

**ESTUDIO DE LAS ALTERACIONES
INMUNOVIROLÓGICAS DE PACIENTES
VIH “ESCASOS REPOBLADORES”:
POTENCIALES PREDICTORES Y
MECANISMOS IMPLICADOS**

Tesis Doctoral

ISAAC ROSADO SÁNCHEZ

Directores

D.^a YOLANDA MARÍA PACHECO LÓPEZ

D. MANUEL LEAL NOVAL

Tutor

D. ANTONIO CARRILLO VICO

ÍNDICE

1. Resumen
2. Introducción
 - **Artículo de revisión:** Pacheco YM, Rosado I, Genebat G, Leal M. **Low-Level CD4 Restoration, a Particular Discordant Response To Antiretroviral Therapy: Clinical Relevance And Immunovirological Characteristics.** AIDS Cyber Journal. 2015; 18: 103-112
3. Objetivos
4. Materiales, métodos y resultados.
 - 4.1. Rosado-Sánchez I, Jarrín I, Pozo-Balado MM, de Pablo-Bernal RS, Herrero-Fernández I, Álvarez-Ríos AI, Rodríguez-Gallego E, Genebat M, Vera M, Berenguer J, Martín ML, Bernal E, Vidal F, Blanco J, Leal M, Pacheco YM. **Higher levels of IL-6, CD4 turnover and Treg frequency are already present before cART in HIV-infected subjects with later low CD4 recovery.** Antiviral Res. 2017; 142:76-82 (FI: 4.271; D1).
 - **Anexo:** Parámetros inmunológicos de ER antes del TARc y tras el TARc (DATOS NO PUBLICADOS).
 - 4.2. Rosado-Sánchez I, Herrero-Fernández I, Álvarez-Ríos AI, Genebat M, Abad-Carrillo MA, Ruiz-Mateos E, Pulido F, González-García J, Montero M, Bernal-Morell E, Vidal F, Leal M, Pacheco YM. **A lower baseline CD4/CD8 T-cell ratio is independently associated with immunodiscordant response to antiretroviral therapy in HIV-infected subjects.** Antimicrob Agents Chemother. 2017; 61: e00605-17 (FI: 4.565; Q1).
 - 4.3. Rosado-Sánchez I, Herrero-Fernández I, Genebat M, Ruiz-Mateos E, Leal M, Pacheco YM. **Thymic Function Impacts the Peripheral CD4/CD8 Ratio of HIV-Infected Subjects.** Clin Infect Dis. 2017; 64:152-158 (FI: 8.216; D1).
 - 4.4. Rosado-Sánchez I, González-Magaña A, Pozo-Balado MM, Herrero-Fernández I, Polaino MJ, Rodríguez MM, González-Escribano MF, Leal M, Pacheco YM. **An *in vitro* System of Autologous Lymphocytes Culture that Allows Studying the Homeostatic Proliferation Mechanisms of Human Naïve CD4 T-cells.** Lab Invest; Aceptado (FI: 4.871; Q1).
 - 4.5. Rosado-Sánchez I, Herrero-Fernández I, Genebat M, del Romero J, Riera M, Podzamcer D, Olalla J, Vidal F, Muñoz-Fernández MÁ, Leal M, Pacheco YM. **A High Homeostatic Proliferation Precedes a Poor CD4 T-cell Recovery in Response to HIV Antiretroviral Therapy.** En revision
 - 4.6. Rosado-Sánchez I, Herrero-Fernández I, Tarancon-Diez L, Moreno S, Iribarren JA, Dalmau D, Vera-Méndez F, Leal M, Pacheco YM. **Increased Frequencies of Th17 cells and IL17a-producing Regulatory T-cells preceding the Immunodiscordant Response to Antiretroviral Treatment.** Journal of Infection. 2017; <https://doi.org/doi:10.1016/j.jinf.2017.10.010> (FI: 4.201; Q1).
5. Resumen de Resultados
6. Discusión Global
7. Conclusiones
8. Bibliografía
9. Financiación
10. Otras publicaciones generadas a lo largo del desarrollo de la Tesis doctoral.

ABREVIATURAS

APCs: Células presentadoras de antígeno

CD4: Linfocitos T CD4

CD8: Linfocitos T CD8

CoRIS: Cohorte española en investigación en SIDA

CXCR4: Receptor de quimiocinas CXCR4

DCs: Células dendríticas

ENOS: Eventos no definitorios de SIDA

ER: Escasos Repobladores

hsCRP: Proteína C reactiva ultrasensible

IL6: Interleuquina 6

IL7: Interleuquina 7

IL7R: Receptor de Interleuquina 7

MDSCs: Células supresoras derivadas del linaje mieloide

OX40: Receptor del factor de necrosis tumoral 4

OX40L: Ligando del receptor del factor de necrosis tumoral 4

R: Repobladores

RIS: Red española en Investigación en SIDA

SIDA: Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida

TARc: Tratamiento Antirretroviral Combinado

TemRA: Linfocitos T terminalmente diferenciados.

TGF- β : Factor de crecimiento transformante beta

TRECs: Círculos de escisión del receptor del linfocito T

Treg: Célula T reguladora

VIH: Virus de la Inmunodeficiencia Humana

VHC: Virus de la Hepatitis C

RESUMEN

La infección por VIH provoca una depleción masiva de linfocitos T CD4 (CD4) que finalmente evoluciona a SIDA si no se inicia tratamiento. El tratamiento antirretroviral combinado (TARc) consigue suprimir la viremia VIH permitiendo un aumento del recuento de CD4. Sin embargo, existe un grupo de individuos, denominados “Escasos Repobladores” (ER), que no recuperan sus niveles de CD4 a pesar del TARc. Diversos factores hacen necesario el estudio de estos sujetos. En primer lugar, los ER constituyen un 25% de los sujetos que comienzan el TARc con bajos CD4. Por otro lado, los ER presentan un mayor riesgo de experimentar eventos clínicos no definitorios de SIDA (ENOS) y de muerte. Desafortunadamente, todas las intervenciones terapéuticas dirigidas a aumentar los recuentos de CD4 de los ER han fallado, dejando patente la necesidad de comprender mejor los mecanismos inmunológicos implicados y así diseñar nuevas estrategias terapéuticas.

Se han propuestos diversos mecanismos inmunopatogénicos como potenciales desencadenantes de la escasa recuperación de CD4 tras el TARc. Sin embargo, todos los estudios previos se han llevado a cabo cuando los ER estaban bajo TARc, no pudiéndose descartar que las alteraciones descritas sean consecuencia de sus bajos recuentos CD4 en el momento de estudio. Para responder a dicha cuestión, nos propusimos estudiar los ER antes del inicio del TARc, cuando estos sujetos presentan recuentos de linfocitos T CD4 similares a los del grupo control. Este fue el primer objetivo de la presente Tesis Doctoral y fue abordado en el trabajo: “**Higher levels of IL-6, CD4 turnover and Treg frequency are already present before cART in HIV-infected subjects with later low CD4 recovery**”. El estudio de pacientes ER antes del inicio del TARc nos permitió determinar alteraciones inmunológicas que preceden a la escasa recuperación de linfocitos T CD4 y profundizar en potenciales factores asociados a dicha escasa reconstitución inmunológica.

Aunque ya desde el principio de la epidemia de SIDA se conocía que el VIH provoca una inversión del ratio de linfocitos T CD4/CD8 (ratio CD4/CD8), no ha sido hasta hace poco cuando la inversión de dicho parámetro se ha asociado a un riesgo aumentado a experimentar ENOS y a muerte. Sin embargo, se desconocía si el ratio CD4/CD8 antes del inicio del TARc se asocia con la posterior recuperación de CD4 bajo el TARc. Esta cuestión ha sido abordada en el segundo artículo: “**A lower baseline**

CD4/CD8 T-cell ratio is independently associated with immunodiscordant response to antiretroviral therapy in HIV-infected subjects". Este estudio nos permitió asociar la escasa recuperación de CD4 con bajos niveles en el ratio CD4/CD8 antes del inicio del TARc.

Por otro lado, los mecanismos involucrados en la inversión del ratio CD4/CD8 observada en el escenario VIH no están completamente dilucidados, y ningún trabajo previo había examinado el posible papel del timo, órgano responsable de la producción *de novo* de linfocitos CD4 y CD8 que se encuentra profundamente afectado en la infección por VIH, en dicho fenómeno. Esta cuestión fue abordada en el tercer artículo de la presente tesis: "**Thymic function impacts the peripheral CD4/CD8 ratio of HIV-infected subjects**". Este estudio nos permitió dilucidar una asociación entre el ratio CD4/CD8 de sangre periférica y la función tímica antes del inicio del tratamiento antirretroviral, además de un papel del timo en la posterior normalización del ratio CD4/CD8 durante el TARc.

La producción de nuevos linfocitos T por parte del timo tiene un papel fundamental en la recuperación de CD4. Sin embargo, hasta la fecha, no se había valorado el posible papel de los mecanismos de compensación periféricos o proliferación homeostática (PH) en dicho proceso. En primer lugar quisimos conocer más acerca del proceso de PH de linfocitos T CD4 humanos, ya que la mayoría de información existente había sido generada en modelos animales. Para ello desarrollamos un sistema de cultivos *in vitro* que nos permitió estudiar distintos tipos de PH e identificar marcadores celulares asociados a dicho fenómeno. Los resultados generados del estudio de la PH en linfocitos humanos, y la caracterización del modelo, fueron abordados en el quinto artículo de la presente tesis doctoral: "**An *in vitro* system of autologous lymphocytes culture that allows studying the homeostatic proliferation mechanisms of human naïve CD4 T-cells**". A continuación, para determinar la contribución de la PH sobre la escasa recuperación de linfocitos T CD4 de ER, determinamos la expresión de diversos marcadores celulares asociados al proceso de PH en ER antes del inicio del TARc y tras 24 meses de TARc supresor. Estos resultados fueron englobados en el quinto artículo de la presente tesis doctoral: "**A high homeostatic proliferation precedes a poor CD4 T-cell recovery in response to HIV antiretroviral therapy**".

En el contexto de la infección por VIH se ha descrito una depleción preferencial de células Th17, las cuales están implicadas en defensa frente a patógenos y en el mantenimiento de la integridad de la barrera intestinal. En trabajos recientes se han observado altas frecuencias de células Th17 en ER durante el TARc. Sin embargo, se desconocía si las altas frecuencias de Th17 se encuentran ya presentes antes del TARc. Esta cuestión fue abordada en el sexto artículo de la presente tesis doctoral: “**Increased frequencies of Th17 cells and IL17-producing regulatory T-cells preceding the immunodiscordant response to antiretroviral treatment**”. En este trabajo se asoció la frecuencia de células Th17 y otras poblaciones productoras de IL17a antes del inicio del TARc con la posterior escasa recuperación de CD4.

INTRODUCCIÓN

En ausencia de tratamiento antirretroviral, la infección por VIH provoca una depleción masiva de linfocitos CD4 y un desgaste inmunitario que termina por desencadenar SIDA y, finalmente, la muerte del paciente¹. El tratamiento antirretroviral combinado (TARc) consigue suprimir la viremia hasta niveles indetectables, lo cual permite un aumento del recuento de linfocitos CD4 y una recuperación inmunológica variable². Sin embargo, existe una proporción importante de individuos que no recupera sus niveles de linfocitos CD4 aun cuando el TARc consigue indetectabilizar completa y persistentemente la viremia VIH^{3,4}. Se han utilizado diferentes criterios para clasificar a estos sujetos que experimentan una respuesta anómala al TARc, como la ganancia absoluta de linfocitos CD4 durante un periodo variable de tiempo bajo TARc, o el aumento de linfocitos CD4 por encima de un determinado umbral. Sin embargo, muchas de esas clasificaciones no han tenido en cuenta el recuento de linfocitos CD4 más bajo registrado antes de iniciar el TARc (CD4 nadir), el cual se ha demostrado estar asociado con un mayor riesgo de muerte⁵ y a su vez con la escasa recuperación de linfocitos CD4⁶. Por ello, nuestro grupo y otros han definido a estos sujetos como aquellos que comienzan tardíamente el TARc (recuento de linfocitos T CD4 <200 cells/ μ l) y que no aumentan sus recuentos de linfocitos CD4 por encima de 250 cells/ μ l tras 24 meses bajo TARc supresor, denominándolos como “Escasos Repobladores” (ER).

Diversos factores hacen que actualmente exista un especial interés en el estudio de los pacientes ER. En primer lugar, los ER constituyen entre un 15-30% de los pacientes que comienzan el TARc con menos de 200 linfocitos CD4/ μ l^{7,8}, lo cual es especialmente relevante en nuestro entorno donde existen altas frecuencias de diagnósticos tardíos (35-70%)⁹⁻¹¹. Por otro lado, se ha descrito un mayor riesgo de muerte en los ER en comparación con sus controles^{7,8,12}, sujetos que también comienzan el TARc tardíamente (recuento de linfocitos T CD4 <200 cells/ μ l) pero que consiguen aumentar sus recuentos de linfocitos T CD4 por encima de 250 cells/ μ l tras 24 meses bajo TARc (denominados “Repobladores”; “R”). Por último, nuestro grupo y otros han observado que los ER, a pesar de no experimentar mayor riesgo de experimentar patología asociada a SIDA, presentan un mayor riesgo a experimentar eventos clínicos

no defintorios de SIDA (ENOS), principalmente canceres no defintorios de SIDA y enfermedades cardiovasculares, y un mayor riesgo de muerte^{13,14}. Desafortunadamente, todas las intervenciones terapéuticas desarrolladas para incrementar los recuentos de linfocitos CD4 de estos sujetos han fallado¹⁵⁻¹⁷, haciendo patente la necesidad de profundizar en los mecanismos inmunológicos y virológicos asociados a dicho fenómeno para así poder desarrollar nuevas estrategias terapéuticas.

Se han propuesto diversos mecanismos inmunopatogénicos como potenciales desencadenantes de la escasa recuperación de linfocitos CD4 en estos sujetos (Pacheco YM *et al.* AIDS Cyber Journal 2015; incluido al final de esta sección). Algunos de estos mecanismos engloban factores virales como una mayor viremia residual¹⁸ o como un tropismo viral CXCR4¹⁹. Otros, en cambio, están asociados con factores inmunológicos. Por un lado, en estos sujetos se han descrito diversas alteraciones homeostáticas en el eje IL7/IL7R²⁰ y una pérdida del equilibrio de poblacionales de linfocitos CD4, concretamente una menor frecuencia de células vígenes²¹ y una acumulación de células terminalmente diferenciadas (TemRA)^{21,22} y de células T reguladoras (Treg)²³. Adicionalmente, se ha descrito un mayor “*turnover*” celular²⁴, un aumento de marcadores de activación²⁵, senescencia²⁶ y agotamiento²⁷ en el nicho de linfocitos CD4, y una menor función tímica^{26,28}. Sin embargo, todos estos estudios se han llevado a cabo cuando los ER ya estaban bajo TARc, y por ende presentaban diferencias muy significativas en el recuento de linfocitos CD4 con respecto a cualquier grupo de comparación. Por ello no se puede discernir si las alteraciones descritas hasta el momento en ER bajo TARc son causa o consecuencia de sus bajos recuentos de linfocitos CD4.

Para responder a esta cuestión, nos propusimos identificar potenciales alteraciones inmunovirológicas presentes específicamente en ER antes del inicio del tratamiento, cuando los ER presentan recuentos de linfocitos CD4 similares a los del grupo control, y que precedieran a su escasa recuperación de linfocitos CD4. Este fue el primer objetivo de la presente Tesis Doctoral y fue abordado en el trabajo: “**Higher levels of IL-6, CD4 turnover and Treg frequency are already present before cART in HIV-infected subjects with later low CD4 recovery**”. El estudio de pacientes ER antes del inicio del TARc nos permitió determinar alteraciones inmunológicas que preceden a la escasa recuperación de linfocitos CD4 y explorar potenciales factores asociados a dicha escasa reconstitución inmunológica. Además nos permitió descartar el

papel casual de otras alteraciones inmunológicas que solo aparecen en estadios más avanzados de la escasa recuperación inmunológica.

Globalmente, los resultados de este estudio demuestran una pérdida de la homeostasis del pool de linfocitos T CD4 en el escenario de escasa reconstitución inmunológica. Sin embargo, la posible contribución de la población de linfocitos CD8 en dicho fenómeno no se había evaluado previamente. El ratio de linfocitos CD4/CD8 (ratio CD4/CD8) es considerado un marcador del estado inmunológico del nicho completo de linfocitos T, cuya inversión se asocia con el proceso de envejecimiento del sistema inmunitario^{29,30}. Por otro lado, aunque es ampliamente conocido que la infección por VIH provoca una inversión del ratio CD4/CD8³¹, no ha sido hasta hace poco cuando dicha inversión de dicho parámetro se ha asociado a un riesgo aumentado de ENOS y de muerte³². Sin embargo, a diferencia de los recuentos de linfocitos CD4 y del nadir de CD4, se desconocía si el ratio CD4/CD8 antes del inicio del TARc podía asociarse con la posterior recuperación de linfocitos CD4 tras el TARc. Esta cuestión fue abordada en el segundo artículo de la presente Tesis doctoral: “**A lower baseline CD4/CD8 T-cell ratio is independently associated with immunodiscordant response to antiretroviral therapy in HIV-infected subjects**”. Este estudio nos permitió asociar la escasa recuperación de linfocitos CD4 con bajos niveles en el ratio CD4/CD8 antes del inicio del TARc.

Por otro lado, aunque los mecanismos desencadenantes de la inversión del ratio CD4/CD8 observada en el escenario VIH no están completamente dilucidados, se ha señalado a la expansión de clones de linfocitos CD8³³ y a la depleción masiva de linfocitos CD4³⁴ que tienen lugar en este escenario, como principales contribuyentes en dicho proceso. De hecho, ambos fenómenos se han observado también (aunque con distinta intensidad) en el escenario del envejecimiento²⁹. En este escenario, se ha considerado muy relevante en la expansión de clones específicos de linfocitos CD8 el papel de la infección por citomegalovirus³⁵. Sin embargo, no se ha explorado si el timo, órgano involucrado en la producción *de novo* de linfocitos CD4 y CD8³⁶, que involuciona durante el envejecimiento y que está profundamente afectado en la infección por VIH³⁷, tiene algún impacto en la inversión del ratio CD4/CD8 observado en el escenario de la infección por VIH. Esta cuestión fue abordada en el tercer artículo de la presente Tesis doctoral: “**Thymic function impacts the peripheral CD4/CD8 ratio of HIV-infected subjects**”. Este estudio nos permitió dilucidar una asociación

entre el ratio CD4/CD8 de sangre periférica y el timo en sujetos con infección por HIV antes del inicio del tratamiento antirretroviral, además del papel de este órgano en la posterior recuperación del ratio CD4/CD8 durante el TARc.

La producción de nuevos linfocitos T por parte del timo tiene un papel fundamental en la reconstitución inmunológica tras el TARc³⁸. Sin embargo, en situaciones clínicas de linfopenia como las que ocurre en la infección por VIH, y especialmente cuando la función tímica se encuentra disminuida, entran en juego mecanismos periféricos de compensación como la Proliferación Homeostática (PH)³⁶. Nuestro grupo ha contribuido previamente en el estudio del papel del timo en la reconstitución inmunológica tras el TARc³⁸, sin embargo el posible papel de la PH no se había explorado previamente. Para esto, en primer lugar quisimos conocer más acerca del proceso de PH de linfocitos CD4 humanos, ya que la mayoría de información existente había sido generada en modelos animales. Se conoce la existencia de dos tipos diferentes de PH, la PH lenta en la cual los linfocitos CD4 vírgenes proliferan lentamente en respuesta a citoquinas homeostáticas como la IL7 generando más linfocitos vírgenes³⁹, y la PH rápida en la cual los linfocitos CD4 proliferan rápidamente en respuesta a antígenos propios y/o comensales pero generando linfocitos memoria^{39,40}. Para estudiar de manera simultánea ambos tipos de PH de linfocitos CD4 humanos desarrollamos un sistema de cocultivos que presentaba múltiples ventajas con respecto a otros modelos existentes. Los resultados generados del estudio de ambos tipos de PH en linfocitos humanos, y la caracterización exhaustiva del modelo, fueron abordados en el cuarto artículo de la presente Tesis doctoral: “**An *in vitro* system of autologous lymphocytes culture that allows studying the homeostatic proliferation mechanisms of human naïve CD4 T-cells**”. En este trabajo, además de caracterizar un nuevo modelo *in vitro* para el estudio de la PH en linfocitos CD4 humanos, se identificó diversos marcadores celulares específicamente expresados en linfocitos CD4 humanos durante la PH.

A continuación, para determinar la potencial contribución de la PH en las alteraciones inmunológicas presentes en ER antes del TARc y que preceden a la escasa recuperación de linfocitos CD4, procedimos a determinar la expresión de los marcadores asociados a PH y a buscar potenciales asociaciones con los parámetros inmunológicos alterados en dicho escenario. Los resultados generados de este estudio han sido englobados en el quinto artículo de la presente Tesis doctoral: “**A high**

homeostatic proliferation precedes a poor CD4 T-cell recovery in response to HIV antiretroviral therapy". En este trabajo exploramos por primera vez diversos marcadores celulares asociados al proceso de PH en ER antes del inicio del TARc y tras 24 meses de TARc supresor.

En el contexto de la infección por VIH se ha descrito una depleción preferencial de ciertas subpoblaciones de linfocitos CD4, como las células Th17⁴¹, las cuales están implicadas en la defensa frente a patógenos y en el mantenimiento de la integridad de la barrera intestinal^{42,43}. Estos hallazgos explican la razón por la que la depleción de células Th17 observada en el escenario VIH se asocia con una mayor translocación de compuestos bacterianos (translocación bacteriana)⁴⁴ la cual, en última instancia, desencadena mayor activación e inflamación sistémica^{45,46}. Por su parte, se han descrito altos niveles de translocación bacteriana en ER bajo TARc⁴⁷, por lo que era esperable que dichos sujetos presentaran frecuencias de Th17 reducidas. Sin embargo, trabajos recientes han observado mayores frecuencias de Th17 en sangre periférica de ER durante el TARc^{48,49}, lo cual constituye una paradoja con respecto al resto de escenarios VIH. Aun así, se desconocía si las altas frecuencias de células Th17 periféricas se encontraban ya presentes antes del inicio del TARc, y por ende, si podrían anticipar la escasa recuperación de linfocitos CD4 de estos pacientes. Esta cuestión fue abordada en el sexto artículo de la presente Tesis doctoral: **"Increased frequencies of Th17 cells and IL17-producing regulatory T-cells preceding the immunodiscordant response to antiretroviral treatment"**. En este trabajo, hemos comprobado que existe una frecuencia incrementada de células Th17 y de otras poblaciones celulares productoras de IL17a antes del inicio del TARc en sujetos con una posterior escasa recuperación de linfocitos CD4.

Low-Level CD4 Restoration, a Particular Discordant Response To Antiretroviral Therapy: Clinical Relevance And Immunovirological Characteristics

Pacheco YM, Rosado I, Genebat G, Leal M.

AIDS Cyber Journal. 2015; 18: 103-112

OBJETIVOS

Los objetivos planteados a lo largo del desarrollo de esta Tesis doctoral fueron los siguientes:

- **Objetivo 1**

Identificar potenciales alteraciones inmunoviológicas presentes en pacientes ER antes del inicio del TARc, cuando presentan recuentos de linfocitos T CD4 similares a los del grupo control (Repobladores) y que, por tanto, precedan a la escasa recuperación de linfocitos T CD4. Este objetivo fue abordado en el siguiente artículo: **Higher levels of IL-6, CD4 turnover and Treg frequency are already present before cART in HIV-infected subjects with later low CD4 recovery.** Antiviral Res. 2017; 142:76-82

- **Objetivo 2**

Determinar si el ratio CD4/CD8 al inicio del tratamiento antirretroviral se asocia con una posterior escasa recuperación de linfocitos T CD4. Este objetivo fue abordado en el siguiente artículo: **A lower baseline CD4/CD8 T-cell ratio is independently associated with immunodiscordant response to antiretroviral therapy in HIV-infected subjects.** Antimicrob Agents Chemother. 2017; 61(8). pii: e00605-17.

- **Objetivo 3**

Explorar el potencial impacto de la función tímica antes del inicio del tratamiento antirretroviral sobre el ratio CD4/CD8 periférica en sujetos infectados por VIH. Este objetivo fue abordado en el siguiente artículo: **Thymic Function Impacts the Peripheral CD4/CD8 Ratio of HIV-Infected Subjects.** Clin Infect Dis. 2017; 64(2):152-158.

- **Objetivo 4**

Generar un modelo *in vitro* para el estudio en profundidad los procesos de compensación periférica (proliferación homeostática) de linfocitos T CD4 humanos. Este objetivo fue abordado en el siguiente artículo: **An *in vitro* System of Autologous**

Lymphocytes Culture that Allows Studying the Homeostatic Proliferation Mechanisms of Human Naïve CD4 T-cells. Lab Invest. Aceptado.

- **Objetivo 5**

Estudiar la contribución de los procesos de compensación periférica (proliferación homeostática) sobre la escasa recuperación de linfocitos T CD4 tras el tratamiento antirretroviral. Este objetivo fue abordado en el siguiente artículo: **A High Homeostatic Proliferation Precedes a Poor CD4 T-cell Recovery in Response to HIV Antiretroviral Therapy.** En revisión

- **Objetivo 6**

Explorar si las frecuencias de células Th17 antes del inicio del tratamiento antirretroviral, y de otras subpoblaciones celulares productoras de Il17a, se asocian a la escasa recuperación de linfocitos T CD4. Este objetivo fue abordado en el siguiente artículo: **Increased Frequencies of Th17 cells and IL17a-producing Regulatory T-cells preceding the Immunodiscordant Response to Antiretroviral Treatment.** Journal of Infection. 2017; doi:10.1016/j.jinf.2017.10.010

RESULTADOS

Higher levels of IL-6, CD4 turnover and Treg frequency are already present before cART in HIV-infected subjects with later low CD4 recovery.

Rosado-Sánchez I, Jarrín I, Pozo-Balado MM, de Pablo-Bernal RS, Herrero-Fernández I, Álvarez-Ríos AI, Rodríguez-Gallego E, Genebat M, Vera M, Berenguer J, Martín ML, Bernal E, Vidal F, Blanco J, Leal M, Pacheco YM.

Antiviral Res. 2017; 142:76-82

**A lower baseline CD4/CD8 T-cell ratio is
independently associated with
immunodiscordant response to
antiretroviral therapy in HIV-infected
subjects.**

Rosado-Sánchez I, Herrero-Fernández I, Álvarez-Ríos AI, Genebat M,
Abad-Carrillo MA, Ruiz-Mateos E, Pulido F, González-García J, Montero
M, Bernal-Morell E, Vidal F, Leal M, Pacheco YM

Antimicrob Agents Chemother. 2017; 61. pii: e00605-17

Thymic Function Impacts the Peripheral CD4/CD8 Ratio of HIV-Infected Subjects.

Rosado-Sánchez I, Herrero-Fernández I, Genebat M, Ruiz-Mateos E, Leal M, Pacheco YM.

Clin Infect Dis. 2017; 64:152-158

**An *in vitro* System of Autologous
Lymphocytes Culture that Allows
Studying the Homeostatic Proliferation
Mechanisms of Human Naïve CD4 T-cells.**

Rosado-Sánchez I, González-Magaña A, Pozo-Balado MM, Herrero-Fernández I, Polaino MJ, Rodríguez MM, González-Escribano MF, Leal M, Pacheco YM.

Lab Invest. (Aceptado)

A High Homeostatic Proliferation Precedes a Poor CD4 T-cell Recovery in Response to HIV Antiretroviral Therapy.

Rosado-Sánchez I, Herrero-Fernández I, de Pablo-Bernal RS,
Genebat M, del Romero J, Riera M, Podzamcer D, Olalla J, Vidal
F, Muñoz-Fernández MÁ, Leal M, Pacheco YM.

En revisión

Increased Frequencies of Th17 cells and IL17a-producing Regulatory T-cells preceding the Immunodiscordant Response to Antiretroviral Treatment.

Rosado-Sánchez I, Herrero-Fernández I, Tarancon-Diez L, Moreno S, Iribarren JA, Dalmau D, Vera-Méndez F, Leal M, Pacheco YM

Journal of Infection. 2017;
doi:10.1016/j.jinf.2017.10.010

RESUMEN DE RESULTADOS

El principal hallazgo generado del primer artículo de la presente tesis doctoral **“Higher levels of IL-6, CD4 turnover and Treg frequency are already present before cART in HIV-infected subjects with later low CD4 recovery”** es la identificación de alteraciones inmunológicas específicas en sujetos que comienzan el TARc con bajos recuentos de linfocitos CD4 y que van a experimentar una posterior escasa reconstitución inmunológica tras el TARc. Estas alteraciones se encuentran principalmente en la población de linfocitos CD4, donde observamos una pérdida del equilibrio entre subpoblaciones, principalmente una acumulación de linfocitos CD4 memoria central (CD45RA-CD27+), un mayor *“turnover”* celular y una mayor frecuencia de Treg. Además se encontró mayores niveles de IL6 soluble en estos sujetos, sugiriendo un mayor estado proinflamatorio. Por otro lado, otro resultado importante fue la similitud observada entre los ER y el grupo control al inicio del TARc en diversos parámetros inmunológicos (como senescencia, activación y agotamiento celular en los linfocitos CD4, concentraciones de IL7,...) que, sin embargo, si se encontraron alterados tras el TARc, tal y como se encuentra descrito en la literatura.

Con respecto al segundo artículo de la presente tesis doctoral, **“A lower baseline CD4/CD8 T-cell ratio is independently associated with immunodiscordant response to antiretroviral therapy in HIV-infected subjects”**, observamos que los ER antes del inicio del TARc presentaban un ratio CD4/CD8 más bajo que los R aun cuando no presentaban diferencias en los recuentos de linfocitos CD4 ni CD8 y tras ajustar por otras posibles variables asociadas. Relacionado con estos resultados, del tercer artículo de la presente tesis **“Thymic function impacts the peripheral CD4/CD8 ratio of HIV-infected subjects”** se deduce la existencia de una relación entre el ratio CD4/CD8 y la función tímica de sujetos infectados por VIH antes del inicio del TARc, aportando evidencias de un impacto de la función tímica al inicio de TARc en la posterior recuperación del ratio CD4/CD8, y por ende, en la progresión clínica de estos sujetos.

En el cuarto artículo de la presente tesis doctoral **“An *in vitro* system of autologous lymphocytes culture that allows studying the homeostatic proliferation mechanism of human naïve CD4 T-cells”**, llevamos a cabo la puesta a punto y

caracterización de un modelo *in vitro* para el estudio de la PH de linfocitos CD4 humanos, el cual presentaba múltiples ventajas frente a otros modelos existentes. Paralelamente, en dicho trabajo se exponen resultados novedosos sobre el proceso de PH en humanos, como la generación de Treg productoras de TGF- β durante el proceso de PH rápida o la identificación de diversos marcadores celulares asociados a los distintos tipos de PH. A continuación, en el quinto artículo de la presente tesis doctoral: **“A high homeostatic proliferation precedes a poor CD4 T-cell recovery in response to HIV antiretroviral therapy”**, exploramos la potencial contribución de la PH sobre las alteraciones inmunológicas que preceden la escasa recuperación de linfocitos CD4 de ER. En concreto, encontramos aumentados diversos marcadores asociados con los procesos de PH rápida (OX40, $\alpha 4\beta 7$) en los linfocitos CD4 de ER antes del inicio del TARc. Además la expresión de dichos marcadores se encontró fuertemente asociado con marcadores de “*turnover*” celular, y por tanto, con la proliferación celular.

El principal hallazgo del sexto artículo de la presente tesis doctoral **“Increased frequencies of Th17 cells and IL17-producing regulatory T-cells preceding the immunodiscordant response to antiretroviral treatment”** fue encontrar una asociación entre altas frecuencias de células Th17 y la posterior escasa recuperación de linfocitos CD4. Interesantemente, este aumento de células Th17 en ER antes del TARc se acompañó con un aumento en las frecuencias de Treg, no encontrándose por ende diferencias en el ratio Th17/Treg. Por último, en este trabajo se describió por primera vez en ER una acumulación de Treg productoras de IL17a.

DISCUSIÓN GLOBAL

A pesar de que el TARc ha supuesto un gran avance en la clínica de la infección por VIH al ser capaz de indetectabilizar la viremia y permitir una recuperación inmunológica variable², existen individuos que presentan una respuesta anómala a dicho TARc. En estos individuos, conocidos como escasos repobladores (ER), el TARc consigue suprimir la viremia, sin embargo, esto no se acompaña de una recuperación del recuento de linfocitos CD4^{3,4}.

Existe abundante información sobre distintas alteraciones inmunoviológicas asociadas a los ER^{50,51}, sin embargo toda esta información se ha generado a partir de estudios de asociación llevados a cabo tras un tiempo variable bajo TARc, cuando ya ha tenido lugar la respuesta anómala al TARc y por ende cuando estos sujetos presentan recuentos de linfocitos CD4 muy diferenciados a cualquier grupo de control. Por esto, no es posible discernir con claridad si dichas alteraciones son causa o consecuencia de los bajos recuentos de linfocitos CD4 que presentan estos sujetos. Para resolver esta cuestión, nos propusimos identificar potenciales alteraciones inmunoviológicas presentes en ER antes del inicio del TARc, cuando sus recuentos de linfocitos CD4 eran similares a los del grupo control. Para ello diseñamos un estudio caso-control en el que seleccionamos ER y R en la Cohorte Española de Investigación en Sida (CoRIS)⁵² que tuvieran muestras basales disponibles al inicio del TARc en el Biobanco de la RIS⁵³, y que estuvieran apareados por diversos factores de riesgo: edad, sexo, carga viral, y recuentos de linfocitos CD4 al inicio del TARc. Sin embargo, el proceso de apareamiento por estas variables fue complicado, especialmente en el caso de los recuentos de linfocitos CD4, debido a la fuerte asociación existente entre los bajos recuentos de linfocitos CD4 al inicio del TARc y la posterior escasa recuperación de linfocitos CD4⁷. Pese a esto, conseguimos reclutar un grupo de 21 ER y 21 R, los cuales, aun no presentando medianas de recuentos de linfocitos CD4 idénticas, no presentaban diferencias significativas en dicho parámetro al inicio del TARc.

Las alteraciones celulares encontradas en ER antes del inicio del TARc se encontraban principalmente en la población de linfocitos CD4. En primer lugar observamos que los linfocitos CD4 de ER presentaban una alta expresión de marcadores como Ki67 y CD95, denotando un mayor estado proliferativo y una mayor muerte

celular (“*turnover*” celular) antes del inicio del TARc. Interesantemente, un mayor “*turnover*” de linfocitos CD4 en ER ya había sido descrito por otros²⁴, pero tras el TARc, cuando los ER presentaban recuentos de linfocitos CD4 disminuidos con respecto a su grupo control. En cambio, en nuestro escenario de estudio, los ER no presentaban diferencias en los recuentos de linfocitos CD4 en comparación con los R. Aun así, debido a la relevancia que presentan los recuentos de linfocitos CD4 en la infección por VIH y a que, aun no presentando diferencias significativas, las medianas de los recuentos de linfocitos entre ER y R no eran idénticas, se llevó a cabo un análisis multivariante corrigiendo por los mismos. Sin embargo, tras dicho análisis multivariante, los niveles de Ki67 y CD95 seguían estando significativamente aumentados en los ER sugiriendo que dicha alteración era independiente del recuento de linfocitos CD4. De manera relevante, otras alteraciones encontradas en linfocitos CD4 de ER apoyaban los hallazgos anteriormente comentados. Por un lado encontramos niveles significativamente aumentados de linfocitos coexpresando CD28 (molécula coestimuladora) y CD57 (marcador de senescencia replicativa), lo cuales han sido previamente descritos como un fenotipo de células inmunosenescentes no clásicas asociadas a procesos proliferativos^{54,55}. Por otro lado encontramos aumentados marcadores asociados a procesos de PH (OX40, CD25 y $\alpha 4\beta 7$) en los ER.

Los mecanismos de PH se basan en una proliferación periférica de linfocitos T en condiciones de linfopenia³⁹. Esta proliferación tiene lugar en respuesta a estímulos homeostáticos (principalmente IL7 y reconocimiento antigénico mediado por TCR) que en condiciones normales no desencadenan tal respuesta proliferativa³⁹. Existen dos tipos de PH, una PH lenta que genera nuevos linfocitos vírgenes y una PH rápida en la cual se generan linfocitos memoria³⁹. Por un lado, como anteriormente hemos comentado, los ER presentaron elevadas frecuencias de linfocitos CD4 expresando CD25 y $\alpha 4\beta 7$, los cuales han sido previamente asociadas a procesos de PH^{56,57}. Por otro lado, los ER también presentaron elevadas frecuencias de linfocitos CD4 expresando OX40 o CD134, molécula específicamente relacionada con la PH rápida en modelos animales⁵⁷. Usando nuestro modelo de cultivos para el estudio de la PH, demostramos que los marcadores CD25 y $\alpha 4\beta 7$ se upregulan durante la PH (tanto lenta como rápida) de linfocitos CD4 humanos. Adicionalmente, en nuestro cultivo celular, también demostramos que la molécula OX40 se upregula de manera específica durante la PH rápida de linfocitos CD4 humanos. Por último, a diferencia de lo que se ha descrito en

modelos animales^{39,57}, nuestro modelo de cocultivos nos permitió demostrar que la PH rápida de linfocitos CD4 humanos genera linfocitos memoria con un fenotipo memoria central (CD45RA-CD27+). De manera relevante, otra de las alteraciones inmunológicas encontrada en ER al inicio del TARc fue una acumulación de estas células memoria central, a diferencia de lo que ocurre tras la instauración del TARc²¹. Todos estos resultados sugieren fuertemente que los ER sufren una exacerbación en los mecanismos de compensación periféricos, y específicamente de la PH rápida.

OX40 es una molécula coestimuladora que juega un papel crucial en el dialogo entre los linfocitos T y las APCs⁵⁸. Sin embargo, dicho diálogo no solo tiene efectos en los primeros⁵⁹, sino que la función de las APCs también se ve afectada⁵⁸. De hecho, se conoce que la señalización a través de OX40 en células dendríticas (DCs) las transforma en DCs proinflamatorias, capaces de producir moléculas con capacidad proinflamatoria como la IL6⁶⁰. De manera relevante, otro de los hallazgos más interesantes de la presente tesis son los elevados niveles de IL6 y hsCRP encontrados en los ER en comparación con los R antes del TARc, los cuales estaban a su vez asociados con las frecuencias de OX40 encontradas en linfocitos CD4. Estos resultados en conjunto sugieren que la PH rápida, a través de la upregulación de OX40, podría tener un papel relevante en la generación y acumulación de marcadores proinflamatorios en los ER, y por ende, en la evolución clínica de estos individuos.

A pesar de que la IL6 es comúnmente conocida por su actividad proinflamatoria, esta citoquina posee una función pleiotrópica sobre distintos tipos celulares⁶¹. En lo que se refiere a la población de linfocitos T, se ha descrito que la IL6 favorece la proliferación de linfocitos CD4 memoria a la vez que dificulta la proliferación mediada por IL7 de linfocitos CD4 vírgenes⁶². Esto sugiere que la IL6 podría favorecer la PH rápida y a su vez dificultar la PH lenta, constituyendo un potencial círculo vicioso en sujetos ER, ya que por un lado la PH rápida podría generar inflamación a través de OX40, y por otro la propia inflamación podría favorecer y potenciar la PH rápida que en última instancia upregularía OX40. Aunque son necesarios estudios específicos para demostrar esta hipótesis, existen estudios sobre el uso de fármacos bloqueantes del ligando de OX40 (OX40L) en modelos animales de inflamación, donde se ha comunicado un papel protector al uso de los mismos⁶³. Todo esto, y la potencial implicación que tiene la PH rápida y OX40 en los ER, sugiere que el uso de fármacos dirigidos frente al eje OX40-OX40L podría constituir una herramienta prometedora para

reducir el estado proinflamatorio de estos sujetos. Por otro lado, la IL6 constituye un factor de diferenciación de diversas poblaciones de linfocitos CD4 como las células Th17^{64,65}, favoreciendo su generación. A su vez se ha descrito en modelos animales que la PH rápida es capaz de generar células Th17⁵⁷, lo cual, junto con los niveles elevados de IL6 soluble, podría ser una de las causas de la acumulación de estas células en los ER antes del TARc. Las altas frecuencias de células Th17 encontradas en ER constituyen en sí mismo un paradigma del escenario de escasa reconstitución inmunológica, ya que está ampliamente establecido que las frecuencias de células Th17 van disminuyendo conforme bajan los recuentos de linfocitos CD4 en la infección general por VIH⁴¹. Sin embargo, este aparente paradigma podría entenderse no solo desde la perspectiva de que las Th17 son células protectoras de la barrera intestinal, sino desde una perspectiva patogénica, ya que dichas células han sido también asociadas con la inmunopatogenia de diversas enfermedades de carácter inflamatorio⁶⁶.

Adicionalmente se ha descrito que la IL6 es también capaz de expandir células supresoras derivadas de monocitos (MDSC)⁶⁷. Las MDSCs son APCs con una función supresora directa sobre otros tipos celulares, e indirecta, ya que favorecen la generación de Treg⁶⁸. Interesantemente, encontramos elevadas frecuencias tanto de MDSCs como de Treg en los ER antes del inicio del TARc, apoyando fuertemente el hipotético círculo vicioso anteriormente comentado. Por otra parte, aunque ya ha sido previamente descrito que la PH es capaz de generar Treg en modelos animales⁶⁹, nosotros hemos sido pioneros en demostrar que estas células supresoras son también producidas por la PH de linfocitos CD4 humanos. Por ello, tanto la acumulación de MDSCs anteriormente comentada, como la exacerbación de la PH rápida observada en los ER, podrían explicar la alta frecuencia de Treg observada en estos sujetos antes del TARc. Adicionalmente, la capacidad de estas células de generar TGF β podría a su vez favorecer la fibrosis del tejido linfoide⁷⁰, lo que dificulta adicionalmente la recuperación de linfocitos T CD4.

Por otro lado, las frecuencias aumentadas de tanto las células Treg como las células Th17, las cuales presentan funcionalidad contrapuesta, en ER antes del TARc, sugiere una pérdida de la homeostasis inmunológica. Sin embargo, tanto las células Treg y Th17 presentan cierta plasticidad fenotípica y funcional^{71,72} favorecida por un origen ontogénico común y también por poseer factores de diferenciación como el TGF- β compartidos^{73,74}. En este sentido, encontramos aumentado la frecuencia de Treg

productoras de IL17a en ER antes del TARc, las cuales presentan características intermedias entre las células Treg y Th17⁷². De manera importante, estas células Treg productoras de IL17a han sido asociadas a diversas patologías inflamatorias^{75,76} y, aunque han sido pobremente estudiadas en la infección por VIH, podrían tener un papel en la desregulación inmunológica presente en ER y por tanto en la escasa recuperación de linfocitos CD4.

Aunque la exacerbación de la PH y del “*turnover*” celular observada en ER sugiere un menor aporte de linfocitos por parte del timo, esto solo ha sido demostrado en ER tras la instauración del TARc⁷⁷, por lo que procedimos a determinar este parámetro antes del inicio del TARc. En un primer momento, intentamos determinar la función tímica usando el ratio gamma/delta TRECs⁷⁸. Sin embargo, encontramos que muchos sujetos, tanto ER como R, presentaban niveles de TRECs indetectables, y por tanto, aunque las frecuencias de ER con niveles de TRECs indetectables eran mayores, no pudimos concluir que los ER presentaran una menor función tímica. Por otro lado, en otro de los trabajos que constituyen la presente tesis doctoral, encontramos una asociación directa entre el volumen tímico y el ratio CD4/CD8 en sujetos infectados por VIH antes del inicio del TARc, e interesantemente, también demostramos que los ER presentaban un menor ratio CD4/CD8 antes del inicio del TARc que los R. Estos datos sugieren que aun cuando ambos grupos de sujetos (ER y R) presentan una función tímica muy pobre antes del TARc, los ER podrían presentar una función tímica aún menor. En esta línea, se ha descrito que altos niveles de IL6 afectan negativamente al timo provocando su involución y mal funcionamiento⁷⁹, por tanto, las altas concentraciones de IL6 encontrados en ER podrían ser un potencial desencadenante de la menor función tímica que presentan estos sujetos. A su vez, se ha descrito que una función tímica alterada favorece el escape de clones autoreactivos a sangre periférica⁸⁰, lo cual en última instancia genera mayor inflamación, y esta, tal y como hemos comentado anteriormente, afecta a su vez negativamente a la función tímica⁷⁹. Aunque estudios más exhaustivos son necesarios para confirmar este nexo entre la función tímica y la inflamación en el escenario de escasa recuperación de linfocitos CD4, este podría constituir otro potencial círculo vicioso en la inmunopatogenia de los ER y de la infección por VIH.

En otro de los artículos que conforman la presente tesis doctoral describimos que un timo conservado en situación basal al TARc se asocia con una posterior

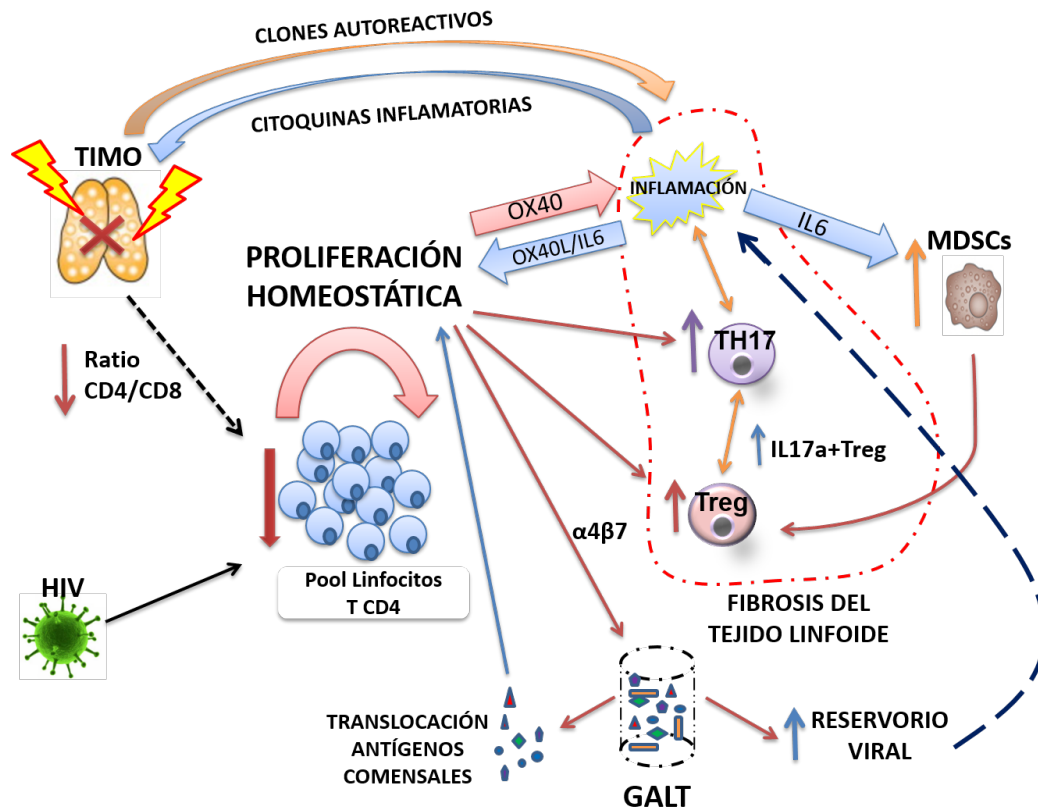
normalización del ratio CD4/CD8. Esto tiene una importancia clínica dado que el ratio CD4/CD8 se ha constituido como un importante marcador clínico de morbilidad en la infección por VIH^{31,32}, y sugiere que el timo estaría impactando no solo en la recuperación de linfocitos CD4 y normalización del ratio CD4/CD8, sino también en la clínica de estos sujetos. Esto explicaría la mayor morbilidad descrita en los ER¹⁴, los cuales tal y como hemos demostrado, presentan un menor ratio CD4/CD8 antes del TARc y una potencial menor función tímica. Sin embargo, además de la relevancia que actualmente está adquiriendo el ratio CD4/CD8 como marcador de morbilidad en el escenario de la infección por VIH^{31,32}, nuestros resultados demuestran que el ratio CD4/CD8 es también capaz de predecir aquellos sujetos que van a experimentar una posterior escasa recuperación de linfocitos CD4 durante el TARc, incluso de forma más fidedigna que el simple recuento de linfocitos CD4 y CD8 por separado. La posibilidad de identificar precozmente aquellos sujetos en riesgo de experimentar una respuesta anómala al TARc abre la posibilidad de una potencial intervención temprana para intentar mejorar su recuperación de linfocitos CD4. Quizá algunas de las intervenciones terapéuticas probadas sin éxito hasta el momento, podrían ofrecer alguna ventaja en diseños que incluyeran una intervención temprana. Desafortunadamente, actualmente no existen terapias efectivas que hayan demostrado tener un efecto beneficioso en la recuperación de linfocitos CD4 durante el TARc^{15,16}. Sin embargo, la profundización en los mecanismos implicados en la respuesta anómala al TARc abre las puertas al diseño de nuevas estrategias terapéuticas que puedan usarse de forma más exitosa en estos sujetos.

Por todo ello, es también relevante mencionar que diversos parámetros que habían sido asociados a la escasa recuperación de linfocitos CD4 por estudios previos llevados a cabo durante el TARc⁵⁰, no se encontraron significativamente alterados en ER antes del inicio del TARc. Así, parámetros celulares de la población de linfocitos CD4 como la senescencia, la activación o la frecuencia de linfocitos TemRA, y parámetros solubles como la concentración de IL7 se encontraron similarmente alterados entre ER y R antes del TARc. Sin embargo, en las muestras de seguimiento, tras 24 meses de TARc supresor, dichos parámetros inmunológicos sí se encontraron específicamente alterados en los ER, corroborando los trabajos previos llevados a cabo durante el TARc⁵⁰. Estos resultados sugieren que dichas alteraciones presentes tras el TARc, pero no antes, son probablemente consecuencia de los bajos recuentos de

linfocitos CD4 mantenidos a lo largo de tiempo por los ER más que una potencial causa de la escasa recuperación de linfocitos CD4.

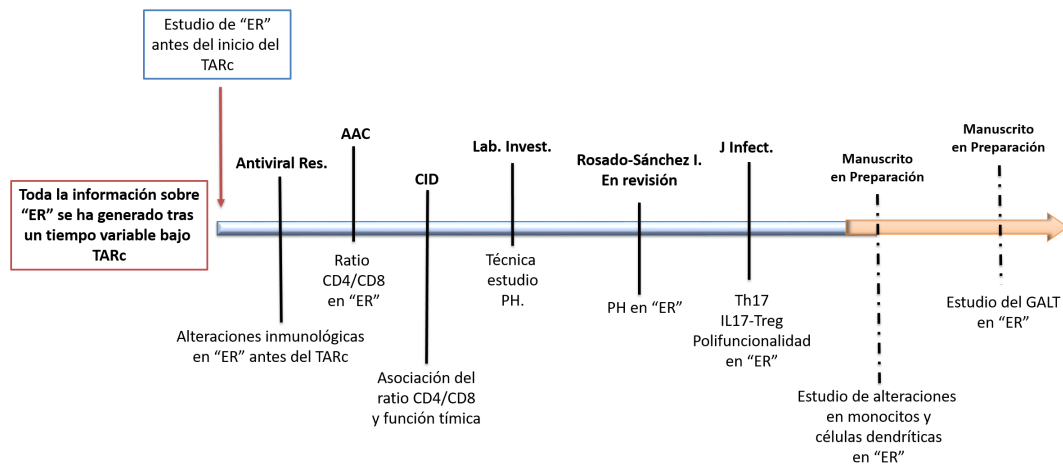
Nuestro diseño nos ha permitido estudiar mecanismos asociados a la escasa recuperación de linfocitos CD4 anticipándonos a la propia respuesta anómala al TARc, y a la vez, eludiendo un importante factor confusor como son los recuentos de linfocitos CD4. Sin embargo, nuestro diseño presenta también ciertas limitaciones. A pesar de que todos los ER y R que participan en los diversos estudios de la presente tesis doctoral eran sujetos naïves al TARc en el momento de estudio y presentaban similares recuentos de linfocitos CD4, no podemos afirmar que todos lleven el mismo tiempo de infección. De hecho se podría pensar que los ER podrían tener más tiempo de infección, y por ende, más tiempo con recuentos de linfocitos CD4 bajos que explicarían las alteraciones inmunitarias que hemos encontrado. Sin embargo, también podría ocurrir la situación opuesta, que los ER sean sujetos con alguna característica inmunoviroológica especial que desencadene una rápida progresión de la infección VIH y, por ende, una rápida e irreversible caída de los recuentos de linfocitos CD4. De hecho, apoyando esta opción, se ha observado que los rápidos progresores tienen mayor riesgo a no recuperar linfocitos CD4 a pesar de un TARc supresor⁸¹. Desafortunadamente, solo podemos especular sobre esta cuestión, ya que nuestro diseño no nos permite dilucidar dicha cuestión, y serían necesarios estudios específicos para responder a esta cuestión. Sea como fuese, esta limitación está presente en la mayoría de estudios de la infección VIH llevados a cabo en seres humanos ya que muy rara vez se conoce el momento exacto de la infección. Aun no conociendo el tiempo de infección, el estudio de los ER y R antes del inicio del TARc ha aportado información relevante sobre alteraciones inmunológicas potencialmente causantes de la escasa recuperación de linfocitos CD4 durante el TARc.

Atendiendo a los resultados anteriormente expuestos proponemos el siguiente modelo en un intento de englobar y sintetizar todo los resultados generados en la presente tesis doctoral.



MODELO: La destrucción másiva de linfocitos CD4 debida a la infección por VIH provocaría un estado linfopénico. Por otro lado una especialmente baja función tímica, la cual se reflejaría en una baja ratio CD4/CD8, provocaría la exacerbación de procesos de compensación periféricos como la proliferación homeostática (PH). A raíz de dicha exacerbación de la PH se generaría inflamación a través del eje OX40-OX40L, y dicha inflamación a su vez favorecería la exacerbación de la PH. Por otro lado la PH también provocaría el homing masivo de linfocitos CD4 a la mucosa intestinal, especialmente GALT, favoreciendo por un lado el establecimiento del reservorio viral, y por otro lado el daño de dichas estructuras y la consiguiente translocación de antígenos de microorganismos comensales que potenciarían aún más la PH. Adicionalmente, la PH generaría tanto células Th17 como células Treg, favorecida por la expansión de MDSCs, fruto de un entorno proinflamatorio. El exceso de Th17 también contribuiría a los procesos inflamatorios, lo que junto al exceso de Treg (mediante el factor profibrogénico TGFbeta producido por las mismas) favorecería la fibrosis del tejido linfoide. Finalmente, la inflamación sistémica impactaría negativamente en la función tímica, lo cual generaría aún más inflamación debido al mal funcionamiento tímico (generación de clones autoreactivos).

Para concluir, y a modo de resumen de la presente Tesis doctoral, incluimos el siguiente esquema que engloba tanto los principales hallazgos y artículos científicos generados a lo largo de la tesis, como los futuros estudios que se engloban en la presente línea de investigación.



ESQUEMA TEMPORAL DE LA PRESENTE TESIS DOCTORAL: Antes de la presente tesis doctoral, toda la información existente sobre los "ER" se había generado cuando estos sujetos llevaban un tiempo variable bajo TARc. En ese punto de estudio, los recuentos de linfocitos CD4 de "ER" constituyen un potencial sesgo, ya que estos por definición son significativamente más bajos que los de cualquier población control. Por ello nos planteamos estudiar a los "ER" antes del inicio del TARc, cuando sus niveles de linfocitos CD4 son similares a los de su población control. A raíz de este objetivo se han generado 6 artículos científicos (**línea temporal azul**) que han sido englobados en la presente tesis doctoral. Adicionalmente, se han llevado a cabo estudios adicionales que se engloban en la misma línea de trabajo, pero que están aun en preparación (**línea temporal naranja**).

CONCLUSIONES

Las conclusiones globales generadas en la presente tesis doctoral son las siguientes:

- Existen alteraciones inmunológicas específicas en los Escasos Repobladores (ER) ya antes del inicio del tratamiento antirretroviral (TARc) que anticipan la escasa recuperación de linfocitos T CD4. Todas ellas son consistentes con un determinante común: una función tímica deficiente.
- Diversas alteraciones descritas previamente en ER durante el TARc no se encontraron específicamente alteradas en ER antes del inicio del TARc, lo que sugiere que dichas alteraciones son probablemente consecuencia de los bajos recuentos de linfocitos T CD4 mantenidos a lo largo de tiempo por los ER.
- La función tímica remanente al inicio del tratamiento antirretroviral (TARc) es un factor crítico en la posterior recuperación y normalización del ratio CD4/CD8 de sujetos infectados por VIH, lo que demuestra que también factores endógenos, y no solo los exógenos (como la infección por citomegalovirus), influyen en la progresión clínica de estos individuos.
- El sistema de cultivos para el estudio de la proliferación homeostática (PH) de linfocitos T CD4 humanos desarrollado en el transcurso de la presente tesis es una herramienta útil para explorar las características específicas de la PH, no solo en la infección por VIH, sino en otras patologías humanas cursadas con linfopenia.

BIBLIOGRAFÍA

1. Cadogan M, Dalglish AG. Review HIV immunopathogenesis and strategies for intervention. *Lancet Infect Dis*; 2008;8:675–84.
2. Guihot A, Bourgarit A, Carcelain G, Autran B. Immune reconstitution after a decade of combined antiretroviral therapies for human immunodeficiency virus. *Trends Immunol*. 2011;32:131–7.
3. Piketty C, Castiel P, Belec L, Batisse D, Si MA, Gilquin J, et al. Discrepant responses to triple combination antiretroviral therapy in advanced HIV disease. *AIDS*. 1998;12:745–50.
4. Dronda F, Moreno S, Moreno A, Casado JL, Pérez-Elías MJ, Antela A. Long-term outcomes among antiretroviral-naive human immunodeficiency virus-infected patients with small increases in CD4+ cell counts after successful virologic suppression. *Clin Infect Dis*. 2002;35:1005–9.
5. Severe P, Juste M, Ambroise A, Eliacin L, Marchand C, Apollon S, et al. Early versus standard antiretroviral therapy for HIV-infected adults in Haiti. *N Engl J Med*. 2010;363:257–65.
6. Negredo E, Massanella M, Puig J, Pérez-Álvarez N, Gallego-Escuredo JM, Villarroya J, et al. Nadir CD4 T Cell Count as Predictor and High CD4 T Cell Intrinsic Apoptosis as Final Mechanism of Poor CD4 T Cell Recovery in Virologically Suppressed HIV-Infected Patients: Clinical Implications. *Clin Infect Dis*. 2010;50:1300–8.
7. Pacheco YM, Jarrín I, Del Amo J, Moreno S, Iribarren J a, Viciano P, et al. Risk factors, CD4 long-term evolution and mortality of HIV-infected patients who persistently maintain low CD4 counts, despite virological response to HAART. *Curr HIV Res*. 2009;7:612–9.
8. Engsig FN, Gerstoft J, Kronborg G, Larsen CS, Pedersen G, Roge BT, et al. Long-term mortality in HIV patients virally suppressed for more than three years with incomplete CD4 recovery: A cohort study. *BMC Infect Dis*. BioMed Central Ltd; 2010;10:318.
9. Lodi S, Dray-Spira R, Touloumi G, Braun D, Teira R, D'Aminio Monforte A, et al. Delayed HIV diagnosis and initiation of antiretroviral therapy: inequalities by educational level, COHERE in EuroCoord. *AIDS*. 2014;28:2297–306.
10. Waters L, Sabin C a. Late HIV presentation: epidemiology, clinical implications and management. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2011;9:877–89.
11. Sobrino-Vegas P, Miguel L, Caro- Murillo A, Miro J, Viciano P, Tural C, et al. Delayed Diagnosis of HIV Infection in a Multicenter Cohort: Prevalence, Risk

- Factors, Response to HAART and Impact on Mortality. *Curr HIV Res.* 2009;7:224–30.
12. Loutfy R, Genebat M, Moore D, Raboud J, Chan K, Antoniou T, et al. A CD4+ cell count <200 cells per cubic millimeter at 2 years after initiation of combination antiretroviral therapy is associated with increased mortality in HIV-infected individuals with viral suppression. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2010;55:451.
 13. Pacheco YM, Jarrin I, Rosado I, Campins A a., Berenguer J, Iribarren J a., et al. Increased risk of non-AIDS-related events in HIV subjects with persistent low CD4 counts despite cART in the CoRIS cohort. *Antiviral Res.* 2015;117:69–74.
 14. van Lelyveld SFL, Gras L, Kesselring A, Zhang S, De Wolf F, Wensing AMJ, et al. Long-term complications in patients with poor immunological recovery despite virological successful HAART in Dutch ATHENA cohort. *AIDS.* 2012;26:465–74.
 15. Wilkin TJ, Lalama CM, McKinnon J, Gandhi RT, Lin N, Landay A, et al. A pilot trial of adding maraviroc to suppressive antiretroviral therapy for suboptimal CD4+ T-cell recovery despite sustained virologic suppression: ACTG A5256. *J Infect Dis.* 2012;206:534–42.
 16. Abrams D, Levy Y, Losso M, Babiker A, Collins G, Cooper D, et al. Interleukin-2 therapy in patients with HIV infection. *N Engl J Med.* 2009;361:1548–59.
 17. Smith K, Zheng L, Bosch R, Margolis DM, Tenorio A, Napolitano L, et al. Treatment with Recombinant Growth Hormone Is Associated with Modest Improvement in CD4 Lymphocyte Reconstitution in HIV-Infected Persons on Antiretroviral Therapy: Results of ACTG A5174. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2010;26:425–32.
 18. Mavigenr M, Delobel P, Cazabat M, Dubois M, L'Faqihi-Olive FE, Raymond S, et al. HIV-1 residual viremia correlates with persistent T-cell activation in poor immunological responders to combination antiretroviral therapy. *PLoS One.* 2009;4:e7658.
 19. Delobel P, Nugeyre MT, Cazabat M, Sandres-Saune K, Pasquier C, Cuzin L, et al. Naive T-cell depletion related to infection by X4 human immunodeficiency virus type 1 in poor immunological responders to highly active antiretroviral therapy. *J Virol.* 2006;80:10229–36.
 20. Marziali M, De Santis W, Carello R, Leti W, Esposito A, Isgro A, et al. T-cell homeostasis alteration in HIV-1 infected subjects with low CD4 T-cell count despite undetectable virus load during HAART. *AIDS.* 2006;20:2033–41.
 21. Mendez-Lagares G, Garcia-Perganeda A, del Mar del Pozo-Balado M, Genebat M, Ruiz-Mateos E, Garcia Garcia M, et al. Differential alterations of the CD4 and CD8 T cell subsets in HIV-infected patients on highly active antiretroviral

- therapy with low CD4 T cell restoration. *J Antimicrob Chemother.* 2012;67:1228–37.
22. Marchetti G, Gazzola L, Trabattoni D, Bai F, Ancona G, Ferraris L, et al. Skewed T-cell maturation and function in HIV-infected patients failing CD4+ recovery upon long-term virologically suppressive HAART. *AIDS.* 2010;24:1455–60.
 23. Méndez-Lagares G, Pozo-Balado MM, Genebat M, Garcia-Perganeda A, Leal M, Pacheco YM. Severe Immune Dysregulation Affects CD4+CD25hiFoxP3+ Regulatory T Cells in HIV-Infected Patients With Low-level CD4 T-Cell Repopulation Despite Suppressive Highly Active Antiretroviral Therapy. *J Infect Dis.* 2012;205:1501–9.
 24. Marchetti G, Gori A, Casabianca A, Magnani M, Franzetti F, Clerici M, et al. Comparative analysis of T-cell turnover and homeostatic parameters in HIV-infected patients with discordant immune-virological responses to HAART. *AIDS.* 2006;20:1727–36.
 25. Massanella M, Negredo E, Pérez-Alvarez N, Puig J, Ruiz-Hernández R, Bofill M, et al. CD4 T-cell hyperactivation and susceptibility to cell death determine poor CD4 T-cell recovery during suppressive HAART. *AIDS.* 2010;24:959–68.
 26. Molina-Pinelo S, Vallejo A, Diaz L, Soriano-Sarabia N, Ferrando-Martinez S, Resino S, et al. Premature immunosenescence in HIV-infected patients on highly active antiretroviral therapy with low-level CD4 T cell repopulation. *J Antimicrob Chemother.* 2009;64:579–88.
 27. Grabmeier-Pfistershammer K, Steinberger P, Rieger A, Leitner J, Kohrgruber N. Identification of PD-1 as a unique marker for failing immune reconstitution in HIV-1-infected patients on treatment. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2011;56:118–24.
 28. Tanaskovic S, Fernandez S, French M, Price R, Song S, Robins P, et al. Thymic tissue is not evident on high-resolution computed tomography and [18F]fluoro-deoxy-glucose positron emission tomography scans of aviraemic HIV patients with poor recovery of CD4+ T cells. *AIDS.* 2011;25:1235–7.
 29. Strindhall J, Skog M, Ernerudh J, Bengner M, Löfgren S, Matussek a., et al. The inverted CD4/CD8 ratio and associated parameters in 66-year-old individuals: The Swedish HEXA immune study. *Age (Omaha).* 2013;35:985–91.
 30. Hadrup SR, Strindhall J, Kollgaard T, Seremet T, Johansson B, Pawelec G, et al. Longitudinal Studies of Clonally Expanded CD8 T Cells Reveal a Repertoire Shrinkage Predicting Mortality and an Increased Number of Dysfunctional Cytomegalovirus-Specific T Cells in the Very Elderly. *J Immunol.* 2006;176:2645–53.
 31. Serrano-Villar S, Pérez-Elías MJ, Dronda F, Casado JL, Moreno A, Royuela A, et al. Increased risk of serious non-AIDS-related events in HIV-infected subjects

- on antiretroviral therapy associated with a low CD4/CD8 ratio. *PLoS One*. 2014;9:e85798.
32. Serrano-Villar S, Sainz T, Lee S a., Hunt PW, Sinclair E, Shacklett BL, et al. HIV-Infected Individuals with Low CD4/CD8 Ratio despite Effective Antiretroviral Therapy Exhibit Altered T Cell Subsets, Heightened CD8+ T Cell Activation, and Increased Risk of Non-AIDS Morbidity and Mortality. *PLoS Pathog*. 2014;10:e1004078.
 33. Freeman ML, Mudd JC, Shive CL, Younes SA, Panigrahi S, Sieg SF, et al. CD8 T-cell expansion and inflammation linked to CMV coinfection in ART-treated HIV infection. *Clin Infect Dis*. 2016;62:392–6.
 34. Lempicki R A., Kovacs J A., Baseler MW, Adelsberger JW, Dewar RL, Natarajan V, et al. Impact of HIV-1 infection and highly active antiretroviral therapy on the kinetics of CD4+ and CD8+ T cell turnover in HIV-infected patients. *Proc Natl Acad Sci*. 2000;97:13778–83.
 35. Koch S, Larbi A, Ozcelik D, Solana R, Gouttefangeas C, Attig S, et al. Cytomegalovirus Infection: A Driving Force in Human T Cell Immunosenescence. *Ann N Y Acad Sci*. 2007;1114:23–35. A
 36. Surh CD, Sprent J. Homeostasis of Naive and Memory T Cells. *Immunity*. 2008;29:848–62.
 37. He S, Zhang Z, Fu Y, Qin C, Li S, Han X, et al. 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*. 2015;70:472–478.
 38. Franco JM, Rubio A, Martínez-Moya M, Leal M, Merchante E, Sánchez-Quijano A, et al. T-cell repopulation and thymic volume in HIV-1- infected adult patients after highly active antiretroviral therapy. *Blood*. 2002;99:3702–6.
 39. Min B, Yamane H, Hu-Li J, Paul WE. Spontaneous and Homeostatic Proliferation of CD4 T Cells Are Regulated by Different Mechanisms. *J Immunol*. 2005;174:6039–44.
 40. Do J, Foucras G, Kamada N, Schenk AF, Shaw M, Nuñez G, et al. Both exogenous commensal and endogenous self antigens stimulate T cell proliferation under lymphopenic conditions. *Cell immunol*. 2012;272:117–23.
 41. Brenchley JM, Paiardini M, Knox KS, Asher AI, Cervasi B, Asher TE, et al. Differential Th17 CD4 T-cell depletion in pathogenic and nonpathogenic lentiviral infections. *Blood*. 2008;112:2826–35.
 42. Curtis MM, Way S. Interleukin- 17 in host defence against bacterial , mycobacterial and fungal pathogens. *Immunology*. 2009;126:177–85.

43. Kinugasa T, Sakaguchi T, Gu X, Reinecker H. Claudins Regulate the Intestinal Barrier in Response to immune mediators. *Gastroenterology*. 2000;118:1001–11.
44. Kanwar B, Favre D, McCunne JM. Th17 and regulatory T cells: implications for AIDS pathogenesis. *Curr Opin HIV AIDS*. 2010;5:151–7.
45. Brenchley JM, Price D a., Schacker TW, Asher TE, Silvestri G, Rao S, et al. Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nat Med*. 2006;12:1365–71.
46. Somsouk M, Estes JD, Deleage C, Dunham RM, Albright R, Inadomi JM, et al. Gut epithelial barrier and systemic inflammation during chronic HIV infection. *AIDS*. 2015;29:43–51.
47. Marchetti G, Bellistri GM, Borghi E, Tincati C, Ferramosca S, La Francesca M, et al. Microbial translocation is associated with sustained failure in CD4 T-cell reconstitution in HIV-infected patients on long-term highly active antiretroviral therapy. *AIDS*. 2008;22:2035–8.
48. Valiathan R, Asthana D. Increase in frequencies of circulating Th-17 cells correlates with microbial translocation, immune activation and exhaustion in HIV-1 infected patients with poor CD4 T-cell reconstitution. *Immunobiology*. 2016;221:670–8.
49. Girard A, Vergnon D, Depincé-Berger A-E, Roblin X, Lutch F, Lambert C, et al. A high rate of $\beta 7^+$ gut homing lymphocytes in HIV infected Immunological Non Responders is associated with poor CD4 T cell recovery during suppressive HAART. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2016;72:259–65.
50. Pacheco YM, Rosado I, Genebat M, Leal M. Low-level CD4 restoration, a particular discordant response to antiretroviral therapy: clinical relevance and immunovirological characteristics. *AIDS Cyber J*. 2015;18:103–12.
51. Massanella M, Negredo E, Clotet B, Blanco J. Immunodiscordant responses to HAART--mechanisms and consequences. *Expert Rev Clin Immunol*. 2013;9:1135–49.
52. Caro-Murillo AM, Castilla J, Pérez-Hoyos S, Miró JM, Podzamczek D, Rubio R, et al. Cohorte RIS de pacientes con infección por VIH sin tratamiento antirretroviral previo (CoRIS): metodología y primeros resultados. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2007;25:23–31.
53. Garcia-Merino I, de las Cuevas N, Jimenez JL, Gallego J, Gomez C, Prieto C, et al. The Spanish HIV BioBank: a model of cooperative HIV research. *Retrovirology*. 2009;6:27.
54. Onyema OO, Njemini R, Forti LN, Bautmans I, Aerts JL, De Waele M, et al. Aging-associated subpopulations of human CD8⁺ T-lymphocytes identified by their CD28 and CD57 phenotypes. *Arch Gerontol Geriatr*; 2015;61:494–502.

55. Scheuring UJ, Sabzevari H, Theofilopoulos a N. Proliferative arrest and cell cycle regulation in CD8(+)CD28(-) versus CD8(+)CD28(+) T cells. *Hum Immunol.* 2002;63:1000–9.
56. Pekalski ML, Ferreira RC, Coulson RMR, Cutler AJ, Guo H, Smyth DJ, et al. Postthymic expansion in human CD4 naive T cells defined by expression of functional high-affinity IL-2 receptors. *J Immunol.* 2013;190:2554–66.
57. Kawabe T, Sun S-L, Fujita T, Yamaki S, Asao A, Takahashi T, et al. Homeostatic Proliferation of Naive CD4+ T cells in Mesenteric Lymph Nodes Generates Gut-Tropic Th17 Cells. *J Immunol.* 2013;190:5788–98.
58. Croft M. Control of Immunity by the TNFR-Related Molecule OX40 (CD134). *Annu Rev Immunol.* 2010;28:57–78.
59. Weinberg AD, Evans DE, Thalhoffer C, Shi T, Prell RA. The generation of T cell memory : a review describing the molecular and cellular events following OX40 (CD134) engagement Abstract : *J Leukoc Biol.* 2004;75:962–72.
60. Ohshima Y, Tanaka Y, Tozawa H, Takahashi Y, Maliszewski C, Delespesse G. Expression and function of OX40 ligand on human dendritic cells. *J Immunol.* 1997;159:3838–48.
61. Rose-John S, Winthrop K, Calabrese L. The role of IL-6 in host defence against infections: immunobiology and clinical implications. *Nat Rev Rheumatol.* 2017;13:399–409.
62. Shive CL, Mudd JC, Funderburg NT, Sieg SF, Kyi B, Bazdar D a., et al. Inflammatory Cytokines Drive CD4+ T-Cell Cycling and Impaired Responsiveness to Interleukin 7: Implications for Immune Failure in HIV Disease. *J Infect Dis.* 2014;210:619–29.
63. Malmström V, Shipton D, Singh B, Al-shamkhani A, Puklavec MJ, Barclay AN, et al. CD134L Expression on Dendritic Cells in the Mesenteric Lymph Nodes Drives Colitis in T Cell-Restored SCID Mice. *J Immunol.* 2011;166:6972–81.
64. Kimura A, Naka T, Kishimoto T. IL-6-dependent and -independent pathways in the development of interleukin 17-producing T helper cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104:12099–104.
65. Zhou L, Ivanov II, Spolski R, Min R, Shenderov K, Egawa T, et al. IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. *Nat Immunol.* 2007;8:967–74.
66. Singh RP, Hasan S, Sharma S, Nagra S, Yamaguchi DT, Wong DTW, et al. Th17 cells in inflammation and autoimmunity. *Autoimmun Rev.* 2014;13:1174–81.
67. Garg A, Spector S a. HIV Type 1 gp120-Induced Expansion of Myeloid Derived Suppressor Cells Is Dependent on Interleukin 6 and Suppresses Immunity. *J Infect Dis.* 2014;209:441–51.

68. Wang L, Zhao J, Ren JP, Wu XY, Morrison ZD, El Gazzar M, et al. Expansion of myeloid-derived suppressor cells promotes differentiation of regulatory T cells in HIV-1+ individuals. *Aids*. 2016;30:1521–31.
69. Curotto De Lafaille MA, Lino AC, Kutchukhidze N, Lafaille JJ. CD25- T Cells Generate CD25+Foxp3+ Regulatory T Cells by Peripheral Expansion. *J Immunol*. 2004;173:7259–68.
70. Morikawa M, Derynck R, Miyazono K. TGF- β and the TGF- β Family : Context-Dependent Roles in Cell and Tissue Physiology. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2016;8:a021873.
71. Koenen HJ, Smeets RL, Vink PM, Rijssen E Van, Boots AMH, Joosten I. Human CD25 high Foxp3 pos regulatory T cells differentiate into IL-17 – producing cells. *Blood*. 2008;112:2340–52.
72. Beriou G, Costantino CM, Ashley CW, Yang L, Kuchroo VK, Baecher-allan C, et al. IL-17 producing human peripheral regulatory T cells retain suppressive function IL-17 producing human peripheral regulatory T cells retain suppressive function. *Blood*. 2009;113:4240–50.
73. Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*. 2006;441:235–8.
74. Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, Stockinger B. TGF β in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity*. 2006;24:179–89.
75. Li L, Boussiotis V a. The role of IL-17-producing Foxp3+ CD4+ T cells in inflammatory bowel disease and colon cancer. *Clin Immunol*. 2013;148:246–53.
76. Wang T, Sun X, Zhao J, Zhang J, Zhu H, Li C, et al. Regulatory T cells in rheumatoid arthritis showed increased plasticity toward Th17 but retained suppressive function in peripheral blood. *Ann Rheum Dis*. 2015;74:1293–301.
77. Molina-Pinelo S, Vallejo a., Diaz L, Soriano-Sarabia N, Ferrando-Martinez S, Resino S, et al. Premature immunosenescence in HIV-infected patients on highly active antiretroviral therapy with low-level CD4 T cell repopulation. *J Antimicrob Chemother*. 2009;64:579–88.
78. Ferrando-Martínez S, Franco JM, Ruiz-Mateos E, Hernández A, Ordoñez A, Gutierrez E, et al. A reliable and simplified sj/ β -TREC ratio quantification method for human thymic output measurement. *J Immunol Methods*. 2010;352:111–7.
79. Gruver AL, Sempowski GD. Cytokines, leptin, and stress-induced thymic atrophy. *J Leukoc Biol*. 2008;84:915–23.

80. Coder BD, Wang H, Ruan L, Su D-M. Thymic Involution Perturbs Negative Selection Leading to Autoreactive T Cells That Induce Chronic Inflammation. *J Immunol.* 2015;194:5825–37.
81. Jarrin I, Pantazis N, Dalmau J, Phillips AN, Olson A, Mussini C, et al. Does rapid HIV disease progression prior to combination antiretroviral therapy hinder optimal CD4⁺ T-cell recovery once HIV-1 suppression is achieved?. *AIDS.* 2015;29:2323–33.

FINANCIACIÓN

Los estudios llevados a cabo en la presente tesis doctoral han sido financiados por las siguientes entidades:

- Fondo de Investigación Sanitaria [FIS; PI11/02014; PI14/01693], co-financiado por Fondos Europeos para el Desarrollo Regional (FEDER)
- Junta de Andalucía, Consejería de Economía, Innovación, Ciencia y Empleo [Proyecto de Investigación de Excelencia; CTS2593]
- Ministerio de Sanidad, Política Social e Igualdad [EC11–520]
- Fundación Progreso y Salud [PI-0081–2011]

Adicionalmente, mi contrato ha sido financiado por la Red Nacional de Investigación en SIDA [RETIC RIS] (RD12/0017/0029). Este contrato estaba vinculado al programa de Inmunopatogenia de la Red RIS, en concreto al *work package* sobre Daño Inmune y Reconstitución Inmunológica, en el que el estudio de sujetos ER constituyó un proyecto faro.

Finalmente, Yolanda María Pacheco López en calidad de directora de la presente tesis ha sido financiada por los Fondos de Investigación Sanitaria mediante los programas “Miguel Servet” [CP07/00240; CPII13/00037] y por la Consejería de Salud y Bienestar Social de la Junta de Andalucía, mediante el programa “Nicolás Monardes”[C-0010/13].

OTRAS PUBLICACIONES GENERADAS A LO LARGO DE LA TESIS

1. Herrero-Fernández I, Pacheco YM, Genebat M, Rodríguez-Méndez MM, Lozano MC, Polaino MJ, **Rosado-Sánchez I**, Tarancón-Diez L, Muñoz-Fernández MA, Ruiz-Mateos E, Leal M. Association between a suppressor combined antiretroviral therapy containing Maraviroc and the hepatitis B virus vaccine response. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017; doi: 10.1128/AAC.02050-17
2. Tarancón-Diez L, De Pablo-Bernal RS, Álvarez-Ríos AI, **Rosado-Sánchez I**, Dominguez-Molina B, Genebat M, Pacheco YM, Jiménez JL, Muñoz-Fernández MÁ, Ruiz-Mateos E, Leal M. CCR5+ CD8 T-cell levels and monocyte activation precede the onset of acute coronary syndrome in HIV-infected patients on antiretroviral therapy. *Thromb Haemost.* 2017 Jun 2;117(6):1141-1149.
3. Pozo-Balado MM, **Rosado-Sánchez I**, Méndez-Lagares G, Rodríguez-Méndez MM, Ruiz-Mateos E, Benhnia MR, Muñoz-Fernández MA, Leal M, Pacheco YM. Maraviroc contributes to the restoration of the homeostasis of regulatory T-cell subsets in antiretroviral-naive HIV-infected subjects. *Clin Microbiol Infect.* 2016 May;22(5):461.e1-5.
4. de Pablo-Bernal RS, Cañizares J, **Rosado I**, Galvá MI, Álvarez-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. 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.* 2016 May;71(5):610-8.
5. Pacheco YM, **Rosado I**, Genebat G, Leal M. Low-Level CD4 Restoration, a Particular Discordant Response To Antiretroviral Therapy: Clinical Relevance And Immunovirological Characteristics. *AIDS Cyber Journal.* 2015; 18(4): 103-112
6. Pacheco YM, Jarrin I, **Rosado I**, Campins AA, Berenguer J, Iribarren JA, Rivero M, Muñoz-Medina L, Bernal-Morell E, Gutiérrez F, Leal M; CoRIS. Increased risk of non-AIDS-related events in HIV subjects with persistent low

- CD4 counts despite cART in the CoRIS cohort. *Antiviral Res.* 2015 May;117:69-74.
7. Peraire J, Viladés C, Pacheco YM, López-Dupla M, Domingo P, Gutiérrez M, **Rosado I**, Leal M, Richart C, Vidal F. Evaluation of the pharmacogenetics of immune recovery in treated HIV-infected patients. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2014 Jan;10(1):81-101.
 8. Pozo-Balado MM, Martínez-Bonet M, **Rosado I**, Ruiz-Mateos E, Méndez-Lagares G, Rodríguez-Méndez MM, Vidal F, Muñoz-Fernández MA, Pacheco YM, Leal M. Maraviroc reduces the regulatory T-cell frequency in antiretroviral-naive HIV-infected subjects. *J Infect Dis.* 2014 Sep 15;210(6):890-8.
 9. De Pablo-Bernal RS, Ruiz-Mateos E, **Rosado I**, Dominguez-Molina B, Alvarez-Ríos AI, Carrillo-Vico A, De La Rosa R, Delgado J, Muñoz-Fernández MA, Leal M, Ferrando-Martínez S. TNF- α levels in HIV-infected patients after long-term suppressive cART persist as high as in elderly, HIV-uninfected subjects. *J Antimicrob Chemother.* 2014 Nov;69(11):3041-6.