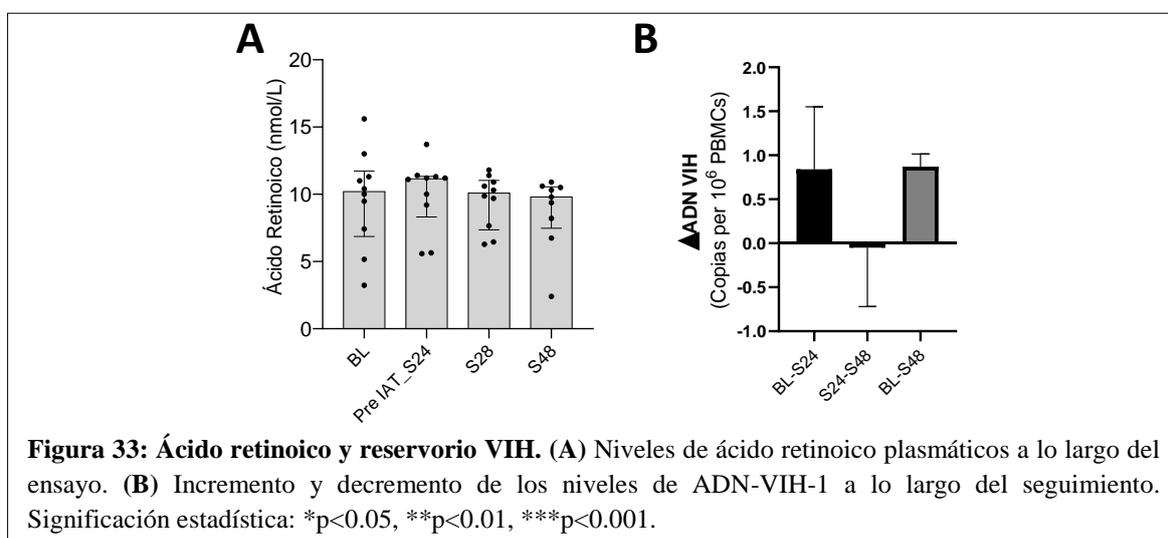


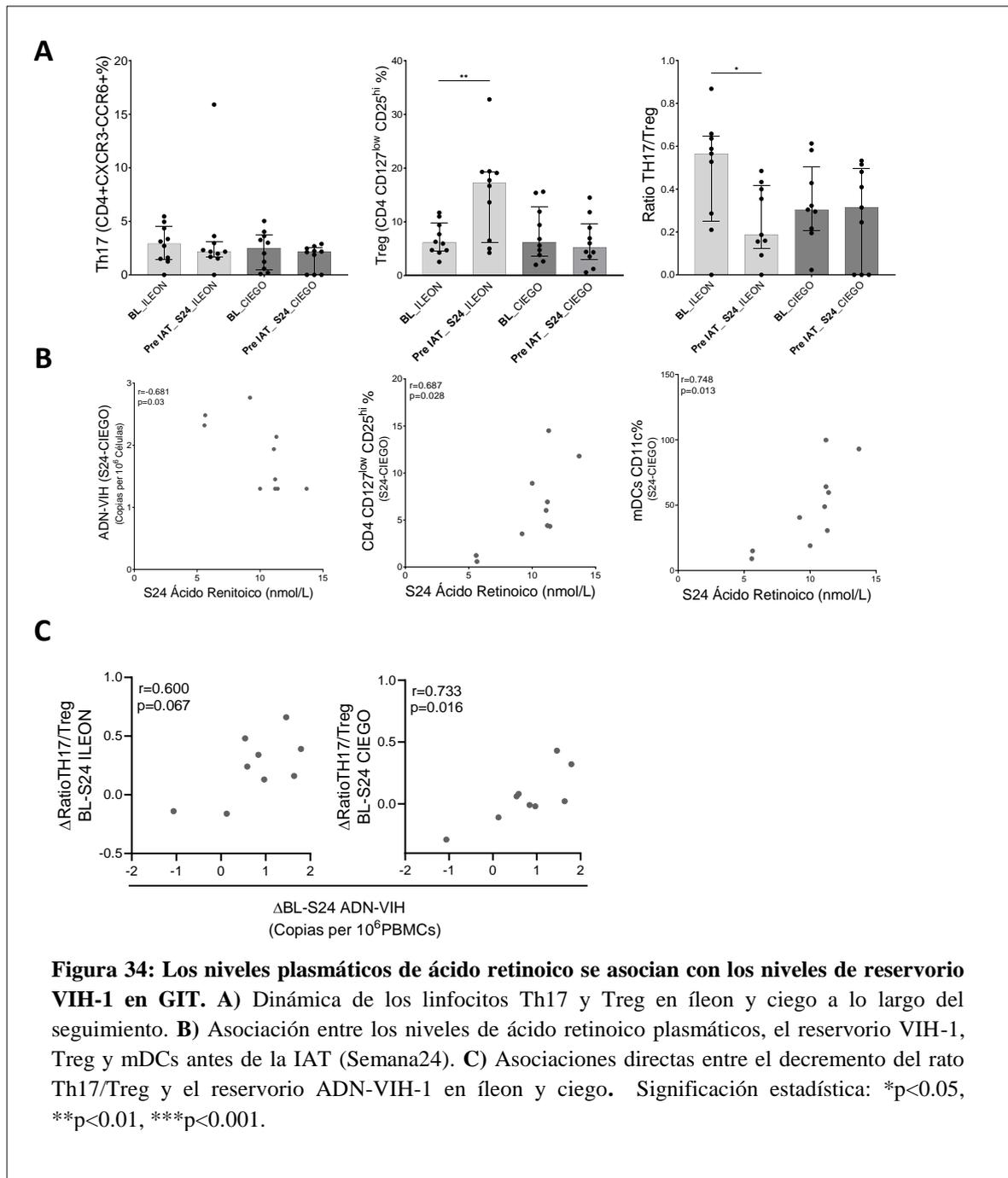
Figura 31: Los marcadores de agotamiento celular se asocian con la expresión de la integrina $\alpha 4\beta 7$ y con los niveles de reservorio VIH-1. **A)** Dinámica de la expresión de PD1 y TIGIT en linfocitos T CD4+ de memoria a lo largo del seguimiento en PBMCs. **B)** Correlaciones entre los niveles de ADN-VIH-1 y la expresión de PD1 y TIGIT en linfocitos T CD4+ de memoria en PBMCs antes de la IAT. **C)** Correlación entre la expresión de la integrina $\alpha 4\beta 7$ y las moléculas de agotamiento celular (PD1 y TIGIT) en linfocitos T CD4+ de memoria en PBMCs antes de la IAT. **D)** Asociaciones entre la expresión de la integrina $\alpha 4\beta 7$ y la expresión simultánea de $\alpha 4\beta 7$, LAG3, PD1 y TIM3 en los linfocitos T CD4+ de memoria en PBMCs antes de la IAT. **E)** Dinámica de los biomarcadores solubles de inflamación a lo largo del ensayo. **F)** Mapa de calor representando las correlaciones directas (rojo) e inversas (azul) entre biomarcadores solubles y niveles de ADN-VIH-1 en PBMCs y la expresión de $\alpha 4\beta 7$ y los marcadores de agotamiento celular en linfocitos T CD4+. **G)** Expresión de PD1 en linfocitos T CD4+ en GIT. **H)** Porcentaje de Tfh en GIT a lo largo del ensayo. **I)** Correlaciones entre Tfh y CD4+CD45RO+ $\alpha 4\beta 7$ y el reservorio ADN-VIH-1 en íleon antes de la IAT. Significación estadística: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.



Los niveles de ácido retinoico se asocian con el reservorio VIH-1 en GIT

Las principales subpoblaciones celulares asociadas con niveles altos de expresión de la integrina $\alpha 4\beta 7$ son: los linfocitos Tfh (Figura 31H), los T CD4+ reguladores (Treg) y los Th17 (Figura 34A). Al contrario de los que hemos descrito con los linfocitos Tfh (Figura 31I), no hemos observado asociaciones entre el porcentaje de linfocitos Treg y Th17 y la expresión de $\alpha 4\beta 7$. Sin embargo, el porcentaje de Treg aumento significativamente y consecuentemente el ratio Th17/Treg disminuyó en íleon en la semana 24 (Figura 34A). La ratio Th17/Treg, junto con los niveles de ácido retinoico intervienen en el mantenimiento de la homeostasis y la reparación de daños en el GIT. A pesar de que no hemos observado diferencias en las concentraciones de ácido retinoico plasmático a lo largo del seguimiento (Figura 33), sí que se asociaban de forma inversa con los niveles de ADN-VIH-1 en la semana 24, y de forma directa con los niveles de Tregs y con las mDCs en ciego justo antes de la IAT (semana 24) (Figura 34B). Finalmente, el decremento entre el punto basal y la semana 24 tanto del reservorio VIH-1 como del ratio Th17/Treg se asociaron entre sí directamente en íleon cómo y en ciego (Figura 34C).





DISCUSION

En este capítulo final hemos plasmado los resultados obtenidos en el ensayo clínico en fase II para analizar la seguridad y eficacia de Vedolizumab combinado con TAR para alcanzar la remisión virológica en PVVS en infección reciente. Podemos decir que Vedolizumab ha resultado ser seguro y bien tolerado en este tipo de sujetos. Sin embargo, y a pesar de que seis de los participantes concluyeron el ensayo sin criterios de reintroducción del TAR, no se obtuvo una remisión virológica completa en ningún individuo tras la IAT. No obstante, este estudio ha proporcionado importante información sobre el papel de la integrina $\alpha 4\beta 7$ en los niveles de reservorio VIH-1 tanto en sangre periférica como en tejido gastrointestinal (GIT).

Acorde con los resultados ya publicados en PVVS en infección crónica, las infusiones de Vedolizumab no han presentado efectos adversos presentando un perfil de seguridad muy adecuado para su uso las PVVS (85). Respecto a la eficacia virológica, ningún individuo obtuvo la remisión completa sin TAR durante el ensayo. Una vez más, estos hallazgos son consecuentes con los observados en infección crónica (85) y también con los estudios en modelos de simio (82–84). Sin embargo, los criterios más laxos de reintroducción del TAR tras la IAT adoptados en nuestro ensayo, nos han permitidos observar que el 60% de los participantes completaron el ensayo sin TAR, sin una disminución significativa en el recuento de linfocitos T CD4+ y con cargas virales comprendidas entre 1590 – 36950 (mediana [RIC]; 5495 [3311 – 13804 ARN-VIH-1 copias/ml]). La ausencia de un grupo control placebo nos impide determinar si Vedolizumab ha influido en los niveles de “set point” virales.

El diseño del estudio nos ha permitido analizar en profundidad el papel de la integrina $\alpha 4\beta 7$ en el establecimiento del reservorio VIH-1 tanto en sangre periférica como en

tejido gastrointestinal en humanos. En primer lugar, analizamos la dinámica a lo largo del seguimiento del reservorio VIH-1 en PBMCs y en GIT. Como era de esperar observamos una disminución pronunciada del reservorio en sangre periférica, al contrario que en los pacientes tratados en infección crónica (85), pero acorde a estudios anteriormente publicados de inicio temprano del tratamiento (193–195). En nuestro ensayo clínico, pudimos observar que los individuos que reintrodujeron el TAR mostraban niveles más elevados de reservorio VIH-1 tanto basalmente como en la semana 24 (IAT) y en la semana 48 (final del estudio) los sujetos que permanecían sin TAR seguían presentando niveles más bajos de reservorio VIH-1. Estos resultados son congruentes con trabajos anteriores que han relacionado el tamaño del reservorio VIH-1 (definido como ADN o ARN asociado a células) con el tiempo de rebote de la carga viral tras la IAT (196, 197). No existe mucha información sobre esta dinámica respecto el reservorio en GIT ya que las colonoscopias con toma de biopsias, aunque son seguras en PVVS en infección, es una técnica invasiva que no suele realizarse (198, 199). En nuestro caso hemos podido analizar la dinámica del reservorio VIH-1 en este tejido, observando una disminución semejante a la observada en PBMCs. De hecho, en nuestro estudio existe una asociación muy fuerte entre la carga viral plasmática y el reservorio VIH-1 en GIT que no se da en PBMCs, lo cual corrobora la importante contribución de este tejido no solo al reservorio VIH-1 sino también a la viremia, como ya se había sugerido en estudios anteriores con modelos animales (53). Los resultados obtenidos en este ensayo amplían el conocimiento sobre la dinámica del reservorio VIH-1 en GIT tras la introducción temprana del TAR.

No existe suficiente evidencia científica sobre la relación entre los niveles de integrina $\alpha 4\beta 7$, su bloqueo y la modulación del reservorio VIH-1 en sangre periférica y GIT en humanos. Nosotros hemos observado una fuerte asociación entre los linfocitos de

memoria CD4⁺ α4β7⁺ y el reservorio VIH-1 tanto en PBMCs como en íleon y ciego. Estos resultados se asemejan a los obtenidos en una cohorte de PVVS que iniciaron el TAR durante una fase de primoinfección muy temprana y donde observaron que la expresión de la integrina α4β7 en las células de la lámina propia de íleon y recto se asociaba directamente con la cantidad de ADN-VIH-1 (200). Incluso hemos podido determinar que esta asociación con la integrina α4β7 se debe principalmente a los niveles de ADN-VIH-1 pertenecientes a provirus defectivos y no a intactos (201). Los siguientes hallazgos sobre el papel de la integrina α4β7 en el establecimiento del reservorio los encontramos analizando la expresión de ésta a lo largo del ensayo tanto en sangre periférica como en GIT. Está ampliamente aceptado que los linfocitos de memoria CD4⁺ α4β7⁺ son, junto con las mucosas, una de las primeras dianas en la infección por VIH-1 (176, 177, 202, 203). En nuestros sujetos no detectamos variaciones significativas en la expresión de la integrina α4β7 en los linfocitos T CD4⁺ en sangre periférica a lo largo del ensayo. Sin embargo, sí que observamos una disminución en la expresión de la integrina α4β7 en íleon y ciego. Fuimos capaces de encontrar una explicación a este resultado gracias al uso de dos anticuerpos diferentes que con distintos epítomos de unión la integrina con respecto al que se une Vedolizumab. Esta estrategia de análisis nos permitió, observar que la integrina α4β7 se bloqueaba completamente en sangre periférica pero no así en GIT. Fuimos capaces de, calcular el porcentaje de células que estaban bloqueadas en íleon y ciego. Observando una asociación muy fuerte entre el reservorio VIH-1 y el porcentaje de linfocitos CD4⁺ α4β7⁺ que permanecía sin bloquear en GIT. Estos resultados son coherentes con los elevados niveles de reservorio VIH-1 hallados en los linfocitos de memoria T CD4⁺ α4β7⁺ sorteados en comparación con los α4β7⁻ y con hallazgos previos en modelos de simios (176). Estos resultados también nos hacen plantearnos si la administración de

Vedolizumab a dosis más elevadas habría aumentado su eficacia virológica. Los sujetos de nuestro ensayo recibieron una infusión mensual de 300mg de Vedolizumab (1.3mg/kg [3.6-5.02]) junto con su pauta de TAR. Esta dosis es la aprobada para su uso en enfermedades inflamatorias intestinales (78, 79). En ensayos anteriores en los que se ha administrado un análogo primatizado anti- $\alpha 4\beta 7$ a dosis de 50 mg/kg (hasta 10 veces superior a la dosis empleada en nuestro ensayo clínico) sí que se ha observado un bloqueo completo de la integrina $\alpha 4\beta 7$ en la superficie de los linfocitos en GIT (178, 204–206). Estos resultados sugieren que la reducción del reservorio VIH-1 puede estar asociada con las dosis de Vedolizumab empleadas. De hecho, encontramos una correlación potente entre los niveles de ADN-VIH-1 en íleon con los niveles de Vedolizumab en plasma justo antes de la IAT.

Seguimos analizando los resultados obtenidos para caracterizar al máximo posible la población de linfocitos de memoria T CD4 que expresaban la integrina $\alpha 4\beta 7$ y su asociación con los niveles de reservorio VIH-1. La expresión de los marcadores de agotamiento celular PD1, LAG3 y TIM3 en los linfocitos T se ha identificado como un nicho preferencial del establecimiento del reservorio VIH-1 (49). Acorde con la evidencia previa (126), observamos que la coexpresión de estos marcadores junto con la integrina $\alpha 4\beta 7$ en los linfocitos de memoria T CD4+ también se correlacionaba de manera estrecha con los niveles de reservorio. Estas moléculas se han identificado, en algunas cohortes, como potentes predictores del tiempo de que tarda en reaparecer la carga viral plasmática tras la IAT (131). En nuestra cohorte, los individuos que reintroducían el TAR presentaban niveles más elevados de expresión de estas moléculas junto con $\alpha 4\beta 7$ (CD3+CD4+ $\alpha 4\beta 7$ +LAG3+PD1+TIGIT+TIM3+) en el momento de la IAT respecto a los que alcanzaban el final del ensayo sin TAR. De forma interesante, encontramos que este fenotipo de agotamiento se asoció con marcadores inflamación

como B2M y los dímeros-D, este último previamente asociado con los niveles de ARN VIH-1 asociado a células (207). En este sentido, fue interesante observar también la disminución de los niveles de expresión de LAG3, TIM3 y PD1 en linfocitos T CD4+ de GIT a lo largo de seguimiento, lo que va de la mano con la disminución del reservorio VIH-1 en tejido.

Finalmente, el diseño de este estudio nos ha permitido analizar la reconstitución inmune del GIT mediante las principales subpoblaciones de linfocitos T CD4 que expresan $\alpha 4\beta 7$: Treg, Tfh y Th17 (208, 209) en relación con la homeostasis del GIT y el reservorio VIH-1. No se observó una reconstitución en los niveles de Th17 ni de Tfh, de hecho los linfocitos Tfh que expresan constitutivamente PD1, se asociaron con el porcentaje de linfocitos T CD4+ $\alpha 4\beta 7$ + no bloqueado por Vedolizumab y se observó una tendencia a correlacionar con el reservorio VIH-1 en íleon. Señalando la predilección del VIH-1 por esta subpoblación linfocitaria (210). Sin embargo, los niveles de Treg aumentaron a lo largo del seguimiento y consecuentemente el ratio Th17/Treg que ha sido clásicamente asociado con la homeostasis del GIT y la progresión de la enfermedad, disminuyó (211, 212). En este ensayo, además, hemos podido observar que esta ratio Th17/Treg se asociaba con la dinámica del reservorio periférico VIH-1 a lo largo del ensayo. Igualmente, el ácido retinoico también juega un papel crucial en la homeostasis de este tejido, induciendo la expresión de la integrina $\alpha 4\beta 7$ (213, 214). Es más, las DC del GIT inducen la diferenciación de las células Treg mediante la producción de ácido retinoico a partir de Vitamina A (215, 216). En este mismo sentido las concentraciones de ácido retinoico plasmáticas se asociaban directamente con el porcentaje de DC en ciego. Este proceso de reconstitución inmunitaria en función de la localización en el GIT fue concomitante con la asociación inversa en la semana 24 de las concentraciones de ácido retinoico plasmático y los

niveles de reservorio ADN-VIH-1 en ciego. Este fenómeno, puede estar relacionado con la posible función del ácido retinoico como agente reversor de la latencia (217).

Globalmente los resultados observados en este ensayo pueden ir en la línea a los obtenidos en los modelos de simios en los cuales bloquear la integrina $\alpha 4\beta 7$ con Vedolizumab junto con anticuerpos neutralizantes retrasaba el repunte de la carga viral tras la IAT (206) y también en humanos donde se ha descrito que el uso de terapias anti- $\alpha 4\beta 7$ que inducían cambios en los agregados linfoides en el GIT y su posible impacto en este reservorio anatómico del VIH-1 (218).

Este ensayo presenta algunas limitaciones como el bajo número de sujetos incluidos. Esta limitación se puede justificar debido a los estrictos criterios de inclusión, por los cuales solo se incluyó a PVVS en infección reciente con fecha conocida de esta. Otra limitación importante es la ausencia de un grupo control placebo debido al hecho de tratarse de un estudio de prueba de concepto. Esto es, los objetivos virológicos iniciales se definieron como el número de sujetos que alcanzaban con carga viral indetectable el final del ensayo (semana 48). Por este motivo no se incluyó un grupo control sin tratamiento con Vedolizumab y sometido a la IAT. Sin embargo, y a pesar de esta limitación y de no haber logrado la remisión viral, el diseño del ensayo nos ha permitido obtener información muy valiosa sobre la relación entre los niveles de integrina $\alpha 4\beta 7$ y los niveles de reservorio tanto en sangre periférica como en GIT.

Podemos concluir que Vedolizumab es seguro y bien tolerado en PVVS sin TAR previo. No hemos obtenido una remisión virológica completa tras al IAT en individuos tratados con Vedolizumab en una fase temprana de la infección por VIH-1. Sin embargo, de este ensayo hemos podido concluir que la integrina $\alpha 4\beta 7$ es un factor importante en el establecimiento del reservorio VIH-1 tanto en sangre periférica como

en GIT en humanos. Consecuentemente, estos resultados establecen las bases del uso de Vedolizumab a dosis apropiadas y en combinación con otras moléculas en futuras estrategias para la curación del VIH-1.

MATERIAL SUPLEMENTARIO

Tabla suplementaria 1:

IL1 α IL1 β IL6 IL8 IL10 TNF α	Monocitos Clásicos		Monocitos Intermedios		Monocitos No Clásicos	
	BL vs FT	FT vs Ctrl	BL vs FT	FT vs Ctrl	BL vs FT	FT vs Ctrl
++++++	0.024	0.564	0.671	0.802	1.000	1.000
-+++++	0.023	0.020	0.315	0.725	0.755	0.802
+ -++++	0.229	0.451	0.932	0.802	1.000	1.000
++-+++	0.005	0.108	0.193	0.802	0.887	0.802
+++ -++	0.734	0.328	0.051	0.841	0.470	1.000
++++ -+	0.054	0.269	0.552	0.802	1.000	1.000
+++++-	0.671	0.280	0.810	1.000	1.000	1.000
--++++	0.193	0.006	0.479	0.451	0.630	1.000
- - -+++	0.016	0.004	0.030	1.000	0.755	0.802
+ - -+++	0.044	0.132	0.630	1.000	0.865	0.880
- + - -++	0.218	0.012	0.218	0.422	0.315	0.980
+ - - -++	0.229	1.000	0.887	0.802	0.630	1.000
+ + - - -+	0.095	0.063	0.041	0.651	0.315	0.132
- + + + -+	0.066	0.016	0.506	0.280	1.000	1.000
+ - + + -+	0.119	0.315	0.810	1.000	0.810	1.000
+ + - + -+	0.004	0.688	0.229	1.000	0.810	1.000
+ + + - -+	0.955	0.482	0.470	1.000	0.630	1.000
- + + + -+	0.497	0.001	0.229	1.000	1.000	1.000
+ - + + -+	0.350	0.802	0.810	1.000	0.755	0.802
+ + - + -+	0.282	0.160	0.630	1.000	1.000	1.000
+ + + - -+	0.734	0.315	1.000	1.000	1.000	1.000
+ + + + - -	0.188	0.380	0.470	1.000	1.000	1.000
- - - + + +	0.002	0.001	0.174	0.616	0.336	1.000
- - - + + +	0.745	0.002	0.821	0.292	0.955	0.315
- + - - + +	0.257	0.000	0.149	0.292	0.799	0.145
+ - - - + +	0.034	0.014	0.084	0.616	0.039	0.292
- - + + - +	0.100	0.007	0.372	0.315	0.723	0.616
- + - - + +	0.022	0.025	0.051	0.900	0.810	1.000
+ - - - + +	0.000	0.530	0.149	0.670	0.713	0.880
- + + - - +	0.350	0.209	0.013	0.725	0.552	0.802
+ - + - - +	0.257	0.841	0.470	1.000	0.810	1.000
+ + - - - +	0.015	0.436	0.229	1.000	0.174	0.802
- - + + + -	0.843	0.002	0.202	0.802	1.000	1.000
- + - + + -	0.084	0.000	0.084	0.802	1.000	1.000
+ - - + + -	0.017	0.315	0.149	1.000	0.810	1.000
- + + - + -	0.444	0.009	0.269	0.763	0.766	0.880
+ - + - + -	0.017	0.451	0.692	0.802	1.000	1.000
+ + - - + -	0.977	0.050	0.092	1.000	0.630	1.000
- + + + - -	0.506	0.002	0.039	0.564	0.932	0.802
+ - + + - -	0.021	0.422	0.462	0.616	1.000	1.000
+ + - + - -	0.041	0.192	0.336	1.000	1.000	1.000
+ + + - - -	0.497	0.802	0.810	0.670	1.000	1.000
- - - - + +	0.444	0.000	0.745	0.002	0.179	0.008
- - - - + +	0.002	0.005	0.003	0.960	0.213	0.547
- - - - + +	0.552	0.018	0.777	0.688	0.110	0.616
- + - - - +	0.060	0.393	0.029	0.547	0.229	0.530

+ - - - - +	0.004	0.633	0.149	0.564	0.002	0.407
- - - + + -	0.054	0.003	0.030	0.219	0.692	0.960
- - + - + -	0.671	0.001	0.223	0.145	0.133	0.145
- + - - + -	0.234	0.001	0.005	0.960	0.411	0.616
+ - - - + -	0.016	0.120	0.008	1.000	0.470	1.000
- - + + - -	0.590	0.003	0.403	0.006	0.515	0.315
- + - + - -	0.257	0.012	0.329	0.366	0.396	0.802
+ - - + - -	0.000	0.228	0.004	1.000	0.157	0.802
- + + - - -	0.799	0.011	0.079	0.514	0.350	0.451
+ - + - - -	0.218	0.025	0.282	0.393	0.087	0.616
+ + - - - -	0.004	0.763	0.229	0.393	0.810	1.000
- - - - - +	0.070	0.016	0.022	0.063	0.295	0.160
- - - - + -	0.524	0.132	0.041	0.120	0.506	0.422
- - - + - -	0.028	0.145	0.098	0.063	0.006	0.547
- - + - - -	0.865	0.002	0.899	0.035	0.571	0.025
- + - - - -	0.357	0.467	0.000	0.192	0.034	0.841
+ - - - - -	0.002	0.228	0.003	0.744	0.008	0.802

Tabla suplementaria 2:

Anticuerpos	Casa Comercial	Catálogo
Purified anti- CD49d, clone 9F10	BD Biosciences	Cat# 555501
Purified anti- CD28, clone CD28.2	BD Biosciences	Cat# 555725
BV650 anti- CD107a, clone H4A3	BioLegend	Cat# 328638
FITC anti- CD45RA, clone L48	BD Biosciences	Cat# 335039
APCH7 anti- CD27, clone M-T271	BD Biosciences	Cat# 560222
FITC Lin-2 (anti- CD3, CD14, CD19, CD20, CD56), CD3 21 clone SK7, CD19 clone SJ25C1, CD20 clone L27, CD14 clone MφP9 and CD56 clone 22 NCAM16.2	BD Biosciences	Cat# 643397
BV421 anti- CD86, clone 2331 (FUN-1)	BD Biosciences	Cat# 562432
BV786 anti- PD-1 (CD279), clone EH12-1	BD Biosciences	Cat# 563789
BV605 anti- LAG3, clone 11C3C65	Biolegend	Cat# 369324
PerCPCy5,5 anti- TIGIT, clone A15153G	Biolegend	Cat# 372718
BV421 anti- IL-2, clone MQ1-17H12	BD Biosciences	Cat# 564164
PeCy7 anti- IFN γ , clone B27	BD Biosciences	Cat# 557643
AF700 anti- TNF α , clone MAb11	BD Biosciences	Cat# 557996
Pe anti- Perforin, clone B-D48	BioLegend	Cat# 353304
BV786 anti- CCR7 (CD197), clone 3D12	BD Biosciences	Cat# 563710
Pe anti- IDO, clone eyedio	eBioscience, San Diego, CA, USA	Cat#12-9477-42
BV711 anti- HLA-DR, clone G46-6	BD Biosciences	Cat# 563696
PeCF594 anti- PDL1 (CD274), clone MIH1	BD Biosciences	Cat# 563742
APC anti- Integrin- β 7, clone FIB504	BD Biosciences	Cat# 551082
PerCPCy5,5 anti- CD4, clone OKT4	BioLegend	Cat# 317428
AF700 anti- CD123 (anti-hIL-3), clone 32703	N R&D, San Diego, CA	Cat# FAB301
APC-Cy7 anti- CD1c, clone L161	BioLegend	Cat# 331520
PeCy7 anti- CD141, clone M80	BioLegend	Cat# 344110
BV650 anti- CD11c, clone B-ly6	BD Biosciences	Cat# 563404
BV605 anti- CD16, clone 3G8	BD Biosciences	Cat# 563172
FITC anti- CD81, clone JS-81	BD Biosciences	Cat# 551108
BV605 anti- CD4, clone RPA-T4	BD Biosciences	Cat# 562658
BV650 anti- CD86, clone 2331(FUN-1)	BD Biosciences	Cat# 563412
APC-Cy7 anti- CD5, clone UCHT2	BD Biosciences	Cat# 563516
PeCy5.5 anti- CD2, clone S5.5	ThermoFisher	Cat# CD0218
PE/Dazzle 594 Anti- TIM3, F38-2E2	Biolegend	Cat# 345033
AF700, anti- TNF- α , clone Mab11	BD Biosciences	Cat# 557996
AF700, anti- TLR-7	R&D SYSTEM	Cat# IC5875N
BV421, anti- TLR-9	Novus Biologicals	Cat# 26C593.2
BV711, anti- integrin β 7, clone FIB504	BD Biosciences	Cat# 744012
BV510, anti- CD123, clone 7G8	BD Biosciences	Cat# 563072
PE, anti- IL-17A, Clone eBio64DEC16	ThermoFisher	Cat# 12-7179-40
BV421, anti- IL2, clone MQ1-17H12	BD Biosciences	Cat#566273

Tabla suplementaria 3:

Anticuerpo	Fluorocromo	Clon	Casa comercial	Catalogo
Anti-CD45RA	FITC	L48	BD Biosciences	Cat# 335039
Anti-TIGIT	PerCPCy5,5	A15153G	Biolegend	Cat# 372718
Anti-PD-1	BV510	EH12.1	BD Biosciences	Cat# 563076
Anti-LAG3	BV605	11C3C65	Biolegend	Cat# 369324
Anti-CCR7	BUV563	3D12	BD Biosciences	Cat# 741317
Anti-HLA-DR	BV570	L243	Biolegend	Cat# 307637
Anti-Integrin- β 7	BV711	FIB504	BD Biosciences	Cat# 744012
Anti-CD4	AF700	RPA-T4	BD Biosciences	Cat# 557922
Anti-CD27	BV786	L128	BD Biosciences	Cat# 563327
Anti-CD38	BV650	HIT2	BD Biosciences	Cat# 740574
Anti-CD19	Pacific Blue	SJ25-C1	Invitrogen	Cat#MHCD1928
Anti-CD14	Pacific Blue	TuK4	Invitrogen	Cat# MHCD1428
Anti-CD56	Pacific Blue	MEM-188	Biolegend	Cat# 304629
Anti-CD20	Pacific Blue	2H7	Biolegend	Cat# 302328
Anti-CD3	APCH7	SK7	BD Biosciences	Cat# 560176
Anti-Integrin- α 4 β 7	APC	ACT-1	*	*
Anti-TIM3	PE/Dazzle 594	F38-2E2	Biolegend	Cat# 345033
Anti-Ki67	PE	Ki-67	Biolegend	Cat# 350504
Anti-Ki67	PerCP-eFluor 710	20Raj1	eBioscience	Cat# 46-5699-42
Anti-CD123	AF700	32703	R&D, San Diego,CA	Cat# FAB301
Anti-CD11c	BV650	B-ly6	BD Biosciences	Cat# 563404
Anti-CD25	PE-Cy7	M-A251	Biolegend	Cat# 356108
Anti-CXCR5	BV421	RF8B2	BD Biosciences	Cat# 562747
Anti-CXCR3	Pe-Cy5.5	1C6/CXCR3	BD Biosciences	Cat# 560832
Anti-CD127	BUV737	HIL-7R-M21	BD Biosciences	Cat# 564300
Anti-CD45	BUV805	HI30	BD Biosciences	Cat# 612891
Anti-CD8	BUV615	SK1	BD Biosciences	Cat# 612994
Anti-CD69	BB700	FN50	BD Biosciences	Cat# 747520
Anti-CD103	BV480	Ber-ACT8	BD Biosciences	Cat# 746472
Anti-FoxP3	PE-Cy5	236A/E7	Invitrogen	Cat# 15-4777-42

DISCUSION INTEGRADA

Durante la presente tesis doctoral nos hemos centrado en estudiar los mecanismos subyacentes a los principales obstáculos que actualmente existen en el manejo de la infección por VIH-1: la disminución de la inflamación crónica persistente y la cura de esta infección. A pesar de que el avance en los tratamientos y en el manejo clínico de la enfermedad ha sido realmente abrumador en los últimos 40 años, convirtiendo una infección mortal en una patología crónica, todavía no se ha logrado obtener una solución a estas dos cuestiones.

Respecto a la inflamación crónica durante la infección por VIH-1, la evidencia científica ha descrito ampliamente que la presencia del VIH-1 produce un estado de activación e inflamación de bajo grado persistente en las PVVS a pesar de encontrarse bajo TAR con carga viral indetectable (23, 219). Debido a la existencia de vías comunes de transmisión del virus, muchas de las PVVS también se infectaron con el VHC, especialmente en nuestro entorno. De hecho, uno de los principales ENOS ha sido la enfermedad hepática terminal, causada por el VHC, hasta la introducción de los AAD (220, 221). Este estado de co-infección VIH-1/VHC produce una disfunción inmunitaria que establece unos niveles de activación e inflamación en las PVVS co-infectadas superiores a los de las mono-infectadas, viéndose aumentado el riesgo de padecer fibrosis hepática y eventos cardiovasculares (99, 100). En el trabajo realizado durante esta tesis doctoral hemos podido observar como la erradicación del VHC, tras el tratamiento con AAD, es capaz de modular tanto el fenotipo como la función de los monocitos logrando un perfil menos inflamatorio y con una menor activación y polifuncionalidad de estos. Consideramos este hecho especialmente importante, ya que los monocitos parecen ser una de las principales fuentes de biomarcadores solubles de

inflamación relacionados con el desarrollo de ENOS en PVVS (23, 101). Uno de los hallazgos principales de este estudio es la redistribución de las tres poblaciones de monocitos hacia un perfil menos pro-inflamatorio debido a la disminución de los monocitos CD16+ tras el tratamiento con AAD. Este hecho es muy beneficioso ya que en trabajos anteriores, se han relacionado los monocitos CD16+ con el desarrollo de eventos cardiovasculares tanto en sujetos mono-infectados VIH-1 como co-infectados VIH-1/VHC (102). Por otro lado también observamos que el tratamiento con AAD era capaz de disminuir el fenotipo de inmunosenescencia, inducido por la co-infección VIH-1/VHC (29, 97), mediante la reducción de determinados marcadores (CD49d, CD40 y CX3CR1) o el incremento de otros (CD62L). Esto junto con la disminución en los niveles de CD163 soluble, B2M y dímeros-D, asociados directamente con la mortalidad durante la infección por VIH-1 (35, 107), muestra los grandes beneficios de la erradicación del VHC mediante el tratamiento con AAD. Sin embargo, aunque observamos un incremento en la calidad de la respuesta a LPS por parte de los monocitos tras el aclaramiento del VHC, que se vio reflejado en una disminución en la producción de citoquinas y consecuentemente en la polifuncionalidad, producción simultánea de citoquinas, no detectamos una reducción en la producción de TNF- α , IL-6 e IL-10, los cuales permanecieron elevados en todas las poblaciones de monocitos. Esto es importante ya que la IL-6 está considerada un marcador predictivo tanto de progresión de la enfermedad a SIDA como del desarrollo de ENOS (109, 222). Es posible que estos marcadores no lleguen a alcanzar los niveles de las PVVS mono-infectadas debido al daño irreversible producido en el sistema inmunitario durante la co-infección de ambos virus (VIH-1/VHC) o que requieran más tiempo tras del aclaramiento del VHC para disminuir sus niveles. Finalmente, y debido a las características de nuestra cohorte de estudio, no observamos un impacto en los niveles

de reservorio en sangre periférica. Sin embargo, sí que pudimos detectar que el fenotipo activado de los monocitos antes del aclaramiento del VHC se asociaba directamente con este. Estableciéndose así una relación entre la activación celular y la preservación del reservorio, la cual se rompe cuando esta activación disminuye. Es importante resaltar que este estudio muestra la importancia del aclaramiento del VHC en los individuos co-infectados VIH-1/VHC produciendo un potente efecto anti-inflamatorio sobre los monocitos. No obstante, al menos a corto plazo, no se observa una normalización total en todos los parámetros. La co-infección produce un estado inflamatorio adicional al de la infección por VIH-1 y su erradicación es muy importante de cara a la disminución del riesgo a desarrollar ENOS, no solo hepáticos sino también extrahepáticos, en estos sujetos (100).

Otro de los objetivos prioritarios en la investigación del VIH-1 es la consecución de una remisión virológica persistente o cura funcional de la infección. Para esto se están invirtiendo grandes esfuerzos en encontrar moléculas que junto con el TAR habitual potencien la actividad natural antiviral del sistema inmunitario y alcanzar así, tras una intervención terapéutica temporal, la cura funcional de la infección por VIH-1. En esta tesis doctoral hemos investigado mediante un ensayo *in vitro* y otro *in vivo* las posibilidades y los mecanismos celulares y moleculares en este contexto empleando: los agonistas de TLR (AT-2, CpG-A, CpG-C y GS-9620) y el anticuerpo monoclonal humanizado Vedolizumab.

La evidencia científica recoge ampliamente la importancia de las pDCs en la infección por VIH-1 asociándose tanto al control natural de la infección como a su progresión (73, 128, 129). De hecho, en los resultados mostrados en la presente tesis doctoral, describimos como el fenotipo *ex vivo* de estas pDCs se asocia tanto a biomarcadores solubles de inflamación como a marcadores de agotamiento celular expresados en

linfocitos T. Presentando los grupos INR y VIR un fenotipo similar *ex vivo* más activado y exhausto que el resto de grupos de estudio. Este agotamiento celular surge de la activación constante de los linfocitos T debido a una exposición a antígenos del VIH-1 que conducen a un estado de disfunción linfocitaria. Además, algunos autores indican que contribuyen de forma importante al reservorio celular (49, 130–133) ya que la expresión simultánea de varios de estos marcadores se ha asociado con la carga viral y con niveles bajos de producción de citoquinas en respuesta a antígenos propios del VIH-1 (126). Nosotros hemos observado asociaciones entre el fenotipo de las pDCs *ex vivo* de los distintos grupos de estudio con los niveles de biomarcadores solubles de inflamación y la expresión de estos marcadores de agotamiento celular en linfocitos T tanto CD4+ como CD8+. Estos resultados sugieren la relación entre el estado de activación de la pDC y el fenotipo de agotamiento celular de los linfocitos T en PVVS. De hecho, durante la infección aguda la expresión de TIM3 en los linfocitos T es elevada, sin embargo, en PVVS bajo TAR no se encuentran diferencias en la expresión de este marcador respecto a individuos no infectados pudiendo indicar que el TAR es efectivo también en cuanto a la reducción de la expresión de este marcador (133, 134). En este contexto, el uso de agonistas de TLR como potenciadores de la actividad antiviral natural de la pDC y gracias a su potencial función como agente reversor de la latencia pueden ser una potente herramienta en el diseño de intervenciones terapéuticas con el fin de lograr la cura funcional de la infección por VIH-1. Respecto a los mecanismos moleculares de los agonistas de TLR-7 y -9 hemos podido observar que estos inducen en las pDCs un fenotipo maduro activado mediante el incremento de la expresión de marcadores de activación, transcripción de genes relacionados con la vía del interferón, factores de restricción y producción de citoquinas. Incluso los grupos de estudio INR y VIR lograron niveles de activación similares a los EC.

Adicionalmente, el resultado más importante de este ensayo *in vitro* fue el incremento en los linfocitos T CD4+ y CD8+ con respuesta VIH-1 específica mediada por las pDCs previamente estimuladas vía TLR. Los grupos de estudio IR y EC presentaron los niveles más elevados de respuesta pero, es interesante destacar que incluso los individuos INR y VIR incrementaron su producción de citoquinas en respuesta a antígenos propios del VIH-1 tras el co-cultivo de sus linfocitos con pDCs previamente estimuladas con GS-9620. Es decir, el potenciamiento de la funcionalidad de la pDC a través de la estimulación de los TLR puede alcanzar un fenotipo similar en relación con la respuesta VIH-específica al del control espontáneo del VIH-1, siendo especialmente llamativo en el caso de los estímulos CpG-C y GS-9620. Además, estos resultados, junto con otros estudios publicados recientemente, muestran el importante papel de la pDC como célula presentadora de antígenos capaz de inducir una potente respuesta T (160–162). Hay que destacar también que este estudio nos ha permitido observar asociaciones directas entre el incremento de la respuesta VIH-1 específica por parte de los linfocitos T con la transcripción de factores de restricción (BST2, SAMHD1, APOBEC3G y TRIM5 α) y de *TNF- α* , *IFN- α* , *IRF3* e *IRF7* por parte de las pDCs. Por tanto, los resultados obtenidos en este ensayo no solo demuestran que los agonistas de TLR actúan como potenciadores de las pDCs con la consecuente inducción de una potente respuesta VIH-1 específica en los linfocitos T, sino que ejercen un efecto adicional antiviral mediante la inducción de la expresión de factores de restricción y moléculas implicadas en la vía de los IFN-I.

Perseverando en el análisis de moléculas que puedan administrarse junto con el TAR para alcanzar la cura funcional de la infección por VIH-1, llevamos a cabo un ensayo clínico con una intervención conjunta de TAR junto con Vedolizumab en PVVS en infección reciente sin TAR previo. A pesar de que seis de los diez participantes

concluyeron el ensayo sin criterios de reintroducción del TAR, no se obtuvo una remisión virológica completa en ningún individuo. Sí que pudimos corroborar que Vedolizumab es un fármaco bien tolerado y seguro para las PVVS, tal y como ya se había descrito en infección crónica (85). No obstante, este ensayo clínico nos ha permitido obtener información valiosa sobre la dinámica del reservorio VIH-1 tras el inicio de TAR tanto en sangre periférica como en GIT, y acerca del papel de la integrina $\alpha 4\beta 7$ en su establecimiento. A diferencia de la dinámica observada en individuos en infección crónica (85), en esta tesis sí que observamos durante el seguimiento una disminución de los niveles de reservorio VIH-1 en sangre periférica muy similar a resultados publicados de dinámicas tras el inicio temprano de TAR (193–195). Respecto al reservorio en íleon y ciego, no sólo detectamos una disminución similar a la observada en sangre periférica, sino que tal y como otros estudios en modelos animales ya habían sugerido (53), encontramos una fuerte asociación entre el reservorio en tejido y la viremia, reafirmando su importancia no solo en la contribución al reservorio anatómico del VIH-1 sino también a los niveles de carga viral periférica.

Por otro lado, la evidencia científica respalda el hecho de que una de las dianas iniciales en la infección por VIH-1 son los linfocitos de memoria T CD4+ $\alpha 4\beta 7+$ (176, 177, 202, 203), nuestros resultados son coherentes con estos estudios en modelo animal, hallando niveles más elevados de reservorio en los linfocitos de memoria T CD4+ $\alpha 4\beta 7+$ que en los $\alpha 4\beta 7-$. A pesar de no observar una variación en la expresión de esta integrina en los linfocitos T CD4+ de sangre periférica, sí que detectamos una disminución de su expresión en íleon y ciego. En este contexto, la estrategia de análisis elegida para la cuantificación de la integrina $\alpha 4\beta 7$ nos permitió detectar que Vedolizumab bloqueaba completamente la integrina $\alpha 4\beta 7$ en sangre periférica pero no en íleon y ciego. En este ensayo clínico la dosis de Vedolizumab fue la aprobada para su uso en sujetos con

enfermedad inflamatoria intestinal (78, 79), 1.3mg/kg [3.6-5.02]. En cambio en ensayos anteriores, en los que sí que se ha observado un bloqueo completo de la integrina en GIT, la dosis suministrada era hasta 10 veces superior (50mg/kg) (178, 204–206). De hecho, los niveles de ADN-VIH-1 en íleon de nuestros sujetos se correlacionaban fuertemente con los niveles plasmáticos de Vedolizumab en la semana 24, sugiriendo que la reducción del reservorio VIH-1 puede ser dosis dependiente y que quizás con una dosis mayor de Vedolizumab habríamos obtenido resultados virológicos más eficaces.

Otro resultado importante obtenido de este ensayo clínico es la asociación de la co-expresión de los marcadores de agotamiento celular (LAG3, PD1, TIM3 y TIGIT) junto con la integrina $\alpha 4\beta 7$ con los niveles de reservorio en linfocitos T CD4+ de memoria. De hecho, en nuestra cohorte los sujetos que reintroducían el TAR, no solo presentaban niveles más elevados de estas moléculas sino también de reservorio periférico VIH-1. Como se ha comentado anteriormente estas moléculas ya se han relacionado con el establecimiento del reservorio (49, 126).

Globalmente, podemos concluir que el bloqueo de la integrina $\alpha 4\beta 7$ por Vedolizumab no ha logrado obtener una remisión virológica completa tras la IAT en PVVS en infección reciente sin TAR previo. No obstante, los resultados obtenidos muestran la gran importancia de la integrina $\alpha 4\beta 7$ en el establecimiento del reservorio en sangre periférica y en GIT, y por tanto justifican su bloqueo en futuras estrategias inmunoterapéuticas para conseguir una remisión virológica persistente en PVVS.

En resumen, en la presente tesis doctoral hemos identificados factores inmunológicos asociados al estado de activación e inflamación persistente junto con el establecimiento y mantenimiento del reservorio VIH-1, tanto periférico como en tejido gastrointestinal. Estos resultados establecen las bases celulares y moleculares para el diseño de futuras

estrategias inmunomoduladoras con el fin de obtener el control de la viremia VIH en ausencia de tratamiento antirretroviral y consecuentemente la cura funcional de esta infección.

CONCLUSIONES

1_ La erradicación del VHC tras el tratamiento con AAD en PVVS promueve una redistribución más favorable de las subpoblaciones de monocitos (disminuyendo el porcentaje de monocitos CD16+), la reducción de marcadores superficiales de activación en las diferentes subpoblaciones (CD40, CX3CR1, CCR5 y CD49d) y la disminución de la producción de citoquinas inflamatorias y consecuentemente del índice de polifuncionalidad.

2_ Pese a que se observa una disminución de los marcadores de inflamación tras el tratamiento con AAD, algunos parámetros no llegan a normalizarse, este daño inmunológico puede tener implicaciones en el desarrollo de eventos no SIDA aunque desconocemos si es irreversible a largo plazo.

3_ La estimulación a través de los receptores TLR-7 y -9 mediante agonistas inducen la maduración y activación de las pDCs, incrementándose la expresión de genes de la vía del interferón (IFN- α , IRF7 o IRF3), factores de restricción, marcadores superficiales de activación y presentación antigénica y producción de citoquinas.

4_ Las pDCs previamente estimuladas con agonistas de TLR-7 y -9 son capaces de inducir un incremento en la respuesta VIH-1 específica por parte de linfocitos T CD4+ y CD8+ en términos de producción de citoquinas, siendo esta respuesta especialmente potente en PVVS bajo TAR, lográndose niveles similares a los correspondientes a un fenotipo de controlador espontáneo del VIH-1 o controlador de élite. Esto se consigue especialmente tras la estimulación de las pDCs con los agonistas de TLR, CpG-C y GS-9620.

5_ La administración de Vedolizumab en PVVS en estadios iniciales de la infección sin TAR previo es segura y bien tolerada. Sin embargo, no se obtuvo una remisión virológica completa tras la IAT.

6_ El 60% de los participantes en el ensayo clínico lo finalizaron con cargas virales no lo suficientemente altas como para reintroducir el TAR. Sin embargo, al no poseer un grupo control, no podemos establecer una relación entre la intervención conjunta (Vedolizumab + TAR) y el “set point” viral tras la IAT o el establecimiento del reservorio. No obstante, los individuos que concluyeron el ensayo sin TAR presentaban niveles más bajos de marcadores de agotamiento celular (PD1, LAG3, TIM3 y TIGIT) y de linfocitos CD4+ α 4 β 7+.

7_ El papel de la integrina α 4 β 7 en el establecimiento del reservorio VIH-1 queda patente con la asociación entre el porcentaje de integrina α 4 β 7 bloqueada por Vedolizumab en GIT con los niveles de reservorio ADN y ARN en ambas localizaciones. Además, la correlación inversa entre los niveles séricos de Vedolizumab y el reservorio ADN en íleon sugiere que con mayores dosis de fármaco podríamos haber observado una mayor eficacia virológica.

8_ En conjunto, estos resultados pueden tener importantes implicaciones en el desarrollo de futuras estrategias tanto para la reducción de la inflamación crónica que conducen al desarrollo de ENOS como para con la reducción de los niveles de reservorio y la cura funcional del VIH-1.

BIBLIOGRAFIA

1. ONUSIDA. <https://www.unaids.org/es>.
2. UNAIDS. Joint United Nations Programme on HIV/AIDS. Geneva: UNAIDS. 2017.
3. UNAIDS. 90-90-90: an ambitious treatment target to help end the AIDS epidemic. Geneva: UNAIDS. 2014.
4. UNAIDS. UNAIDS Data 2020. Geneva: UNAIDS. 2020.
5. WHO. WHO Guidelines Approved by the Guidelines Review Committee. Guidelines on HIV Self-testing and Partner Notification: Supplement to Consolidated Guidelines on HIV Testing Services. Geneva: WHO; 2016.
6. UNAIDS. UNAIDS Data 2019. Geneva: UNAIDS. 2019.
7. Vellozzi C, Brooks JT, Bush TJ, Conley LJ, Henry K, Carpenter CCJ, Overton ET, Hammer J, Wood K, Holmberg SD. 2008. The study to understand the Natural History of HIV and AIDS in the era of effective therapy (SUN Study). *Am J Epidemiol* Publ by Johns Hopkins Bloom Sch Public Heal 169:642–652.
8. Sabin CA, Lundgren JD. 2013. The natural history of HIV infection. *Curr Opin HIV AIDS* 8:311–317.
9. Quinn TC. 1997. Acute primary HIV infection. *JAMA* 278:58–62.
10. Little SJ, McLean AR, Spina CA, Richman DD, Havlir D V. 1999. Viral dynamics of acute HIV-1 infection. *J Exp Med* 190:841–850.
11. Nowak MA, Lloyd AL, Vasquez GM, Wiltout TA, Wahl LM, Bischofberger N, Williams J, Kinter A, Fauci AS, Hirsch VM, Lifson JD. 1997. Viral dynamics of primary viremia and antiretroviral therapy in simian immunodeficiency virus infection. *J Virol* 71:7518–7525.
12. Soriano V, Castilla J, Gomez-Cano M, Holguin A, Villalba N, Mas A, J. G-L. 1998. The decline in CD4+ T lymphocytes as a function of the duration of HIV infection, age at seroconversion, and viral load. *J Infect* 36:307–311.
13. He S, Zhang Z, Fu Y, Qin C, Li S, Han X, Xu J, Liu J, Jiang Y, Shang H. 2015. Thymic function is most severely impaired in chronic HIV-1 infection, but individuals with faster disease progression during early HIV-1 infection expressed lower levels of RTEs. *J Acquir Immune Defic Syndr* 70:472–478.
14. Madec Y, Boufassa F, Rouzioux C, Delfraissy J-FO, Meyer L. 2005. Undetectable Viremia without Antiretroviral Therapy in Patients with HIV Seroconversion: An Uncommon Phenomenon? *Clin Infect Dis* 40:1350–1354.

15. F J Palella Jr, K M Delaney, A C Moorman, M O Loveless, J Fuhrer, G A Satten, D J Aschman SDH. 1998. Declining Morbidity and Mortality among Patients with Advanced Human Immunodeficiency Virus Infection. *N Engl J Med* 338:853–860.
16. Deeks SG, Lewin SR, Havlir D V. 2013. The end of AIDS: HIV infection as a chronic disease. *Lancet* 382:1525–1533.
17. Lohse N, Hansen A-BE, Pedersen G, Kronborg G, Gerstoft J, Sørensen HT, Vaeth M, Obel N. 2007. Survival of persons with and without HIV infection in Denmark. *Ann Intern Med* 146:87–95.
18. Sackoff JE, Hanna DB, Pfeiffer MR, Torian L V. 2006. Causes of death among persons with AIDS in the era of highly Active Antiretroviral Therapy: New York City. *Ann Intern Med* 145:397–405.
19. Hsu DC, Sereti I, Ananworanich J. 2013. Serious Non-AIDS events: Immunopathogenesis and interventional strategies. *AIDS Res Ther* 10:29.
20. De Pablo-Bernal RS, Ramos R, Genebat M, Cañizares J, Rafii-El-Idrissi Benhnia M, Muñoz-Fernández MA, Pacheco YM, Galvá MI, Leal M, Ruiz-Mateos E. 2016. Phenotype and Polyfunctional Dereglulation Involving Interleukin 6 (IL-6)-and IL-10-Producing Monocytes in HIV-Infected Patients Receiving Combination Antiretroviral Therapy Differ From Those in Healthy Older Individuals. *J Infect Dis* 213:999–1007.
21. Guaraldi G, Orlando G, Zona S, Menozzi M, Carli F, Garlassi E, Berti A, Rossi E, Roverato A, Palella F. 2011. Premature Age-Related Comorbidities Among HIV-Infected Persons Compared With the General Population. *Clin Infect Dis* 53(11):112.
22. Masiá M, Padilla S, Álvarez D, López JC, Santos I, Soriano V, Hernández-Quero J, Santos J, Tural C, Del Amo J, Gutiérrez F. 2013. Risk, predictors, and mortality associated with non-AIDS events in newly diagnosed HIV-infected patients: Role of antiretroviral therapy. *Aids* 27:181–189.
23. Tenorio AR, Zheng Y, Bosch RJ, Krishnan S, Rodriguez B, Hunt PW, Plants J, Seth A, Wilson CC, Deeks SG, Lederman MM, Landay AL. 2014. Soluble markers of inflammation and coagulation but not T-cell activation predict non-AIDS-defining morbid events during suppressive antiretroviral treatment. *J Infect Dis* 210:1248–1259.
24. Murray SM, Funderburg N, Pallikkuth S, Utay NS, Jaworowski A, Hearps AC, Angelovich TA, Hoy JF. 2019. How Monocytes Contribute to Increased Risk of Atherosclerosis in Virologically-Suppressed HIV-Positive Individuals Receiving Combination Antiretroviral Therapy. *Front Immunol* 1:1378.
25. Burdo TH, Lo J, Abbara S, Wei J, Delelys ME, Preffer F, Rosenberg ES, Williams KC, Grinspoon S. Soluble CD163, a Novel Marker of Activated Macrophages, Is Elevated and

Associated With Noncalcified Coronary Plaque in HIV-Infected Patients
<https://doi.org/10.1093/infdis/jir520>.

26. Booiman T, Wit FW, Maurer I, De Francesco D, Sabin CA, Harskamp AM, Prins M, Garagnani P, Pirazzini C, Franceschi C, Fuchs D, Gisslén M, Winston A, Reiss P, Kootstra NA. 2017. High Cellular Monocyte Activation in People Living With Human Immunodeficiency Virus on Combination Antiretroviral Therapy and Lifestyle-Matched Controls Is Associated With Greater Inflammation in Cerebrospinal Fluid. *Open Forum Infect Dis* <https://doi.org/10.1093/ofid/ofx108>.
27. Anzinger JJ, Butterfield TR, Angelovich TA, Crowe SM, Palmer CS. 2014. Monocytes as Regulators of Inflammation and HIV-Related Comorbidities during cART. *J Immunol Res* <https://doi.org/10.1155/2014/569819>.
28. Jérôme Cros, Nicolas Cagnard, Kevin Woollard, Natacha Patey, Shen-Ying Zhang, Brigitte Senechal, Anne Puel, Subhra K. Biswas, Despina Moshous, Capucine Picard, Jean-Philippe Jais DD, Jean-Laurent Casanova CT and FG. 2010. Human CD14 dim Monocytes Patrol and Sense Nucleic Acids and Viruses via TLR7 and TLR8 Receptors. *Immunity* 33:375–386.
29. Hearps AC, Maisa A, Cheng W-J, Angelovich TA, Lichtfuss GF, Palmer CS, Landay AL, Jaworowski A, Crowe SM. 2012. HIV infection induces age-related changes to monocytes and innate immune activation in young men that persist despite combination antiretroviral therapy. *AIDS* 26:843–53.
30. Thieblemont N, Weiss L, Sadeghi HM, Estcourt C, Haeffner-Cavaillon N. 1995. CD14^{low}CD16^{high}: A cytokine-producing monocyte subset which expands during human immunodeficiency virus infection. *Eur J Immunol* 25:3418–3424.
31. Funderburg NT, Zidar DA, Shive C, Lioi A, Mudd J, Musselwhite LW, Simon DI, Costa MA, Rodriguez B, Sieg SF, Lederman MM. 2012. Shared monocyte subset phenotypes in HIV-1 infection and in uninfected subjects with acute coronary syndrome. *Blood* 120:4599–608.
32. Tarancon-Diez L, De Pablo-Bernal RS, Jimenez JL, Alvarez-Ríos AI, Genebat M, Rosado-Sanchez I, Muñoz-Fernández M-A, Ruiz-Mateos E, Leal M. 2018. Role of toll-like receptor 4 Asp299Gly polymorphism in the development of cardiovascular diseases in HIV-infected patients. *AIDS* 32:1035–1041.
33. Hunt PW. 2012. HIV and inflammation: mechanisms and consequences. *Curr HIV/AIDS Rep* 9:139–147.
34. Streeck H, Maestri A, Habermann D, Crowell TA, Esber A, Son G, Eller LA, Eller MA, Parikh A, Horn PA, Maganga L, Adamu Y, Kiweewa F, Maswai J, Owuoth J, Robb ML, Michael NL, Polyak C, Hoffmann D, Ake JA, Group AS. 2022. Dissecting Drivers of Immune Activation in Chronic HIV-1 Infection. *SSRN Electron J* 83:104182.
35. Knudsen TB, Ertner G, Petersen J, Møller HJ, Moestrup SK, Eugen-Olsen J, Kronborg G,

- Benfield T. 2016. Plasma Soluble CD163 Level Independently Predicts All-Cause Mortality in HIV-1-Infected Individuals. *J Infect Dis* 214:1198–1204.
36. Sunil M, Nigalye M, Somasunderam A, Martinez ML, Yu X, Arduino RC, Utay NS, Bell TK. 2016. Unchanged Levels of Soluble CD14 and IL-6 Over Time Predict Serious Non-AIDS Events in HIV-1-Infected People. *AIDS Res Hum Retroviruses* 32:1205.
37. May M, Gill J, Lewden C, Saag M, Mugavero M, Reiss P, Ledergerber B, Mocroft A, Harris R, Fux CA, Justice A, Costagliola D, Casabona J, Hogg RS, Khaykin P, Lampe F, Vehreschild J, Sterne JTAC, Egger M, Brodt HR, Chêne G, Dabis F, Monforte ADA, De Wolf F, Fätkenheuer G, Guest J, Kirk O, Kitahata M, Sterling T. 2010. Causes of death in HIV-1-infected patients treated with antiretroviral therapy, 1996-2006: collaborative analysis of 13 HIV cohort studies. *Clin Infect Dis* 50:1387–1396.
38. Neuhaus J, Angus B, Kowalska JD, Rosa A La, Sampson J, Wentworth D, Mocroft A. 2010. Risk of all-cause mortality associated with nonfatal AIDS and serious non-AIDS events among adults infected with HIV. *AIDS* 24:697–706.
39. Mocroft A, Reiss P, Gasirowski J, Ledergerber B, Kowalska J, Chiesi A, Gatell J, Rakhmanova A, Johnson M, Kirk O, Lundgren J. 2010. Serious fatal and nonfatal non-AIDS-defining illnesses in Europe. *J Acquir Immune Defic Syndr* 55:262–270.
40. Belloso WH, Orellana LC, Grinsztejn B, Madero JS, La Rosa A, Veloso VG, Sanchez J, Ismerio Moreira R, Crabtree-Ramirez B, Garcia Messina O, Lasala MB, Peinado J, Losso MH. 2010. Analysis of serious non-AIDS events among HIV-infected adults at Latin American sites. *HIV Med* 11:554–564.
41. Anis AH, Nosyk B, Sun H, Guh DP, Bansback N, Li X, Barnett PG, Joyce V, Swanson KM, Kyriakides TC, Holodniy M, Cameron DW, Brown ST. 2009. Quality of life of patients with advanced HIV/AIDS: measuring the impact of both AIDS-defining events and non-AIDS serious adverse events. *J Acquir Immune Defic Syndr* 51:631–639.
42. Wester CW, Koethe JR, Shepherd BE, Stinnette SE, Rebeiro PF, Kipp AM, Hong H, Bussmann H, Gaolathe T, McGowan CC, Sterling TR, Marlink RG. 2011. Non-AIDS-defining events among HIV-1-infected adults receiving combination antiretroviral therapy in resource-replete versus resource-limited urban setting. *AIDS* 25:1471–1479.
43. Fischer MJ, Wyatt CM, Gordon K, Gibert CL, Brown ST, Rimland D, Rodriguez-Barradas MC, Justice AC, Parikh CR. 2010. Hepatitis C and the risk of kidney disease and mortality in veterans with HIV. *J Acquir Immune Defic Syndr* 53:222–226.
44. Wyatt CM, Malvestutto C, Coca SG, Klotman PE, Parikh CR. 2008. The impact of hepatitis C virus coinfection on HIV-related kidney disease: A systematic review and meta-analysis. *AIDS* 22:1799–1807.

45. Freiberg MS, Chang C-CH, Skanderson M, Mcginnis K, Kuller LH, Kraemer KL, Rimland D, Goetz MB, Butt AA, Rodriguez Barradas MC, Gibert C, Leaf D, Brown ST, Samet J, Kazis L, Bryant K, Justice AC. 2011. The Risk of Incident Coronary Heart Disease Among Veterans With and Without HIV and Hepatitis C. *Cir Cardiovasc Qual Outcomens* 4:425–432.
46. Giordano TP, Kramer JR, Soucek J, Richardson ; Peter, Hashem ;, El-Serag B. 2004. Cirrhosis and Hepatocellular Carcinoma in HIV-Infected Veterans With and Without the Hepatitis C Virus. *Arch Intern Med* 164:2349–2354.
47. López-Cortés LF, Trujillo-Rodríguez M, Báez-Palomo A, Benmarzouk-Hidalgo OJ, Dominguez-Molina B, Milanés-Guisado Y, Espinosa N, Viciano P, Gutiérrez-Valencia A. 2018. Eradication of Hepatitis C Virus (HCV) Reduces Immune Activation, Microbial Translocation, and the HIV DNA Level in HIV/HCV-Coinfected Patients. *J Infect Dis* 218(4):624–632.
48. de Pablo-Bernal RS, Reyes Jimenez-Leon M, Tarancon-Diez L, Gutierrez-Valencia A, Serna-Gallego A, Trujillo-Rodriguez M, Alvarez-Rios AI, Milanes-Guisado Y, Espinosa N, Roca-Oporto C, Viciano P, Lopez-Cortes LF, Ruiz-Mateos E. 2020. Modulation of Monocyte Activation and Function during Direct Antiviral Agent Treatment in Patients Coinfected with HIV and Hepatitis C Virus. *Antimicrob Agents Chemother* 64:1–13.
49. Fromentin R, Bakeman W, Lawani MB, Khoury G, Hartogensis W, DaFonseca S, Killian M, Epling L, Hoh R, Sinclair E, Hecht FM, Bacchetti P, Deeks SG, Lewin SR, Sékaly RP, Chomont N. 2016. CD4+ T Cells Expressing PD-1, TIGIT and LAG-3 Contribute to HIV Persistence during ART. *PLoS Pathog* 12:e1005761.
50. Calantone N, Wu F, Klase Z, Deleage C, Perkins M, Matsuda K, Thompson EA, Ortiz AM, Vinton CL, Ourmanov I, Loré K, Douek DC, Estes JD, Hirsch VM, Brenchley JM. 2014. Tissue myeloid cells in SIV-infected primates acquire viral DNA through phagocytosis of infected T cells. *Immunity* 41:493–502.
51. Baxter AE, Russell RA, Duncan CJA, Moore MD, Willberg CB, Pablos JL, Finzi A, Kaufmann DE, Ochsenbauer C, Kappes JC, Groot F, Sattentau QJ. 2014. Macrophage infection via selective capture of HIV-1-infected CD4+ T cells. *Cell Host Microbe* 16:711–721.
52. Honeycutt JB, Thayer WO, Baker CE, Ribeiro RM, Lada SM, Cao Y, Cleary RA, Hudgens MG, Richman DD, Victor Garcia J. 2017. HIV persistence in tissue macrophages of humanized myeloid-only mice during antiretroviral therapy. *Nat Med* 2017 235 23:638–643.
53. Honeycutt JB, Wahl A, Baker C, Spagnuolo RA, Foster J, Zakharova O, Wietgreffe S, Caro-Vegas C, Madden V, Sharpe G, Haase AT, Eron JJ, Garcia JV. 2016. Macrophages sustain HIV replication in vivo independently of T cells. *J Clin Invest* 126:1353–1366.
54. Sattentau QJ, Stevenson M. 2016. Macrophages and HIV-1: An Unhealthy Constellation. *Cell Host Microbe* 19:304–310.

55. Loré K, Smed-Sörensen A, Vasudevan J, Mascola JR, Koup RA. 2005. Myeloid and plasmacytoid dendritic cells transfer HIV-1 preferentially to antigen-specific CD4+ T cells. *J Exp Med* 201:2023–2033.
56. Kandathil AJ, Sugawara S, Balagopal A. 2016. Are T cells the only HIV-1 reservoir? *Retrovirology* 13:86:1–10.
57. Guadalupe M, Reay E, Sankaran S, Prindiville T, Flamm J, McNeil A, Dandekar S. 2003. Severe CD4 + T-Cell Depletion in Gut Lymphoid Tissue during Primary Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection and Substantial Delay in Restoration following Highly Active Antiretroviral Therapy . *J Virol* 77:11708–11717.
58. Veazey RS, Marx PA, Lackner AA. 2001. The mucosal immune system: primary target for HIV infection and AIDS. *Trends Immunol* 22:626–633.
59. Brenchley JM, Schacker TW, Ruff LE, Price DA, Taylor JH, Beilman GJ, Nguyen PL, Khoruts A, Larson M, Haase AT, Douek DC. 2004. CD4+ T cell depletion during all stages of HIV disease occurs predominantly in the gastrointestinal tract. *J Exp Med* 200:749–759.
60. Mehandru S, Poles MA, Tenner-Racz K, Jean-Pierre P, Manuelli V, Lopez P, Shet A, Low A, Mohri H, Boden D, Racz P, Markowitz M. 2006. Lack of mucosal immune reconstitution during prolonged treatment of acute and early HIV-1 infection. *PLoS Med* 3:2335–2348.
61. Khan S, Telwatte S, Trapecar M, Yukl S, Sanjabi S. 2017. Differentiating Immune Cell Targets in Gut-Associated Lymphoid Tissue for HIV Cure. *AIDS Res Hum Retroviruses* 33:S40–S58.
62. Reuter MA, Del Rio Estrada PM, Buggert M, Petrovas C, Ferrando-Martinez S, Nguyen S, Sada Japp A, Ablanedo-Terrazas Y, Rivero-Arrieta A, Kuri-Cervantes L, Gunzelman HM, Gostick E, Price DA, Koup RA, Naji A, Canaday DH, Reyes-Terán G, Betts MR. 2017. HIV-Specific CD8 + T Cells Exhibit Reduced and Differentially Regulated Cytolytic Activity in Lymphoid Tissue. *Cell Rep* 21:3458–3470.
63. Connick E, Folkvord JM, Lind KT, Rakasz EG, Miles B, Wilson NA, Santiago ML, Schmitt K, Stephens EB, Kim HO, Wagstaff R, Li S, Abdelaal HM, Kemp N, Watkins DI, MaWhinney S, Skinner PJ. 2014. Compartmentalization of simian immunodeficiency virus replication within secondary lymphoid tissues of rhesus macaques is linked to disease stage and inversely related to localization of virus-specific CTL. *J Immunol* 193:5613–5625.
64. Lichterfeld M, Gao C, Yu XG. 2022. An ordeal that does not heal: understanding barriers to a cure for HIV-1 infection. *Trends Immunol* 43:608–616.
65. Tchasovnikarova IA, Timms RT, Matheson NJ, Wals K, Antrobus R, Göttgens B, Dougan G, Dawson MA, Lehner PJ. 2015. GENE SILENCING. Epigenetic silencing by the HUSH complex mediates position-effect variegation in human cells. *Science* 348:1481–1485.

66. Matkovic R, Morel M, Lanciano S, Larrous P, Martin B, Bejjani F, Vauthier V, Hansen MMK, Emiliani S, Cristofari G, Gallois-Montbrun S, Margottin-Goguet F. 2022. TASOR epigenetic repressor cooperates with a CNOT1 RNA degradation pathway to repress HIV. *Nat Commun* 13:66.
67. Collora JA, Liu R, Pinto-Santini D, Ravindra N, Ganoza C, Lama JR, Alfaro R, Chiarella J, Spudich S, Mounzer K, Tebas P, Montaner LJ, van Dijk D, Duerr A, Ho YC. 2022. Single-cell multiomics reveals persistence of HIV-1 in expanded cytotoxic T cell clones. *Immunity* 55:1013–1031.
68. Wiegand A, Spindler J, Hong FF, Shaoc W, Cyktor JC, Cillo AR, Halvas EK, Coffin JM, Mellors JW, Kearney MF. 2017. Single-cell analysis of HIV-1 transcriptional activity reveals expression of proviruses in expanded clones during ART. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114:E3659–E3668.
69. Einkauf KB, Osborn MR, Gao C, Sun W, Sun X, Lian X, Parsons EM, Gladkov GT, Seiger KW, Blackmer JE, Jiang C, Yukl SA, Rosenberg ES, Yu XG, Lichterfeld M. 2022. Parallel analysis of transcription, integration, and sequence of single HIV-1 proviruses. *Cell* 185:266–282.
70. Lorenzo-Redondo R, Fryer H, Bedford T, Kim E, Archer J, Kosakovsky Pond SL, Chung Y-S, Penugonda S, Chipman JG, Fletcher courtney V, Schacker TW, Malim MH, Rambaut A, Haase ashley T, McLean A, Wolinsky SM. 2016. Persistent HIV-1 replication maintains the tissue reservoir during therapy <https://doi.org/10.1038/nature16933>.
71. Fletcher C V., Staskus K, Wietgreffe SW, Rothenberger M, Reilly C, Chipman JG, Beilman GJ, Khoruts A, Thorkelson A, Schmidt TE, Anderson J, Perkey K, Stevenson M, Perelson AS, Douek DC, Haase AT, Schacker TW. 2014. Persistent HIV-1 replication is associated with lower antiretroviral drug concentrations in lymphatic tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:2307–2312.
72. Hütter G, Nowak D, Mossner M, Ganepola S, Müßig A, Allers K, Schneider T, Hofmann J, Kücherer C, Blau O, Blau IW, Hofmann WK, Thiel E. 2009. Long-Term Control of HIV by CCR5 Delta32/ Delta32 Stem-Cell Transplantation. *N Engl J Med* 360:692–700.
73. Machmach K, Leal M, Gras C, Viciana P, Genebat M, Franco E, Boufassa F, Lambotte O, Herbeuval JP, Ruiz-Mateos E. 2012. Plasmacytoid Dendritic Cells Reduce HIV Production in Elite Controllers. *J Virol* 12:4245–4252.
74. Barblu L, MacHmach K, Gras C, Delfraissy JF, Boufassa F, Leal M, Ruiz-Mateos E, Lambotte O, Herbeuval JP. 2012. Plasmacytoid Dendritic Cells (pDCs) From HIV Controllers Produce Interferon- α and Differentiate Into Functional Killer pDCs Under HIV Activation. *J Infect Dis* 206:790–801.
75. Dominguez-Molina B, Machmach K, Perales C, Tarancon-Diez L, Gallego I, Sheldon JL, Leal M, Domingo E, Ruiz-Mateos E. 2018. Toll-Like Receptor 7 (TLR-7) and TLR-9 Agonists Improve Hepatitis C Virus Replication and Infectivity Inhibition by Plasmacytoid Dendritic Cells.

76. Buitendijk M, Eszterhas SK, Howell AL. 2013. Gardiquimod: a Toll-like receptor-7 agonist that inhibits HIV type 1 infection of human macrophages and activated T cells. *AIDS Res Hum Retroviruses* 29:907–918.
77. Fosdick A, Zheng J, Pflanz S, Frey CR, Hesselgesser J, Halcomb RL, Wolfgang G, Tumas DB. 2014. Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Properties of GS-9620, a Novel Toll-Like Receptor 7 Agonist, Demonstrate Interferon-Stimulated Gene Induction without Detectable Serum Interferon at Low Oral Doses. *J Pharmacol Exp Ther* 348:96–105.
78. Sandborn WJ, Feagan BG, Rutgeerts P, Hanauer S, Colombel J-F, Sands BE, Lukas M, Fedorak RN, Lee S, Bressler B, Fox I, Rosario M, Sankoh S, Xu J, Stephens K, Milch C, Parikh A, GEMINI 2 Study Group. 2013. Vedolizumab as Induction and Maintenance Therapy for Crohn's Disease. *N Engl J Med* 369:711–732.
79. Feagan BG, Rutgeerts P, Sands BE, Hanauer S, Colombel J-F, Sandborn WJ, Van Assche G, Axler J, Kim H-J, Danese S, Fox I, Milch C, Sankoh S, Wyant T, Xu J, Parikh A, York BES N, Korea S, Clinico Humanitas I, Pharmaceuticals M, GEMINI 1 Study Group. 2013. Vedolizumab as Induction and Maintenance Therapy for Ulcerative Colitis. *N Engl J Med* 8:699–710.
80. Erle DJ, Briskin MJ, Butcher EC, Garcia-Pardo A, Lazarovits AI, Tidswell M. 1994. Expression and function of the MAdCAM-1 receptor, integrin alpha 4 beta 7, on human leukocytes. *J Immunol* 153:517–28.
81. Byrareddy SN, Arthos J, Cicala C, Villinger F, Ortiz KT, Little D, Sidell N, Kane MA, Yu J, Jones JW, Santangelo PJ, Zurla C, McKinnon LR, Arnold KB, Woody CE, Walter L, Roos C, Noll A, Van Ryk D, Jelcic K, Cimbri R, Gumber S, Reid MD, Adsay V, Amancha PK, Mayne AE, Parslow TG, Fauci AS, Ansari AA. 2016. Sustained virologic control in SIV+ macaques after antiretroviral and alpha4beta7 antibody therapy. *Science (80-)* 354:197–202.
82. Di Mascio M, Lifson JD, Srinivasula S, Kim I, DeGrange P, Keele BF, Belli AJ, Reimann KA, Wang Y, Proschan M, Lane HC, Fauci AS. 2019. Evaluation of an antibody to alpha4beta7 in the control of SIVmac239-nef-stop infection. *Science (80-)* 365:1025–1029.
83. Abbink P, Mercado NB, Nkolola JP, Peterson RL, Tuyishime H, McMahan K, Moseley ET, Borducchi EN, Chandrashekar A, Bondzie EA, Agarwal A, Belli AJ, Reimann KA, Keele BF, Geleziunas R, Lewis MG, Barouch DH. 2019. Lack of therapeutic efficacy of an antibody to alpha4beta7 in SIVmac251-infected rhesus macaques. *Science (80-)* 365:1029–1033.
84. Iwamoto N, Mason RD, Song K, Gorman J, Welles HC, Arthos J, Cicala C, Min S, King HADD, Belli AJ, Reimann KA, Foulds KE, Kwong PD, Lifson JD, Keele BF, Roederer M. 2019. Blocking alpha4beta7 integrin binding to SIV does not improve virologic control. *Science (80-)* 365:1033–1036.

85. Sneller MC, Clarridge KE, Seamon C, Shi V, Zorawski MD, Shawn Justement J, Blazkova J, Huiting ED, Proschan MA, Rodrigo Mora J, Shetzline M, Moir S, Clifford Lane H, Chun T-WW, Fauci AS, Justement JS, Blazkova J, Huiting ED, Proschan MA, Mora JR, Shetzline M, Moir S, Lane HC, Chun T-WW, Fauci AS. 2019. An open-label phase 1 clinical trial of the anti- $\alpha 4\beta 7$ monoclonal antibody vedolizumab in HIV-infected individuals. *Sci Transl Med* 11:1–9.
86. Abutaleb A, Sherman KE. 2018. A changing paradigm: management and treatment of the HCV/HIV-co-infected patient. *Hepatology* 12:500–509.
87. Klein MB, Althoff KN, Jing Y, Lau B, Kitahata M, Lo V, Iii R, Kirk GD, Hull M, Kim HN, Sebastiani G, Moodie EEM, Silverberg MJ, Sterling TR, Thorne JE, Cescon A, Napravnik S, Eron J, Gill MJ, Justice A, Peters MG, Goedert JJ, Mayor A, Thio CL, Cachay ER, Moore R. 2016. Risk of End-Stage Liver Disease in HIV-Viral Hepatitis Coinfected Persons in North America From the Early to Modern Antiretroviral Therapy Eras. *Clin Infect Dis* 63:1160–1166.
88. Sandler NG, Wand H, Roque A, Law M, Nason MC, Nixon DE, Pedersen C, Ruxrungtham K, Lewin SR, Emery S, Neaton JD, Brenchley JM, Deeks SG, Sereti I, Douek DC, INSIGHT SMART Study Group. 2011. Plasma levels of soluble CD14 independently predict mortality in HIV infection. *J Infect Dis* 203:780–90.
89. Fernández-Montero J V., Barreiro P, De Mendoza C, Labarga P, Soriano V. 2016. Hepatitis C virus coinfection independently increases the risk of cardiovascular disease in HIV-positive patients. *J Viral Hepat* 23:47–52.
90. Zhao C, Zhang H, Wong W-C, Sem X, Han H, Ong S-M, Tan Y-C, Yeap W-H, Gan C-S, Ng K-Q, Boon-Chai Koh M, Kourilsky P, Sze S-K, Wong S-C. 2009. Identification of Novel Functional Differences in Monocyte Subsets Using Proteomic and Transcriptomic Methods. *J Proteome Res* 8:4028–4038.
91. Rogacev KS, Cremers B, Zawada AM, Seiler S, Binder N, Ege P, Große-Dunker G, Heisel I, Hornof F, Jeken J, Rebling NM, Ulrich C, Scheller B, Böhm M, Fliser D, Heine GH. 2012. CD14⁺⁺CD16⁺ monocytes independently predict cardiovascular events: a cohort study of 951 patients referred for elective coronary angiography. *J Am Coll Cardiol* 60:1512–20.
92. Baker J V., Hullsiek KH, Singh A, Wilson E, Henry K, Lichtenstein K, Onen N, Kojic E, Patel P, Brooks JT, Hodis HN, Budoff M, Sereti I. 2014. Immunologic predictors of coronary artery calcium progression in a contemporary HIV cohort. *AIDS* 28:831–840.
93. Lidofsky A, Holmes JA, Feeney ER, Kruger AJ, Salloum S, Zheng H, Seguin IS, Altinbas A, Masia R, Corey KE, Gustafson JL, Schaefer EA, Hunt PW, Deeks S, Somsouk M, Chew KW, Chung RT, Alatrakchi N. 2018. Macrophage Activation Marker Soluble CD163 Is a Dynamic Marker of Liver Fibrogenesis in Human Immunodeficiency Virus/Hepatitis C Virus Coinfection. *J Infect Dis* 218:1395–1403.

94. Parisi SG, Andreis S, Mengoli C, Menegotto N, Cavinato S, Scaggiante R, Andreoni · Massimo, Palù G, Basso M, Cattelan AM. 2018. Soluble CD163 and soluble CD14 plasma levels but not cellular HIV-DNA decrease during successful interferon-free anti-HCV therapy in HIV-1-HCV co-infected patients on effective combined anti-HIV treatment. *Med Microbiol Immunol* 207:183–194.
95. Ning G, Li YT, Chen YM, Zhang Y, Zeng YF, Lin CS. 2017. Dynamic Changes of the Frequency of Classic and Inflammatory Monocytes Subsets and Natural Killer Cells in Chronic Hepatitis C Patients Treated by Direct-Acting Antiviral Agents. *Can J Gastroenterol Hepatol* 2017:10–17.
96. Vergara S, Macías J, Rivero A, Gutiérrez-Valencia A, González-Serrano M, Merino D, Ríos MJ, García-García JA, Camacho A, López-Cortés L, Ruiz J, de la Torre J, Viciano P, Pineda JA, Grupo para el Estudio de las Hepatitis Viricas de la SAEI. 2007. The use of transient elastometry for assessing liver fibrosis in patients with HIV and hepatitis C virus coinfection. *Clin Infect Dis* 45:969–74.
97. de Pablo-Bernal RS, Cañizares J, Rosado I, Galvá MI, Alvarez-Ríos AI, Carrillo-Vico A, Ferrando-Martínez S, Muñoz-Fernández MÁ, Rafii-El-Idrissi Benhnia M, Pacheco YM, Ramos R, Leal M, Ruiz-Mateos E, Sara de Pablo-Bernal R, Cañizares J, Rosado I, Isabel Galvá M, Isabel Alvarez-Ríos A, Carrillo-Vico A, Ferrando-Martínez S, Ángeles Muñoz-Fernández M, Rafii-El-Idrissi Benhnia M, María Pacheco Y, Ramos R, Leal M, Ruiz-Mateos E. 2016. Monocyte Phenotype and Polyfunctionality Are Associated With Elevated Soluble Inflammatory Markers, Cytomegalovirus Infection, and Functional and Cognitive Decline in Elderly Adults. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 71:610–8.
98. Tarancón-Díez L, de Pablo-Bernal RS, Alvarez-Ríos AI, Rosado-Sánchez I, Domínguez-Molina B, Genebat M, Pacheco YM, Jiménez JL, Ángeles Muñoz-Fernández M, Ruiz-Mateos E, Leal M. 2017. CCR5+ CD8 T-cell levels and monocyte activation precede the onset of acute coronary syndrome in HIV-infected patients on antiretroviral therapy. *Thromb Haemost* 117:1141–1149.
99. Chen JY, Feeney ER, Chung RT. 2014. HCV and HIV Co-infection: Mechanisms and Management. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 11(6):362–371.
100. Genebat M, Tarancón-Díez L, Pulido I, Álvarez-Ríos AI, Muñoz-Fernández MÁ, Ruiz-Mateos E, Leal M. 2019. Hepatitis C virus and cumulative infections are associated with atherogenic cardiovascular events in HIV-infected subjects. *Antiviral Res* 169:104527 (1–5).
101. Angelidou K, Hunt PW, Landay AL, Wilson CC, Rodriguez B, Deeks SG, Bosch RJ, Lederman MM. 2018. Changes in inflammation but not in T-Cell activation precede non-AIDS-defining events in a case-control study of patients on long-term antiretroviral therapy. *J Infect Dis* 218:239–248.
102. Sun B, Abadjian L, Monto A, Freasier H, Pulliam L. 2020. HCV cure in HIV coinfection dampens inflammation and improves cognition through multiple mechanisms. *J Infect Dis*

103. Lund Laursen T, Brøckner Siggard C, Kazankov K, Damgaard Sandahl T, Møller HJ, Ong A, Douglas MW, George J, Tarp B, Hagelskjaer Kristensen L, Lund Laursen A, Hiramatsu A, Nakahara T, Chayama K, Grønbaek H. 2018. Rapid and persistent decline in soluble CD163 with successful direct-acting antiviral therapy and associations with chronic hepatitis C histology. *Scand J Gastroenterol* 53:986–993.
104. Lenche Kostadinova A, Shive CL, Zebrowski E, Fuller B, Rife K, Hirsch A, Compan A, Moreland A, Falck-Ytter Y, Popkin DL, Anthony DD, Anthony Professor of Medicine DD, Kostadinova L, Shive CL, Zebrowski E, Fuller B, Rife K, Hirsch A, Compan A, Moreland A, Falck-Ytter Y, Popkin DL, Anthony DD. 2018. Soluble Markers of Immune Activation Differentially Normalize and Selectively Associate with Improvement in AST, ALT, Albumin, and Transient Elastography During IFN-Free HCV Therapy. *Pathog Immun* 3:149–162.
105. French A, Martin JW, Evans CT, Peters MG, Kessaye SG, Nowicki M, Kuniholm M, Golub E, Augenbraun M, Desai SN. 2017. Macrophage Activation and the Tumor Necrosis Factor Cascade in Hepatitis C Disease Progression among HIV-Infected Women Participating in the Women’s Interagency HIV Study (WIHS). *J Acquir Immune Defic Syndr* 74:438–444.
106. Laursen TL, Siggaard CB, Kazankov K, Sandahl TD, Møller HJ, Tarp B, Kristensen LH, Laursen AL, Leutscher P, Grønbaek H. 2020. Time-dependent improvement of liver inflammation, fibrosis and metabolic liver function after successful direct-acting antiviral therapy of chronic hepatitis C. *J Viral Hepat* 27:28–35.
107. Dysangco A, Liu Z, Stein JH, Dubé MP, Gupta SK. 2017. HIV infection, antiretroviral therapy, and measures of endothelial function, inflammation, metabolism, and oxidative stress. *PLoS One* 12(8):1–9.
108. Schmidt FP, Zimmermann T, Wenz T, Schnorbus B, Ostad MA, Feist C, Grambihler A, Schattenberg JM, Sprinzl MF, Münzel T, Galle PR. 2018. Interferon- and ribavirin-free therapy with new direct acting antivirals (DAA) for chronic hepatitis C improves vascular endothelial function. *Int J Cardiol* 271:296–300.
109. Boulware DR, Hullsiek KH, Puroton CE, Rupert A, Baker J V., French MA, Bohjanen PR, Novak RM, Neaton JD, Sereti I. 2011. Higher levels of CRP, D-dimer, IL-6, and hyaluronic acid before initiation of antiretroviral therapy (ART) are associated with increased risk of AIDS or death. *J Infect Dis* 203:1637–1646.
110. Rozera G, Fabbri G, Lorenzini P, Mastrorosa I, Timelli L, Zaccarelli M, Amendola A, Vergori A, Plazzi MM, Cicalini S, Antinori A, Capobianchi MR, Abbate I, Ammassari A. 2017. Peripheral blood HIV-1 DNA dynamics in antiretroviral-treated HIV/HCV co-infected patients receiving directly-acting antivirals. *PLoS One* 12 (10):1–13.

111. Rosa López-Huertas M, Palladino C, Garrido-Arquero M, Esteban-Cartelle B, Sánchez-Carrillo M, Martínez-Román P, Martín-Carbonero L, Ryan P, Domínguez-Domínguez L, De Los Santos I, De S, Fuente Moral L, Benito JM, Rallón N, Alcamí J, Resino S, Fernández-Rodríguez A, Coiras M, Briz V. 2018. HCV-coinfection is related to an increased HIV-1 reservoir size in cART-treated HIV patients: a cross-sectional study. *Sci Rep* 9:5606:1–10.
112. Wada N, Jacobson LP, Cohen M, French A, Phair J, Muñoz A. 2014. Cause-specific mortality among HIV-infected individuals, by CD4+ cell count at HAART initiation, compared with HIV-uninfected individuals. *AIDS* 28:257–265.
113. Finzi D, Hermankova M, Pierson T, Carruth LM, Buck C, Chaisson RE, Quinn TC, Chadwick K, Margolick J, Brookmeyer R, Gallant J, Markowitz M, Ho DD, Richman DD, Siliciano RF. 1997. Identification of a Reservoir for HIV-1 in Patients on Highly Active Antiretroviral Therapy. *Science* (80-) 278:1295–1300.
114. Chun TW, Carruth L, Finzi D, Shen X, DiGiuseppe JA, Taylor H, Hermankova M, Chadwick K, Margolick J, Quinn TC, Kuo YH, Brookmeyer R, Zeiger MA, Barditch-Crovo P, Siliciano RF. 1997. Quantification of latent tissue reservoirs and total body viral load in HIV-1 infection. *Nature* 387:183–188.
115. Siegal FP, Kadowaki N, Shodell M, Fitzgerald-Bocarsly PA, Shah K, Ho S, Antonenko S, Liu YJ. 1999. The Nature of the Principal Type 1 Interferon-Producing Cells in Human Blood. *Science* (80-) 284:1835–1837.
116. Bam RA, Hansen D, Irrinki A, Mulato A, Jones GS, Hesselgesser J, Frey CR, Cihlar T, Yant SR. 2017. TLR7 Agonist GS-9620 Is a Potent Inhibitor of Acute HIV-1 Infection in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Antimicrob Agents Chemother* 61:e01369-16.
117. Jakobsen MR, Bak RO, Andersen A, Berg RK, Jensen SB, Jin T, Laustsen A, Hansen K, Østergaard L, Fitzgerald KA, Xiao TS, Mikkelsen JG, Mogensen TH, Paludan SR. 2013. IFI16 senses DNA forms of the lentiviral replication cycle and controls HIV-1 replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:E4571–E4580.
118. Hotter D, Sauter D, Kirchhoff F. 2013. Emerging role of the host restriction factor tetherin in viral immune sensing. *J Mol Biol* 425:4956–4964.
119. Fitzgerald-Bocarsly P, Feng D. 2007. The role of type I interferon production by dendritic cells in host defense. *Biochimie* 89:843–855.
120. Lim SY, Osuna CE, Hrabert PT, Hesselgesser J, Gerold JM, Barnes TL, Sanisetty S, Seaman MS, Lewis MG, Geleziunas R, Miller MD, Cihlar T, Lee WA, Hill AL, Whitney JB. 2018. TLR7 agonists induce transient viremia and reduce the viral reservoir in SIV-infected rhesus macaques on antiretroviral therapy. *Sci Transl Med* 10:eaao4521.
121. Borducchi EN, Liu J, Nkolola JP, Cadena AM, Yu W-H, Fischinger S, Broge T, Abbink P,

- Mercado NB, Chandrashekar A, Jetton D, Peter L, McMahan K, Moseley ET, Bekerman E, Hesselgesser J, Li W, Lewis MG, Alter G, Geleziunas R, Barouch DH. 2018. Antibody and TLR7 agonist delay viral rebound in SHIV-infected monkeys. *Nature* 563:360–364.
122. SenGupta D, Brinson C, DeJesus E, Mills A, Shalit P, Guo S, Cai Y, Wallin JJ, Zhang L, Humeniuk R, Begley R, Geleziunas R, Mellors J, Wrin T, Jones N, Milush J, Ferre AL, Shacklett BL, Laird GM, Moldt B, Vendrame E, Brainard DM, Ramgopal M, Deeks SG. 2021. The TLR7 agonist vesatolimod induced a modest delay in viral rebound in HIV controllers after cessation of antiretroviral therapy. *Sci Transl Med* 13:1–15.
123. Ferrando-Martinez S, Casazza JP, Leal M, Machmach K, Munoz-Fernandez MA, Viciano P, Koup RA, Ruiz-Mateos E. 2012. Differential Gag-Specific Polyfunctional T Cell Maturation Patterns in HIV-1 Elite Controllers. *J Virol* 86:3667–3674.
124. Pernas M, Tarancón-Diez L, Rodríguez-Gallego E, Gómez J, Prado JG, Casado C, Dominguez-Molina B, Olivares I, Coiras M, León A, Rodriguez C, Miguel Benito J, Rallón N, Plana M, Martinez-Madrid O, Dapena M, Antonio Iribarren J, del Romero J, García F, Alcamí J, Muñoz-Fernández M, Vidal F, Leal M, Lopez-Galindez C, Ruiz-Mateos E, Pernas CM, Romero del J, Guido Silvestri E. 2018. Factors Leading to the Loss of Natural Elite Control of HIV-1 Infection. *J Virol* 92:e01805-17.
125. Sereti I, Krebs SJ, Phanuphak N, Fletcher JL, Slike B, Pinyakorn S, O’Connell RJ, Rupert A, Chomont N, Valcour V, Kim JH, Robb ML, Michael NL, Douek DC, Ananworanich J, Uday NS. 2017. Persistent, Albeit Reduced, Chronic Inflammation in Persons Starting Antiretroviral Therapy in Acute HIV Infection. *Clin Infect Dis* 64:124–131.
126. Sun Y, Xue J. 2022. Expression Profile and Biological Role of Immune Checkpoints in Disease Progression of HIV/SIV Infection. *Viruses* 14:1–28.
127. Ho JE, Scherzer R, Hecht FM, Maka K, Selby V, Martin JN, Ganz P, Deeks SG, Hsue PY. 2012. The Association of CD4+ T-Cell Count on Cardiovascular Risk in Treated HIV Disease. *AIDS* 26:1115–1120.
128. Kwa S, Kannanganat S, Nigam P, Siddiqui M, Shetty RD, Ansari A, Bosinger SE, Silvestri G, Amara RR, Dc W, Armstrong W. 2012. Plasmacytoid dendritic cells are recruited to the colorectum and contribute to immune activation during pathogenic SIV infection in rhesus macaques. *Blood* 118:2763–2773.
129. Herbeuval JP, Nilsson J, Boasso A, Hardy AW, Kruhlak MJ, Anderson SA, Dolan MJ, Dy M, Andersson J, Shearer GM. 2006. Differential expression of IFN- α and TRAIL/DR5 in lymphoid tissue of progressor versus nonprogressor HIV-1-infected patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:7000.
130. Pardons M, Baxter AE, Massanella M, Pagliuzza A, Fromentin R, Dufour C, Leyre L, Routy JP,

- Kaufmann DE, Chomont N. 2019. Single-cell characterization and quantification of translation-competent viral reservoirs in treated and untreated HIV infection. *PLoS Pathog* 15:e1007619 (1-28).
131. Hurst J, Hoffmann M, Pace M, Williams JP, Thornhill J, Hamlyn E, Meyerowitz J, Willberg C, Koelsch KK, Robinson N, Brown H, Fisher M, Kinloch S, Cooper DA, Schechter M, Tambussi G, Fidler S, Babiker A, Weber J, Kelleher AD, Phillips RE, Frater J. 2015. Immunological biomarkers predict HIV-1 viral rebound after treatment interruption. *Nat Commun* 6:8495 (1–9).
132. Wherry EJ. 2011. T cell exhaustion. *Nat Immunol* 12:492–499.
133. Kassu A, Marcus RA, D’Souza MB, Kelly-McKnight EA, Golden-Mason L, Akkina R, Fontenot AP, Wilson CC, Palmer BE. 2010. Regulation of virus-specific CD4+ T cell function by multiple costimulatory receptors during chronic HIV infection. *J Immunol* 185:3007–3018.
134. Jones RB, Ndhlovu LC, Barbour JD, Sheth PM, Jha AR, Long BR, Wong JC, Satkunarajah M, Schweneker M, Chapman JM, Gyenes G, Vali B, Hycza MD, Yue FY, Kovacs C, Sassi A, Loutfy M, Halpenny R, Persad D, Spotts G, Hecht FM, Chun TW, McCune JM, Kaul R, Rini JM, Nixon DF, Ostrowski MA. 2008. Tim-3 expression defines a novel population of dysfunctional T cells with highly elevated frequencies in progressive HIV-1 infection. *J Exp Med* 205:2763–79.
135. Fonteneau J-F, Larsson M, Beignon A-S, McKenna K, Dasilva I, Amara A, Liu Y-J, Lifson JD, Littman DR, Bhardwaj N. 2004. Human immunodeficiency virus type 1 activates plasmacytoid dendritic cells and concomitantly induces the bystander maturation of myeloid dendritic cells. *J Virol* 78:5223–5232.
136. Martinsen JT, Gunst JD, Højen JF, Tolstrup M, Søgaaard OS. 2020. The Use of Toll-Like Receptor Agonists in HIV-1 Cure Strategies. *Front Immunol* 11:1112:1–13.
137. Riddler SA, Para M, Benson CA, Mills A, Ramgopal M, Dejesus E, Brinson C, Cyktor J, Jacobs J, Koontz D, Mellors JW, Laird GM, Wrin T, Patel H, Guo S, Wallin J, Boice J, Zhang L, Humeniuk R, Begley R, German P, Graham H, Geleziunas R, Brainard DM, Sengupta D. 2021. Vesatolimod, a Toll-like Receptor 7 Agonist, Induces Immune Activation in Virally Suppressed Adults Living with Human Immunodeficiency Virus-1. *Clin Infect Dis* 72:E815–E824.
138. Vibholm LK, Konrad C V., Schleimann MH, Frattari G, Winckelmann A, Klastrup V, Jensen NM, Jensen SS, Schmidt M, Wittig B, Zuwala K, Mack K, Olesen R, Hua S, Lichterfeld M, Østergaard L, Denton PW, Tolstrup M, Søgaaard OS. 2019. Effects of 24-week Toll-like receptor 9 agonist treatment in HIV type 1+ individuals. *AIDS* 33:1315–1325.
139. Vibholm L, Schleimann MH, Højen JF, Benfield T, Offersen R, Rasmussen K, Olesen R, Dige A, Agnholt J, Grau J, Buzon M, Wittig B, Lichterfeld M, Petersen AM, Deng X, Abdel-Mohsen M, Pillai SK, Rutsaert S, Trypsteen W, De Spiegelaere W, Vandekerchove L, Østergaard L, Rasmussen TA, Denton PW, Tolstrup M, Søgaaard OS. 2017. Short-course toll-like receptor 9

- agonist treatment impacts innate immunity and plasma viremia in individuals with human immunodeficiency virus infection. *Clin Infect Dis* 64:1686–1695.
140. Schlaepfer E, Speck RF. 2011. TLR8 activates HIV from latently infected cells of myeloid-monocytic origin directly via the MAPK pathway and from latently infected CD4+ T cells indirectly via TNF- α . *J Immunol* 186:4314–4324.
 141. Dhamanage AS, Thakar MR, Paranjape RS. 2019. HIV-1-Mediated Suppression of IFN- α Production Is Associated with Inhibition of IRF-7 Translocation and PI3K/akt Pathway in Plasmacytoid Dendritic Cells. *AIDS Res Hum Retroviruses* 35:40–48.
 142. Casartelli N, Sourisseau M, Feldmann J, Guivel-Benhassine F, Mallet A. 2010. Tetherin Restricts Productive HIV-1 Cell-to-Cell Transmission. *PLoS Pathog* 6:e1000955.
 143. Jolly C, Booth NJ, Neil SJD. 2010. Cell-Cell Spread of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Overcomes Tetherin/BST-2-Mediated Restriction in T cells. *J Virol* 84:12185–12199.
 144. Bego MG, Côté É, Aschman N, Mercier J, Weissenhorn W, Cohen ÉA. 2015. Vpu Exploits the Cross-Talk between BST2 and the ILT7 Receptor to Suppress Anti-HIV-1 Responses by Plasmacytoid Dendritic Cells. *PLoS Pathog* 11:e1005024.
 145. Jego G, Palucka AK, Blanck JP, Chalouni C, Pascual V, Banchereau J. 2003. Plasmacytoid Dendritic Cells Induce Plasma Cell Differentiation through Type I Interferon and Interleukin 6. *Immunity* 19:225–234.
 146. Megjugorac NJ, Young HA, Amrute SB, Olshalsky SL, Fitzgerald-Bocarsly P. 2004. Virally stimulated plasmacytoid dendritic cells produce chemokines and induce migration of T and NK cells. *J Leukoc Biol* 75:504–514.
 147. Colonna M, Trinchieri G, Liu YJ. 2004. Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nat Immunol* 5:1219–1226.
 148. Kamphuis E, Junt T, Waibler Z, Forster R, Kalinke U. 2006. Type I interferons directly regulate lymphocyte recirculation and cause transient blood lymphopenia. *Blood* 108:3253–3261.
 149. Gota C, Calabrese L. 2003. Induction of clinical autoimmune disease by therapeutic interferon-alpha. *Autoimmunity* 36:511–518.
 150. Baenziger S, Heikenwalder M, Johansen P, Schlaepfer E, Hofer U, Miller RC, Diemand S, Honda K, Kundig TM, Aguzzi A, Speck RF. 2009. Triggering TLR7 in mice induces immune activation and lymphoid system disruption, resembling HIV-mediated pathology. *Blood* 113:377–388.
 151. Cao W, Bover L. 2010. Signaling and ligand interaction of ILT7: receptor-mediated regulatory mechanisms for plasmacytoid dendritic cells. *Immunol Rev* 234:163–176.
 152. Cao W, Bover L, Cho M, Wen X, Hanabuchi S, Bao M, Rosen DB, Wang YH, Shaw JL, Du Q,

- Li C, Arai N, Yao Z, Lanier LL, Liu YJ. 2009. Regulation of TLR7/9 responses in plasmacytoid dendritic cells by BST2 and ILT7 receptor interaction. *J Exp Med* 206:1603–14.
153. Mitchell D, Chintala S, Dey M. 2018. Plasmacytoid dendritic cell in immunity and cancer. *J Neuroimmunol* 322:63–73.
154. Smallwood HS, Aquino VH, Ferhadian D, Lupfer C, Jakobsen MR, Van Der Sluis RM, Egedal JH. 2020. Plasmacytoid Dendritic Cells as Cell-Based Therapeutics: A Novel Immunotherapy to Treat Human Immunodeficiency Virus Infection? *Front Cell Infect Microbiol* 1(249):1–12.
155. Villadangos JA, Young L. 2008. Antigen-Presentation Properties of Plasmacytoid Dendritic Cells. *Immunity* 29:352–361.
156. Isnard S, Hatton EX, Iannetta M, Guillerme J-B, Hosmalin A. 2021. Cell-Associated HIV Cross-Presentation by Plasmacytoid Dendritic Cells Is Potentiated by Noncognate CD8 + T Cell Preactivation. *J Immunol* 207:15–22.
157. Benitez-Ribas D, Adema GJ, Winkels G, Klasen IS, Punt CJA, Figdor CG, De Vries IJM. 2006. Plasmacytoid dendritic cells of melanoma patients present exogenous proteins to CD4+ T cells after Fc gamma RII-mediated uptake. *J Exp Med* 203:1629–1635.
158. Young LJ, Wilson NS, Schnorrer P, Proietto A, ten Broeke T, Matsuki Y, Mount AM, Belz GT, O’Keeffe M, Ohmura-Hoshino M, Ishido S, Stoorvogel W, Heath WR, Shortman K, Villadangos JA. 2008. Differential MHC class II synthesis and ubiquitination confers distinct antigen-presenting properties on conventional and plasmacytoid dendritic cells. *Nat Immunol* 9:1244–1252.
159. Tel J, Lambeck AJA, Cruz LJ, Tacke PJ, de Vries IJM, Figdor CG. 2010. Human plasmacytoid dendritic cells phagocytose, process, and present exogenous particulate antigen. *J Immunol* 184:4276–4283.
160. Tsai A, Irrinki A, Kaur J, Cihlar T, Kukulj G, Sloan DD, Murry JP. 2017. Toll-Like Receptor 7 Agonist GS-9620 Induces HIV Expression and HIV-Specific Immunity in Cells from HIV-Infected Individuals on Suppressive Antiretroviral Therapy. *J Virol* 91:e02166-16.
161. Ventura JD, Nkolola JP, Chandrashekar A, Borducchi EN, Liu J, Mercado NB, Hope DL, Gif VM, McMahan K, Geleziunas R, Murry JP, Yang Y, Lewis MG, Pau MG, Wegmann F, Schuitemaker H, Fray EJ, Kumar MR, Siliciano JD, Siliciano RF, Robb ML, Michael NL, Barouch DH. 2022. Therapeutic efficacy of an Ad26 / MVA vaccine with SIV gp140 protein and vesatolimod in ART-suppressed rhesus macaques. *npj vaccines* 7:53:1–8.
162. Ram, Renee R, Paul Duatschek, Nicolas Margot, Michael Abram, Romas Geleziunas, Joseph Hesselgesser CC. 2020. Activation of HIV-specific CD8+ T-cells from HIV+ donors by vesatolimod. *Antivir Ther* 25:163–169.

163. Neil SJD, Zang T, Bieniasz PD. 2008. Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu. *Nature* 451:425–430.
164. Sheehy AM, Gaddis NC, Choi JD, Malim MH. 2002. Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein. *Nature* 418:646–650.
165. Stremlau M, Owens CM, Perron MJ, Kiessling M, Autissier P, Sodroski J. 2004. The cytoplasmic body component TRIM5 α restricts HIV-1 infection in Old World monkeys. *Nature* 427:848–853.
166. Lahouassa H, Daddacha W, Hofmann H, Ayinde D, Logue EC, Dragin L, Bloch N, Maudet C, Bertrand M, Gramberg T, Pancino G, Priet S, Canard B, Laguette N, Benkirane M, Transy C, Landau NR, Kim B, Margottin-Goguet F. 2012. SAMHD1 restricts the replication of human immunodeficiency virus type 1 by depleting the intracellular pool of deoxynucleoside triphosphates. *Nat Immunol* 13:223–228.
167. Abdel-Mohsen M, Wang C, Strain MC, Lada SM, Deng X, Cockerham LR, Pilcher CD, Hecht FM, Liegler T, Richman DD, Deeks SG, Pillai SK. 2015. Select Host Restriction Factors Are Associated with HIV Persistence During Antiretroviral Therapy. *AIDS* 29:411–420.
168. Manches O, Frleta D, Bhardwaj N. 2014. Dendritic cells in progression and pathology of HIV infection. *Trends Immunol* 35:114–122.
169. Richman DD, Margolis DM, Delaney M, Greene WC, Hazuda D, Pomerantz RJ. 2009. The challenge of finding a cure for HIV infection. *Science* 323:1304–1307.
170. Chun TW, Stuyver L, Mizell SB, Ehler LA, Mican JAM, Baseler M, Lloyd AL, Nowak MA, Fauci AS. 1997. Presence of an inducible HIV-1 latent reservoir during highly active antiretroviral therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:13193–13197.
171. Siliciano JD, Kajdas J, Finzi D, Quinn TC, Chadwick K, Margolick JB, Kovacs C, Gange SJ, Siliciano RF. 2003. Long-term follow-up studies confirm the stability of the latent reservoir for HIV-1 in resting CD4⁺ T cells. *Nat Med* 9:727–728.
172. Mehandru S, Dandekar S. 2008. Role of the gastrointestinal tract in establishing infection in primates and humans. *Curr Opin HIV AIDS* 3:22–27.
173. Guzzo C, Ichikawa D, Park C, Phillips D, Liu Q, Kwon A, Miao H, Lu J, Rehm C, Arthos J, Cohen MS, Fauci AS, Kehrl JH, Lusso P, Zhang P, Kwon A, Miao H, Lu J, Rehm C, Arthos J, Cicala C, Cohen MS, Fauci AS, Kehrl JH, Lusso P. 2017. Virion incorporation of integrin $\alpha 4\beta 7$ facilitates HIV-1 infection and intestinal homing Christina. *Sci Immunol* 2:1–30.
174. Arthos J, Cicala C, Martinelli E, Macleod K, Van Ryk D, Wei D, Xiao Z, Veenstra TD, Conrad TP, Lempicki RA, Mclaughlin S, Pascuccio M, Gopaul R, McNally J, Cruz CC, Censoplano N, Chung E, Reitano KN, Kottlilil S, Goode DJ, Fauci AS, Ryk D Van, Wei D, Xiao Z, Veenstra TD,

- Conrad TP, Lempicki RA, Mclaughlin S, Pascuccio M, Gopaul R, McNally J, Cruz CC, Censoplano N, Chung E, Reitano KN, Kottlil S, Goode DJ, Fauci AS. 2008. HIV-1 envelope protein binds to and signals through integrin $\alpha 4\beta 7$, the gut mucosal homing receptor for peripheral T cells. *Nat Immunol* 9:301–309.
175. Cicala C, Martinelli E, McNally JP, Goode DJ, Gopaul R, Hiatt J, Jelacic K, Kottlil S, Macleod K, O'shea A, Patel N, Van Ryk D, Wei D, Pascuccio M, Yi L, Mckinnon L, Kimani J, Kaul R, Fauci AS, Arthos J. 2009. The integrin $\alpha 4\beta 7$ forms a complex with cell-surface CD4 and defines a T-cell subset that is highly susceptible to infection by HIV-1. *Proc Natl Acad Sci* 106:20877–20882.
176. Kader M, Wang X, Piatak M, Lifson J, Roederer M, Veazey R, Mattapallil JJ. 2009. $\alpha 4\beta 7$ hiCD4+ memory T cells harbor most Th-17 cells and are preferentially infected during acute SIV infection. *Mucosal Immunol* 2009 25 2:439–449.
177. Sivo A, Schuetz A, Sheward D, Vineet J, Yegorov S, Liebenberg L, Krebs S, Kane M, Balgobin A, Yende N, Garrett N, Samsunder N, Morris L, Nawaz F, Cicala C, Arthos J, Williamson C, Kaul R, Passmore J, Ananworanich J, Ansari A, Karim A, Abdool S, Mckinnon L. 2018. Integrin $\alpha 4\beta 7$ expression on systemic CD4+ T cells predicts higher rates of HIV acquisition and disease progression. *Sci Transl Med* 6354:1–10.
178. Byrareddy SN, Kallam B, Arthos J, Cicala C, Nawaz F, Hiatt J, Kersh EN, McNicholl JM, Hanson D, Reimann KA, Brameier M, Walter L, Rogers K, Mayne AE, Dunbar P, Villinger T, Little D, Parslow TG, Santangelo PJ, Villinger F, Fauci AS, Ansari AA. 2014. Targeting $\alpha 4\beta 7$ integrin reduces mucosal transmission of simian immunodeficiency virus and protects gut-associated lymphoid tissue from infection. *Nat Med* 20:1397–1400.
179. Sivo A, Schuetz A, Sheward D, Joag V, Yegorov S, Liebenberg LJ, Yende-Zuma N, Stalker A, Mwatelah RS, Selhorst P, Garrett N, Samsunder N, Balgobin A, Nawaz F, Cicala C, Arthos J, Fauci AS, Anzala AO, Kimani J, Bagaya BS, Kiwanuka N, Williamson C, Kaul R, Passmore JAS, Phanuphak N, Ananworanich J, Ansari A, Karim QA, Abdool Karim SS, McKinnon LR. 2018. Integrin $\alpha 4\beta 7$ expression on peripheral blood CD4+ T cells predicts HIV acquisition and disease progression outcomes. *Sci Transl Med* 10:1–20.
180. Martinelli E, Veglia F, Goode D, Guerra-Perez N, Aravantinou M, Arthos J, Piatak M, Lifson JD, Blanchard J, Gettie A, Robbiani M. 2013. The frequency of $\alpha 4\beta 7$ (high) memory CD4+ T cells correlates with susceptibility to rectal simian immunodeficiency virus infection. *J Acquir Immune Defic Syndr* 64:325–331.
181. Byrareddy SN, Sidell N, Arthos J, Cicala C, Zhao C, Little DM, Dunbar P, Yang GX, Pierzchalski K, Kane MA, Mayne AE, Song B, Soares MA, Villinger F, Fauci AS, Ansari AA. 2015. Species-specific differences in the expression and regulation of $\alpha 4\beta 7$ integrin in various nonhuman primates. *J Immunol* 194:5968–5979.

182. Soler D, Chapman T, Yang LL, Wyant T, Egan R, Fedyk ER. 2009. The Binding Specificity and Selective Antagonism of Vedolizumab, an Anti- $\alpha 4\beta 7$ Integrin Therapeutic Antibody in Development for Inflammatory Bowel Diseases. *J Pharmacol Exp Ther* 330:864–875.
183. Gundersen TE, Bastani NE, Blomhoff R. 2007. Quantitative high-throughput determination of endogenous retinoids in human plasma using triple-stage liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 21:1176–1186.
184. Saha A, Vats P, Thakur R, Khuroo A, Monif T. 2015. High Throughput LC-MS/MS Method for Simultaneous Estimation of 9-Cis-Retinoic Acid and its Metabolite 4-Oxo-9-Cis-Retinoic Acid in Human Plasma and its Application to a Bioequivalence Study. *J Anal Bioanal Tech* 2015 6:1–18.
185. Arnold SLM, Amory JK, Walsh TJ, Isoherranen N. 2012. A sensitive and specific method for measurement of multiple retinoids in human serum with UHPLC-MS/MS. *J Lipid Res* 53:587–598.
186. Mowat A. M.; Viney J. L. 1997. The anatomical basis of intestinal immunity. *Immunol Rev* 156:145–166.
187. Martin AR, Patel EU, Kirby C, Astemborski J, Kirk GD, Mehta SH, Marshall K, Janes H, Clayton A, Corey L, Hammer SM, Sobieszczyk ME, Arthos J, Cicala C, Redd AD, Quinn TC. 2020. The association of $\alpha 4\beta 7$ expression with HIV acquisition and disease progression in people who inject drugs and men who have sex with men: Case control studies: $\alpha 4\beta 7$ expression, HIV acquisition, and disease progression in PWID and MSM. *EBioMedicine* 62:103102 (1–7).
188. Wang X, Xu H, Gill AF, Pahar B, Kempf D, Rasmussen T, Lackner AA, Veazey RS. 2009. Monitoring alpha4beta7 integrin expression on circulating CD4+ T cells as a surrogate marker for tracking intestinal CD4+ T-cell loss in SIV infection. *Mucosal Immunol* 2:518–526.
189. Lee GQ, Reddy K, Einkauf KB, Gounder K, Chevalier JM, Dong KL, Walker BD, Yu XG, Ndung T, Lichtenfeld M. 2019. HIV-1 DNA sequence diversity and evolution during acute subtype C infection. *Nat Commun* 10:2737 (1–11).
190. Rose PP, Korber BT. 2000. Detecting hypermutations in viral sequences with an emphasis on G → A hypermutation. *Bioinformatics* 16:400–401.
191. Bruner KM, Wang Z, Simonetti FR, Bender AM, Kwon KJ, Sengupta S, Fray J, Beg SA, Antar AAR, Jenike KM, Bertagnolli LN, Capoferri AA, Kufera JT, Timmons A, Nobles C, Gregg J, Wada N, Ho Y-C, Zhang H, Margolick JB, Blankson JN, Deeks SG, Bushman FD, Siliciano JD, Laird GM, Siliciano F. 2019. A quantitative approach for measuring the reservoir of latent HIV-1 proviruses. *Nat Med* 566:120–125.
192. Dominguez-Molina B, Ferrando-Martinez S, Tarancon-Diez L, Hernandez-Quero J, Genebat M, Vidal F, Muñoz-Fernandez MA, Leal M, Koup R, Ruiz-Mateos E, Poli G, Carla Marchetti G,

- Rowland-Jones S, Ruiz-Mateos E, Ferrando-Martinez S, Dominguez-Molina B, Tarancon-Diez L, Hernandez-Quero J, Genebat M, Vidal F, Angeles Muñoz-Fernandez M, Leal M, Koup R. 2018. Immune Correlates of Natural HIV Elite Control and Simultaneous HCV Clearance-Supercontrollers. *Front Immunol* 9 (2897):1–13.
193. Besson GJ, Lalama CM, Bosch RJ, Gandhi RT, Bedison MA, Aga E, Riddler SA, McMahon DK, Hong F, Mellors JW. 2014. HIV-1 DNA Decay Dynamics in Blood During More Than a Decade of Suppressive Antiretroviral Therapy. *Clin Infect Dis* 59:1312–1321.
194. Massanella M, Ignacio RAB, Lama JR, Pagliuzza A, Dasgupta S, Alfaro R, Rios J, Ganoza C, Pinto-Santini D, Gilada T, Duerr A, Chomont N. 2021. Long-term effects of early antiretroviral initiation on HIV reservoir markers: a longitudinal analysis of the MERLIN clinical study. *The Lancet Microbe* 2:e198–e209.
195. Viard JP, Burgard M, Hubert JB, Aaron L, Rabian C, Pertuiset N, Lourenço M, Rothschild C, Rouzioux C. 2004. Impact of 5 years of maximally successful highly active antiretroviral therapy on CD4 cell count and HIV-1 DNA level. *Aids* 18:45–49.
196. Li JZ, Etemad B, Ahmed H, Aga E, Bosch RJ, Mellors JW, Kuritzkes DR, Lederman MM, Para M, Gandhi RT. 2016. The Size of the Expressed HIV Reservoir Predicts Timing of Viral Rebound after Treatment Interruption. *AIDS* 30:343–53.
197. Martin GE, Gossez M, Williams JP, Stö Hr B W, Meyerowitz J, Leitman EM, Goulder P, Porter K, Fidler S, Frater J. 2017. Post-treatment control or treated controllers? Viral remission in treated and untreated primary HIV infection. *AIDS* 31:477–484.
198. Chintanaphol M, Sacdalan C, Pinyakorn S, Rerknimitr R, Ridditid W, Prueksapanich P, Sereti I, Schuetz A, Acrowell T, Colby DJ, Lrobb M, Phanuphak N, Ananworanich J, Sspudich S, Kroon E. 2020. Feasibility and safety of research sigmoid colon biopsy in a cohort of Thai men who have sex with men with acute HIV-1. *J Virus Erad* 6:7–10.
199. Tincati C, Biasin M, Bandera A, Violin M, Marchetti G, Piacentini L, Vago GL, Balotta C, Moroni M, Franzetti F, Clerici M, Gori A. 2009. Early initiation of highly active antiretroviral therapy fails to reverse immunovirological abnormalities in gut-associated lymphoid tissue induced by acute HIV infection. *Antivir Ther* 14:321–330.
200. Thornhill JP, Lynch KD, Khan M, Martin GE, Hoare J, Peake S, Frater J, Fidler S. 2019. Vedolizumab use and the associations between alpha4beta7 expression and HIV reservoir in the gut during treated primary HIV infection. *Aids* 33:2266–2268.
201. Fisher K, Wang XQ, Lee A, Morcilla V, de Vries A, Lee E, Eden J-S, Deeks SG, Kelleher AD, Palmer S. 2022. Plasma-Derived HIV-1 Virions Contain Considerable Levels of Defective Genomes. *J Virol* 96:e0201121.
202. Joag VR, Mckinnon LR, Liu J, Kidane ST, Yudin MH, Nyanga B, Kimwaki S, Besel KE, Obila

- JO, Huibner S, Oyugi JO, Arthos J, Anzala O, Kimani J, Ostrowski MA, Hiv T, Group R, Kaul R. 2016. Identification of preferential CD4+ T-cell targets for HIV infection in the cervix. *Mucosal Immunol* 9:1–12.
203. Cicala C, Arthos J, Fauci AS. 2010. HIV-1 envelope, integrins and co-receptor use in mucosal transmission of HIV. *J Transl Med* 9:1–10.
204. Ansari AA, Reimann KA, Mayne AE, Takahashi Y, Stephenson ST, Wang R, Wang X, Li J, Price AA, Little DM, Zaidi M, Lyles R, Villinger F. 2011. Blocking of $\alpha 4\beta 7$ Gut-Homing Integrin during Acute Infection Leads to Decreased Plasma and Gastrointestinal Tissue Viral Loads in Simian Immunodeficiency Virus-Infected Rhesus Macaques. *J Immunol* 186:1044–1059.
205. Pereira LE, Onlamoon N, Wang X, Wang R, Li J, Reimann KA, Villinger F, Pattanapanyasat K, Mori K, Ansari AA. 2009. Preliminary in vivo efficacy studies of a recombinant rhesus anti- $\alpha 4\beta 7$ monoclonal antibody. *Cell Immunol* 259:165–176.
206. Frank I, Cigoli M, Arif MS, Fahlberg MD, Maldonado S, Calenda G, Pegu A, Yang ES, Rawi R, Chuang GY, Geng H, Liu C, Zhou T, Kwong PD, Arthos J, Cicala C, Grasperge BF, Blanchard JL, Gettie A, Fennessey CM, Keele BF, Vaccari M, Hope TJ, Fauci AS, Mascola JR, Martinelli E. 2021. Blocking $\alpha 4\beta 7$ integrin delays viral rebound in SHIVSF162P3-infected macaques treated with anti-HIV broadly neutralizing antibodies. *Sci Transl Med* 13:1–13.
207. Imamichia H, Dewar RL, Adelsberger JW, Rehm CA, O'doherty U, Paxinos EE, Fauci AS, Lane HC. 2016. 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* 113:8783–8788.
208. Cicala C, Arthos J, Fauci AS. 2019. Role of T-cell trafficking in the pathogenesis of HIV disease. *Curr Opin HIV AIDS* 14:115–120.
209. Goode D, Truong R, Villegas G, Calenda G, Guerra-Perez N, Piatak M, Lifson JD, Blanchard J, Gettie A, Robbiani M, Martinelli E. 2014. HSV-2-driven increase in the expression of $\alpha 4\beta 7$ correlates with increased susceptibility to vaginal SHIV(SF162P3) infection. *PLoS Pathog* 10:e1004567.
210. Perreau M, Savoye AL, De Crignis E, Jean-Marc Corpataux, Cubas R, Haddad EK, De Leval L, Graziosi C, Pantaleo G. 2013. Follicular helper T cells serve as the major CD4 T cell compartment for HIV-1 infection, replication, and production. *J Exp Med* 210:143–156.
211. Renault C, Veyrenche N, Mennechet F, Bedin A-S, Routy J-P, Van De Perre P, Reynes J, Tuaillon E. 2022. Th17 CD4+ T-Cell as a Preferential Target for HIV Reservoirs. *Front Immunol* 13:1–14.
212. Kanwar B, Favre D, McCune JM. 2010. Th17 and regulatory T cells: Implications for AIDS

- pathogenesis. *Curr Opin HIV AIDS* 5:151–157.
213. Iwata M, Hirakiyama A, Eshima Y, Kagechika H, Kato C, Song SY. 2004. Retinoic acid imprints gut-homing specificity on T cells. *Immunity* 21:527–538.
 214. Ross AC. 2012. Vitamin A and retinoic acid in T cell-related immunity. *Am J Clin Nutr* 96:1166S–72S.
 215. Mora JR, Iwata M, Von Andrian UH. 2008. Vitamin effects on the immune system: vitamins A and D take centre stage. *Nat Rev Immunol* 8:685–697.
 216. Nawaz F, Goes LR, Ray JC, Olowojesiku R, Sajani A, Ansari AA, Perrone I, Hiatt J, Van Ryk D, Wei D, Waliszewski M, Soares MA, Jelicic K, Connors M, Migueles SA, Martinelli E, Villinger F, Cicala C, Fauci AS, Arthos J. 2018. MAdCAM costimulation through Integrin- $\alpha 4\beta 7$ promotes HIV replication. *Mucosal Immunol* 11:1342–1351.
 217. Kaiser P, Lampiris HW, Kim P, Yukl SA, Havlir D V, Greene WC, Wong JK, Li P. 2016. Stimulating the RIG-I pathway to kill cells in the latent HIV reservoir following viral reactivation. *Nat Med* 22:807–811.
 218. Uzzan AM, Tokuyama M, Rosenstein AK, Tomescu C. 2018. Anti- $\alpha 4\beta 7$ therapy targets lymphoid aggregates in the gastrointestinal tract of HIV-1 infected individuals. *Sci Transl Med* 10:1–16.
 219. Dirajlal-Fargo S, Funderburg N. 2022. HIV and cardiovascular disease: the role of inflammation. *Curr Opin HIV AIDS* 17:286–292.
 220. Asselah T, Marcellin P, Schinazi RF. 2018. Treatment of hepatitis C virus infection with direct-acting antiviral agents: 100% cure? *Liver Int* 38 Suppl 1:7–13.
 221. Miller CJ, Baker J V., Bormann AM, Erlandson KM, Hullsiek KH, Justice AC, Neuhaus J, Paredes R, Petoumenos K, Wentworth D, Winston A, Wolfson J, Neaton JD. 2014. Adjudicated morbidity and mortality outcomes by age among individuals with HIV infection on suppressive antiretroviral therapy. *PLoS One* 9:e95061.
 222. Sunil M, Nigalye M, Somasunderam A, Martinez ML, Yu X, Arduino RC, Utay NS, Bell TK. 2016. Unchanged Levels of Soluble CD14 and IL-6 over Time Predict Serious Non-AIDS Events in HIV-1-Infected People. *AIDS Res Hum Retroviruses* 32:1205–1209.

ANEXOS

Otros trabajos desarrollados en el periodo de tesis

1. Vitallé J, Pérez-Gómez A, Ostos JF, Gasca-Capote C, **Jiménez-León MR**, Bachiller S, Rivas-Jeremías I, Silva-Sánchez MM, Ruiz-Mateos A, Martín-Sánchez MA, López-Cotes LF, Rafii-El-Idrissi Benhnia M, Ruiz-Mateos E. Immune defects associated with lower SARS-CoV-2 BNT162b2 mRNA 1 vaccine response in aged people. *JCI Insight*. 2022; 7(17):e161045.

2. Pérez-Gómez A, Gasca-Capote C, Vitallé J, Ostos FJ, Serna-Gallego A, Trujillo-Rodríguez M, Muñoz-Muela E, Giráldez-Pérez T, Praena-Segovia J, Navarro-Amuedo MD, Paniagua-García M, García-Gutiérrez M, Aguilar-Guisado M, Rivas-Jeremías I, **Jiménez-León MR**, Bachiller S, Fernández-Villar A, Pérez-González A, Gutierrez-Valencia A, Rafii-El-Idrissi Benhnia M, Weiskopf D, Sette A, López-Cotes LF, Poveda A, Ruiz-Mateos E. Deciphering the quality of SARS-CoV-2 specific T-cell response associated with disease severity, immune memory and heterologous response. *Clin Transl Med*. 2022;14:e802.

3. Pérez-Gómez A, Vitallé J, Gasca-Capote C, Gutierrez-Valencia A, Trujillo-Rodríguez M, Serna-Gallego A, Muñoz-Muela E, **Jiménez-León MR**, Rafii-El-Idrissi Benhnia M, Rivas-Jeremías I, Sotomayor C, Roca-Oporto C, Espinosa N, Infante-Domínguez C, Crespo-Rivas JC, Fernández-Villar A, Pérez-González A, López-Cotes LF, Poveda A, Ruiz-Mateos E. Dendritic cell deficiencies persist seven months after SARS-CoV-2 infection. *Cell Mol Immuno*. 2021; 18:2128-2139.

4. Masip J, Gasca-Capote C, **Jimenez-León MR**, Peraire J, Perez-Gomez A, Alba V, Malo AI, Leal L, Rodríguez Martín C, Rallón N, Viladés C, Olona M, Vidal F, Ruiz-Mateos E, Rull A. Differential miRNA plasma profiles associated with the spontaneous loss of HIV-1 control: miR-199a-3p and its potential role as a biomarker for quick screening of elite controllers. *Clin Transl Med*. 2021;11(7):1-6.

5. Vitallé J, Tarancón-Díez L, **Jiménez-León MR**, Terrén I, Orrantia A, Roca-Oporto C, López-Cotes LF, Ruiz-Mateos E, Zenarruzabeita O, Borrego F. CD300a identifies a CD4+ memory T cell subset with a higher susceptibility to HIV-1 infection. *AIDS*. 2020; 34(8):1249-1252.

6. Tarancon-Diez L, Rodríguez-Gallego E, Rull A, Peraire J, Viladés C, Portilla I, **Jiménez-León MR**, Verónica A, Herrero Pol, Leal M, Ruiz-Mateos E, Vidal F. Immunometabolism is a key factor for the persistent spontaneous elite control of HIV-1 infection. *EBioMedicine*. 2019;42:86-96.

Informes de comités éticos