



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Efecto del tratamiento antirretroviral en la expresión de
proteínas inmunoreguladoras en linfocitos T CD8
específicos a VIH**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A :

PERLA VIRIDIANA PÉREZ TEPOS

DIRECTOR DE TESIS:

DRA. PERLA MARIANA DEL RÍO ESTRADA

Ciudad Universitaria, CD. MX.

2021





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Hoja de Datos del Jurado

1.Datos del alumno

Pérez

Tepos

Perla Viridiana

55 6735 9852

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

311644661

2.Datos del Tutor

Dra.

Perla Mariana

Del Río

Estrada

3.Datos del sinodal 1

Dra.

Laura del Carmen

Vargas

Parada

4.Datos del sinodal 2

Dra.

Leonor

Huerta

Hernández

5.Datos del sinodal 3

Quim.

Loana Xonai

Álvarez

García

6.Datos del sinodal 4

Dr.

Ismael

Mancilla

Herrera

7. Datos del trabajo escrito

Efecto del tratamiento antirretroviral en la expresión de proteínas inmunoreguladoras en linfocitos T CD8 específicos a VIH

105p

2021

Dedicatorias

Este ha sido un camino en el que me han acompañado muchísimos seres queridos que día con día me abrazaron con su cariño, amor, comprensión, conocimiento y paciencia. No tengo palabras suficientes para agradecer todo lo que hicieron por mí.

A mi amada familia, por todo, los amo. Especialmente a mamá y a Tania, gracias por siempre apoyarme en todas y cada una de las decisiones que he tomado. Sin ustedes, claramente no habría iniciado el camino en el que me encuentro. Siempre a mi lado sin importar que.

A todos mis maestros que con su conocimiento y paciencia me guiaron en este inmenso mundo biológico y cambiaron la forma en que veo y aprecio la vida.

A la Dra. Perla del Río por ser una gran influencia en mi vida, al guiarme en este maravilloso mundo de la inmunología y la investigación.

A Loana, Ángel, Elvira y Carlos por ser excelentes maestros de los que aprendí muchísimo. Disfruté mucho el tiempo que pasé con ustedes.

A Dafne por su compañía y amistad, estoy muy feliz de haberte conocido, mis días analizando fueron muy divertidos a tu lado.

A Erick, Andy y Lalo por tantas cosas que hemos pasado juntos, tantas experiencias y aprendizajes en los que nos apoyamos. Ustedes hicieron mis días mejores con sus pláticas, risas y presencia, los quiero mucho. Erick, gracias por el apoyo y el trabajo en equipo durante el taller y las demás materias que compartimos. Andrea Montiel, gracias por todo el apoyo dentro y fuera del laboratorio, esas pláticas mientras adquiríamos fueron excelentes, aún las extraño. Lalo, siempre estaré en deuda contigo, siempre acompañándome, protegiéndome, escuchándome y enseñándome, gracias por todo.

A Itzel y Samuel por escucharme con atención, cariño y por confiar en mí.

Al Taller VIH porque sin su existencia, nada de esto sería posible.

A Luis por ayudarme de muchas formas, desde abrir un Excel hasta escuchar mis crisis existenciales durante la madrugada, me alegra haberte conocido en el CIENI.

Durante mi paso en la carrera hice muchos amigos que quiero y aprecio con todo mi ser, también les dedico esta tesis, pasamos juntos buenos momentos dentro y fuera de las aulas, gracias por hacer tan bello mi paso por la facultad.

A Ana por su amistad, como me gustaría poder regresar en el tiempo para nuevamente ir de campo contigo, son de mis recuerdos más preciados. Gracias por siempre escucharme con cariño y paciencia, eres la persona con el corazón más puro que conozco.

A Erika y Aurora por estar conmigo y siempre alegrarme con su amistad, humor, cariño y sinceridad. Su apoyo incondicional es muy preciado para mí, así como las memorias que hemos hecho juntas.

A Héctor por demostrarme con hechos que la amistad no depende de la distancia, ni del tiempo. También por motivarme a seguir en el camino de la ciencia con mucha determinación y optimismo, eres un ejemplo a seguir.

A Mario por escucharme, apoyarme, inspirarme y motivarme en este camino. Gracias por ayudarme a levantarme cuando los ánimos caían. Siempre atento, amable y cálido, tu amistad es invaluable.

A Mónica por ser mi hermiga, apoyarme y demostrarme siempre tu amor incondicional.

A Chris por tantos años de amistad en los que nos hemos visto crecer poco a poco.

A Daniela P. por siempre alegrarme con su increíble forma de ser.

A Naomi por ser una persona tan amorosa y por protegerme siempre.

A Danielita por todas las risas y pláticas interminables.

A Tillin por endulzar mi vida con su ternura.

A Kiky porque pudo acompañarme hasta el final del camino.

A todos los que amo, que sin importar el espacio y tiempo que nos separe, me han demostrado que no existe nada más grande que el amor.

Resumen

En las infecciones crónicas, las células T CD8 o CTLs aumentan la expresión en la membrana plasmática, de moléculas co-inhibidoras o proteínas inmunoreguladoras como CD160, LAG-3, PD-1, PD-L1, TIM-3 y TIGIT. La expresión de estas proteínas es característica de un fenotipo exhausto, el cual también es definido por la pérdida de producción de citocinas antivirales, la pérdida de la capacidad citotóxica y la disminución de la proliferación, provocando la respuesta disminuida y alterada de los linfocitos T CD8. Durante la infección por VIH se ha reportado el aumento de la expresión de estas proteínas inmunoreguladoras, así como de marcadores de activación, en linfocitos T CD8, lo cual ha sido asociado con la carga viral y la activación crónica del sistema inmunológico. El objetivo de este estudio fue determinar si la reducción de la carga viral y la reducción de la activación inmunológica por el uso del tratamiento antirretroviral (TAR), provoca cambios en las frecuencias y en la expresión de las múltiples proteínas inmunoreguladoras (CD160, LAG-3, PD-1, PD-L1, TIM-3 y TIGIT) en los linfocitos T CD8 específicos a VIH totales y en las subpoblaciones naive, efectora, memoria efectora y memoria central, y si existen asociaciones con la expresión de marcadores de activación. En este estudio se encontró que el TAR disminuye la expresión de las proteínas PD-1 y LAG-3 en los linfocitos T CD8 específicos a VIH totales, y en sus subpoblaciones de memoria, revirtiendo sólo parcialmente el fenotipo exhausto, ya que la expresión de otras proteínas inmunoreguladoras se mantiene aumentada a pesar del uso de TAR. Se encontraron asociaciones entre el porcentaje de células T CD8 positivas a las proteínas inmunoreguladoras y las células T CD8 positivas a los marcadores de activación. En la toma basal, únicamente se encontraron asociaciones de PD-1 y LAG-3 con marcadores de activación asociados a la señalización por TCR, mientras que después de dos años de TAR se encontraron asociaciones de TIGIT con marcadores de activación inespecífica. Estas asociaciones dan la pauta para la determinación de dos patrones de expresión de las proteínas co-inhibidoras; un patrón asociado a la activación específica por TCR del linfocito T CD8 y un patrón asociado a activación inespecífica de éstos. En conclusión, el TAR y la reducción de la carga viral, tienen un efecto benéfico en la disminución de la expresión de algunas proteínas inmunoreguladoras y la expresión de éstas no está necesariamente asociada al fenotipo exhausto, contrario a lo que se esperaba. El estudio de la expresión de las proteínas inmunoreguladoras y los marcadores de activación en las subpoblaciones de linfocitos T CD8, es importante debido a la aplicación de estos datos en inmunoterapias destinadas a la restauración de las funciones efectoras en linfocitos T CD8.

Índice

1	Introducción	11
1.1	Epidemiología del VIH en México y en el mundo	11
1.2	Virus de la Inmunodeficiencia Humana	13
1.3	Ciclo de replicación del VIH	17
1.4	Historia natural de la infección por VIH	21
1.5	Respuesta inmunológica innata contra el VIH	27
1.6	Respuesta inmunológica adaptativa contra el VIH	29
1.7	Modulación de la respuesta inmunológica	31
2	Antecedentes	40
2.1	Expresión de proteínas inmunoreguladoras, efectos y consecuencias en linfocitos T CD8 durante la infección por VIH	40
3	Hipótesis	46
4	Objetivos	47
4.1	Objetivo general	47
4.2	Objetivos específicos	47
5	Metodología	48
5.1	Muestras del estudio	48
5.2	Determinación de marcadores de inhibición inmunológica	49
5.3	Determinación de marcadores de activación inmunológica	51
5.4	Análisis de citometría de flujo	51
5.5	Análisis estadísticos	53
6	Resultados	54
6.1	Subpoblaciones de células T CD8 antes del tratamiento antirretroviral (TAR)	54
6.2	Porcentaje de células T CD8 positivas a proteínas inmunoreguladoras antes del TAR	55
6.3	El porcentaje de células T CD8 positivas a proteínas inmunoreguladoras no se asocia con el número de células T CD4 antes de empezar el TAR	58
6.4	Cambios en el porcentaje de células T CD8 positivas a las proteínas inmunoreguladoras posterior al uso de TAR	59
6.5	Respuesta específica a VIH antes y después del TAR	63

6.6	Expresión de las proteínas inmunoreguladoras en células específicas a VIH después del uso del TAR	66
6.7	Activación por TCR en linfocitos T CD8 antes y durante el TAR, análisis de la expresión de CD69.....	71
6.8	Marcadores de activación en células T CD8 antes y durante el TAR, análisis de la expresión de HLA-DR y CD38.....	72
6.9	Marcador de proliferación celular en linfocitos T CD8 antes y durante el TAR, análisis de la expresión de Ki67.....	74
6.10	Asociación entre proteínas inmunoreguladoras y proteínas asociadas a activación en linfocitos T CD8, antes y después del TAR	75
7	Discusión.....	78
8	Conclusiones	93
9	Agradecimientos.....	94
10	Referencias	94

Índice de figuras

Figura 1. Estructura del virión del VIH.....	14
Figura 2. Genoma y transcritos del VIH.....	15
Figura 3. Ciclo de replicación del VIH.....	21
Figura 4. Historia natural de la infección por VIH.	25
Figura 5. Modelo de tres señales para la activación del linfocito T.....	32
Figura 6. Ejemplo representativo de la estrategia de análisis de datos de citometría de flujo de linfocitos T CD8.....	53
Figura 7. Subpoblaciones de células T CD8 antes del TAR.....	55
Figura 8. Porcentaje de células positivas a las proteínas inmunoreguladoras en las subpoblaciones de células T CD8 antes del TAR.....	57
Figura 9. Porcentaje de células T CD8 totales positivas a proteínas inmunoreguladoras después de 2 años de TAR..	60
Figura 10. Porcentaje células PD-1+ en las subpoblaciones de células T CD8 después de 2 años de TAR.....	62
Figura 11. Porcentaje de células IFN γ + en las subpoblaciones de células T CD8 antes del TAR	64
Figura 12. Porcentaje de células IFN γ + en las subpoblaciones de células T CD8 después de 2 años de TAR.....	65
Figura 13. Expresión de LAG-3 en las subpoblaciones de células T CD8 específicas a VIH, después de 2 años de TAR	69
Figura 14. Expresión de PD-1+ en las subpoblaciones de células T CD8 específicas a VIH, después de 2 años de TAR	70
Figura 15. Porcentaje células CD69+ en las subpoblaciones de células T CD8 después de 2 años de TAR.....	72
Figura 16. Porcentaje células HLA-DR+ CD38+ en las subpoblaciones de células T CD8, después de 2 años de TAR.....	74
Figura 17. Asociación entre proteínas inmunoreguladoras y marcadores asociados a activación en la toma basal	77
Figura 18. Asociación entre el porcentaje de células TIGIT+ con las células CD69+ en linfocitos T CD8 después del TAR..	78

Índice de tablas

Tabla 1. Características de la cohorte de estudio antes del uso del tratamiento antirretroviral (TAR).....	49
Tabla 2. Comparación del porcentajes de células positivas a las proteínas inmunoreguladoras en linfocitos T CD8 totales y sus subpoblaciones, entre los grupos <350 y >350 células T CD4	58
Tabla 3. Comparación del porcentaje de células positivas a proteínas inmunoreguladoras en linfocitos T CD8 y sus subpoblaciones, entre los grupos <350 y >350 células T CD4 después de dos años con TAR.	61
Tabla 4. Comparación de la expresión de las proteínas inmunoreguladoras en células T CD8 específicas a VIH (IFN γ +) y sus subpoblaciones entre los grupos <350 y >350 células T CD4, después de dos años de TAR.	67

Índice de abreviaturas

VIH: Virus de la inmunodeficiencia humana

VIS: Virus de la inmunodeficiencia en simios

SIDA: Síndrome de inmunodeficiencia adquirida

VIH+: Individuos con infección por VIH

VIH-: Individuos sin infección por VIH

TAR: Tratamiento antirretroviral

CMSP: Células mononucleares de sangre periférica

MFI: Intensidad mediana de fluorescencia

TE: Células T efectoras

ME: Células T de memoria efectora

MC: Células T de memoria central

1 Introducción

1.1 Epidemiología del VIH en México y en el mundo

La infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) es un problema de salud a nivel mundial, que desde el primer caso reconocido en 1981 (Warner, 2007), ha provocado la muerte de millones de personas alrededor del mundo. En el 2020 se reportó que a nivel mundial aproximadamente 38 millones de personas viven con VIH (ONUSIDA 2020), se han confirmado 75.7 millones de personas infectadas, mientras que desde el inicio de la epidemia, 32.7 millones de personas fallecieron por enfermedades oportunistas relacionadas con el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) (ONUSIDA 2020).

En México, en el 2019 se estimó que 270 mil personas vivían con VIH, de las cuales 12 mil fueron nuevas infecciones. La prevalencia es de 0.26 casos, es decir 3 casos nuevos por cada mil habitantes, y se estima que cada día 33 personas adquieren el virus (CENSIDA 2020).

El VIH es el agente etiológico del SIDA (Warner 2007), que es la última etapa de la infección por el VIH en la cual, de no ser atendida oportunamente, puede llevar a la muerte de las personas debido a infecciones y otras co-morbilidades (Warner 2007; O’Cofaigh y Lewthwaite 2013). La tuberculosis es la principal causa de muerte relacionada a SIDA a nivel mundial (CENSIDA 2020).

Desde la expansión del uso del tratamiento antirretroviral (TAR) la sobrevivencia de las personas que viven con el virus ha aumentado (Fettig et al. 2014). Se estima que con el incremento de acceso al tratamiento, de

1995 a 2010 se han evitado 5.2 millones de muertes relacionadas al SIDA, en países de desarrollo bajo y de desarrollo medio (Fettig et al. 2014). El TAR, disminuye el riesgo de transmisión hasta un 96% (CENSIDA 2018).

En 2019 se estimó que 67% de las personas que viven con VIH en el mundo tenían acceso al TAR (ONUSIDA 2020). En México desde el 2003, el acceso al TAR es gratuito (CENSIDA 2020). En junio de 2020, 180,800 personas se encontraban en tratamiento, significando un aumento del 9% respecto al año anterior. Gracias al TAR, durante el 2019, el 56% de las personas que viven con VIH en México, presentaron supresión viral (CENSIDA 2020).

La infección por VIH se originó debido a la múltiple transmisión zoonótica entre primates no humanos, infectados con el virus de la inmunodeficiencia en simios (VIS) y humanos en África Occidental y Central (Hamelaar, 2012). Debido a que las infecciones fueron independientes se generaron dos tipos de VIH, VIH-1 y VIH-2 (Hamelaar, 2012). El VIH-1 está más relacionado filogenéticamente con el SIV de los chimpancés (SIV_{CPZ}), mientras que VIH-2 se originó a partir del SIV_{SM}, el cuál infecta mangabís grises (Lemey et al. 2003). El VIH-2 y sus grupos (A-H) se encuentran restringidos al Oeste de África, mientras que el VIH-1 se encuentra globalmente extendido (Hamelaar, 2012). De este último hay cuatro grupos M, N, O y P; el grupo M se diversificó genéticamente en nueve subtipos, A-D, F-H y J-K (Hamelaar, 2012). Los subtipos B y C son los más representativos a nivel mundial. El subtipo C es el agente etiológico de aproximadamente el 48% de las infecciones a nivel mundial, pero se restringe al sureste de África (Hamelaar, 2012). El subtipo B es el más distribuido geográficamente en el mundo, principalmente en América, Europa y Australia

(Hamelaar, 2012), siendo el virus circulante predominante en México (Avila-Ríos et al. 2011).

1.2 Virus de la Inmunodeficiencia Humana

El VIH es un retrovirus del género *Lentivirus* (Cochrane, 2011; Turner y Summers, 1999) caracterizado por la progresión lenta de la enfermedad (Cochrane 2011). Los retrovirus son virus de RNA capaces de convertir su material genético en DNA mediante el proceso conocido como retrotranscripción. Una vez transformado el genoma viral es transportado al núcleo e integrado en el genoma de la célula hospedera (Mitchell et al., 2004; Smith y Daniel, 2006).

La estructura madura del virión de VIH es similar a la de los demás *Lentivirus* (Turner y Summers 1999; Cochrane 2011), tiene un tamaño aproximado de 100nm de diámetro (Comité Consultivo Alemán de Sangre (Arbeitskreis Blut), Subgrupo 'Evaluación de Patógenos 2016), posee una capa lipídica la cual obtiene de la membrana de la célula hospedera. Sobre esta membrana existe una coraza de espículas de la proteína env, compuesta por trímeros de las glicoproteínas gp120 (SU) y de gp41 (TM) que permiten al virión unirse a los receptores y correceptores en la célula blanco. Por debajo de la membrana se encuentra una matriz de proteínas virales (p17, MA) que da estructura al virus y rodea a la cápside cónica compuesta por polímeros de la proteína p24 (CA). La cápside guarda en su interior dos copias del genoma viral de RNA con polaridad positiva, el cual está protegido por proteínas llamadas nucleocápside (p7, NC). Dentro de la cápside también se encuentran tres enzimas esenciales, la proteasa (p14, PR), la retrotranscriptasa (p66/51, RT) y la integrasa (p32,

IN), así como las proteínas accesorias Nef (p27), Vif (p23), Vpr (p15) y LI (p6; Figura 1) (Córdoba, Ponce de León, y Valdespino 2009; Peterlin y Trono 2003; Freed 2015; Cochrane 2011; Comité Consultivo Alemán de Sangre (Arbeitskreis Blut), Subgrupo 'Evaluación de Patógenos 2016; Turner y Summers 1999).

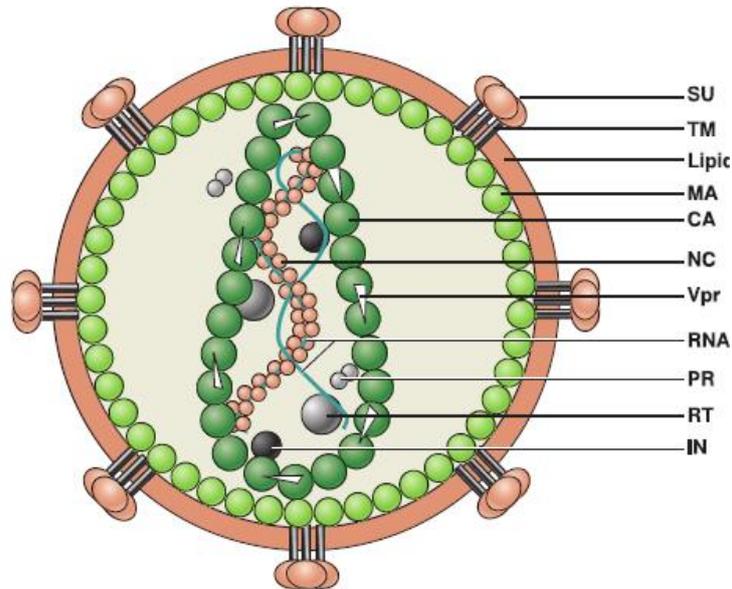


Figura 1. Estructura del virión del VIH. El VIH es un virus envuelto de RNA con un diámetro aproximado de 100 nm, el cual se compone de proteínas estructurales, enzimas virales y proteínas accesorias. SU: superficie, TM: transmembranal, Lipic: Capa lipídica, MA: matriz, CA: cápside, NC: nucleocápside, Vpr: proteína viral R, PR: proteasa, RT: restrotranscriptasa, IN: integrasa. Tomado de Cochrane, 2011.

El genoma del VIH tiene una longitud de 9.8kb y su organización es similar a la de otros lentivirus los cuales poseen los genes gag, pol y env; las proteínas derivadas de éstos son estructurales y enzimáticas. A partir de gag se obtienen las proteínas CA, MA, NC y LI, del gen pol las enzimas PR, RT e IN, por último a partir del gen env se producen las proteínas SU y TM. Mediante corte y empalme alternativo, el VIH puede generar proteínas reguladoras (Tat, Rev) y accesorias (Nef, Vpr, Vif y Vpu). El genoma del virus codifica un total de 16

proteínas (Cochrane 2011; Kuiken et al. 2008; Peterlin y Trono 2003; Comité Consultivo Alemán de Sangre (Arbeitskreis Blut), Subgrupo 'Evaluación de Patógenos 2016). A diferencia de otros lentivirus que producen mRNAs sin corte y empalme o con un sólo corte y empalme, el VIH es capaz de producir tres tipos diferentes de transcritos: los mRNA sin corte y empalme de 9 kb de longitud que producen las proteínas estructurales de gag-pol; mRNA de un sólo corte y empalme de 4kb de longitud que codifica para Vif, Vpr, Vpu o env; y los mRNAs con doble corte y empalme de 2kb de longitud que codifican para las proteínas Tat, Rev o Nef (Figura 2) (Peterlin y Trono 2003).

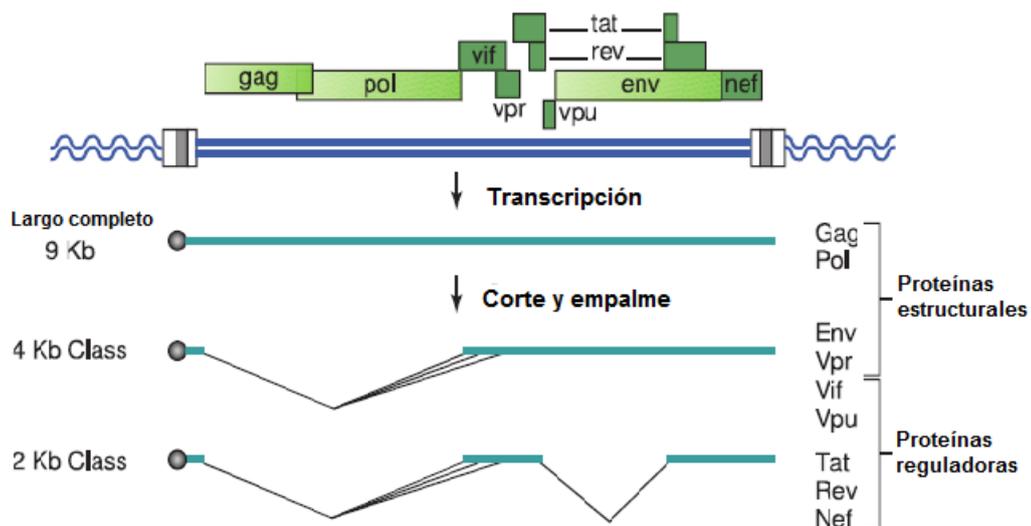


Figura 2. Genoma y transcritos del VIH. El VIH posee un genoma de 9.8 kb con 9 genes que codifican para dieciséis proteínas. A partir del genoma se pueden obtener tres tipos de transcritos de 9 kb, 4 kb y 2 kb. Modificado de Cochrane, 2011.

Las proteínas reguladoras y accesorias permiten que el ciclo de replicación del virus se lleve a cabo de manera eficiente. Tat, proteína reguladora, es el transactivador de la expresión de los genes del VIH. Se une al elemento TAR (secuencia de blanco de la transactivación viral, elemento de RNA), en el genoma viral, permitiendo la iniciación de la transcripción y elongación a partir

del promotor en el LTR (secuencias terminales repetidas que flanquean el genoma de los provirus), evitando la terminación de la transcripción. Rev, la segunda molécula reguladora, de 19 kDa, es una fosfoproteína que se une a RRE (elemento responsivo de Rev, elemento de RNA en la región de env) permitiendo el splicing, estabilización y el transporte de los mRNAs virales fuera del núcleo (Córdoba, Ponce de León, y Valdespino 2009; Peterlin y Trono 2003; Freed 2015; Cochrane 2011; Comité Consultivo Alemán de Sangre (Arbeitskreis Blut), Subgrupo 'Evaluación de Patógenos 2016; Turner y Summers 1999).

La proteína accesoria Vif, factor de infectividad viral, de 23 kDa, evita que el factor de restricción APOBEC-3G, desamine el DNA o RNA del virus. La desaminación provoca la hipermutación del virus y restricción del ciclo de replicación viral. Vpr, la proteína viral R, de 14 kDa, forma parte del complejo de retrotranscripción, permite el transporte del complejo de preintegración al núcleo celular y para el ciclo celular en la fase G2. Además, esta proteína puede unirse a la enzima UNG2, que debido a su función de remoción de grupos uracilo del DNA, puede provocar mutaciones en el genoma viral. Vpu, la proteína viral U, de 16 kDa, exclusiva del VIH-1, degrada CD4 vía proteosomal mediada por ubiquitinación y aumenta la liberación de nuevos viriones de la membrana de células infectadas. Nef, proteína efectora negativa, de 27 kDa, es la más inmunogénica de todas las proteínas accesorias, modula el tráfico de proteínas virales, disminuye la expresión de CD4 promoviendo su degradación lisosomal y también la de moléculas de MHC-1 (excepto HLA-C y HLA-E). De esta forma evita el reconocimiento de la célula infectada por los linfocitos T CD8 y las células NK. Además esta proteína, interactúa con motivos SH-3 en

cinastas Scr que se encuentran en la cascada de señalización del TCR, promoviendo la activación de los linfocitos (Córdoba, Ponce de León, y Valdespino 2009; Kuiken et al. 2008; Freed 2015; Cochrane 2011; Turner y Summers 1999).

1.3 Ciclo de replicación del VIH

El receptor del VIH es la proteína CD4 la cual se expresa en linfocitos T, macrófagos, monocitos y células dendríticas. Los correceptores principales, *in vivo*, son CCR5 y CXCR4, los cuales son receptores de quimiocinas (Cochrane 2011; Peterlin y Trono 2003; Deeks et al. 2015; Wilen, Tilton, y Doms 2012). En función de la variante viral, el virus puede tener tropismo a otros receptores como CCR2, CX3CR1 y CXCR6. El tropismo viral depende de las variaciones estructurales en la proteína gp120 (Wilen, Tilton, y Doms 2012; Santa-Marta et al. 2013).

Los correceptores CCR5 y CXCR4 se expresan de manera diferencial entre las estirpes celulares del sistema inmunológico, así como en sus subpoblaciones (Simon y Ho 2003; Deeks et al. 2015; Wilen, Tilton, y Doms 2012). Ambos correceptores pertenecen a la super familia de receptores acoplados a proteínas G. CCR5, se expresa principalmente en linfocitos T CD4 de memoria, en células activadas, monocitos y macrófagos (Wilen, Tilton, y Doms 2012; Deeks et al. 2015). CXCR4, se expresa principalmente en linfocitos T CD4 naive y en monocitos, pero no en macrófagos (Wilen, Tilton, y Doms 2012). Algunos virus pueden usar uno o ambos correceptores de entrada (CCR5, CXCR4 o CCR5-CXCR4) y se les denomina virus con tropismo R5, X4 y R5X4 respectivamente (Wilen, Tilton, y Doms 2012; Deeks et al. 2015; Peterlin y

Trono 2003). Durante la fase inicial de la infección o fase aguda, los virus son principalmente R5, al llegar a etapas más avanzadas de la infección los virus predominantes son X4 (Deeks et al. 2015; Peterlin y Trono 2003; Simon y Ho 2003).

El primer paso en el ciclo de replicación del VIH es la adhesión de los viriones a la célula huésped y fusión de la membrana viral con la membrana celular, como resultado de este paso se libera la cápside en el citoplasma (Wilén, Tilton, y Doms, 2012). La adhesión de los viriones a las células blanco es mediante la interacción entre las proteínas env y proteínas en la membrana celular, por ejemplo, proteoglicanos heparán sulfato y la integrina $\alpha 4\beta 7$. En el caso específico de las células dendríticas, la molécula de adhesión lectina DC-SIGN interacciona con los glúcidos virales, esto permiten aproximar al virión al receptor y los correceptores, incrementando la eficiencia de la infección (Wilén, Tilton, y Doms, 2012).

Posteriormente, el virión se une al receptor CD4 mediante interacciones de los trímeros de gp120 y gp41 (Deeks et al. 2015; Wilén, Tilton, y Doms 2012). Gp120 interactúa mediante el sitio de unión a CD4 (CD4bs) con el receptor, esto causa cambios conformacionales en gp120, permitiendo que su loop V3, se una al correceptor. Esto expone los péptidos de fusión de gp41 los cuales se insertan en la membrana de la célula huésped, forzando a las membranas a aproximarse y fusionarse (Wilén, Tilton, y Doms 2012).

Una vez que las membranas se fusionan la cápside es liberada en el citoplasma de la célula infectada. De forma simultánea, se inicia la retrotranscripción y la descapsidación. La cápside protege el genoma viral de

factores celulares que podrían degradarlo o causar mutaciones. La descapsidación es un proceso gradual y dinámico que permite la retrotranscripción y la llegada del complejo de preintegración (PIC) a los poros nucleares. El transporte de los elementos virales al núcleo es llevado a cabo por los microtúbulos y las proteínas kinesinas y dineínas (Campbell y Hope 2015).

La retrotranscripción es el proceso mediante el cual la enzima retrotranscriptasa sintetiza DNA a partir de cadenas de RNA. Esta enzima, además posee la actividad de RNAasa H la cual degrada duples de DNA-RNA. Para que se lleve a cabo el proceso de retrotranscripción es necesaria la formación del complejo de retrotranscripción (RTC), este se compone de las proteínas virales CA, MA, NC, IN y Vpr. El RTC provee de transporte nuclear, actividad chaperona y protección de enzimas celulares al genoma viral. Una vez terminada la síntesis del DNA viral, el RTC es llamado complejo de preintegración (PIC) (Hu y Hughes, 2012; Deeks et al., 2015).

El PIC, interacciona con las nucleoporinas para poder entrar en el núcleo celular. Posteriormente se lleva a cabo la integración del genoma viral en el DNA celular. La integración la cataliza la proteína IN, esta enzima realiza un ataque nucleofílico, generando la ruptura en el DNA celular dónde se integra el genoma viral. Los sitios de integración se caracterizan por tener alta densidad génica y transcripción activa (Ciuffi 2016).

La transcripción y generación de productos génicos virales, ocurre posterior a la unión de maquinaria de transcripción en los LTRs. Las proteínas reguladoras Tat y Rev juegan un papel importante en la transcripción, corte y empalme, y

transporte de mRNAs virales como se mencionó anteriormente (Karn y Stoltzfus 2012).

El siguiente paso en el ciclo de replicación viral es la traducción de los mRNAs virales. Las poliproteínas gag y gag-pol son sintetizadas en el citoplasma, mientras que las proteínas env son sintetizadas mediante la vía secretora. Las poliproteínas virales son transportadas a balsas lipídicas en la membrana celular donde comienzan a multimerizarse. El genoma viral de RNA es reclutado por la proteína gag. Una vez juntos los componentes virales, algunas proteínas celulares permiten la gemación y liberación del virión (Freed 2015).

Por último, para la maduración de los viriones, la proteasa se encarga de la escisión de las poliproteínas virales permitiendo la reorganización de la estructura proteica y la generación de un virión infeccioso (Freed 2015) (Figura 3).

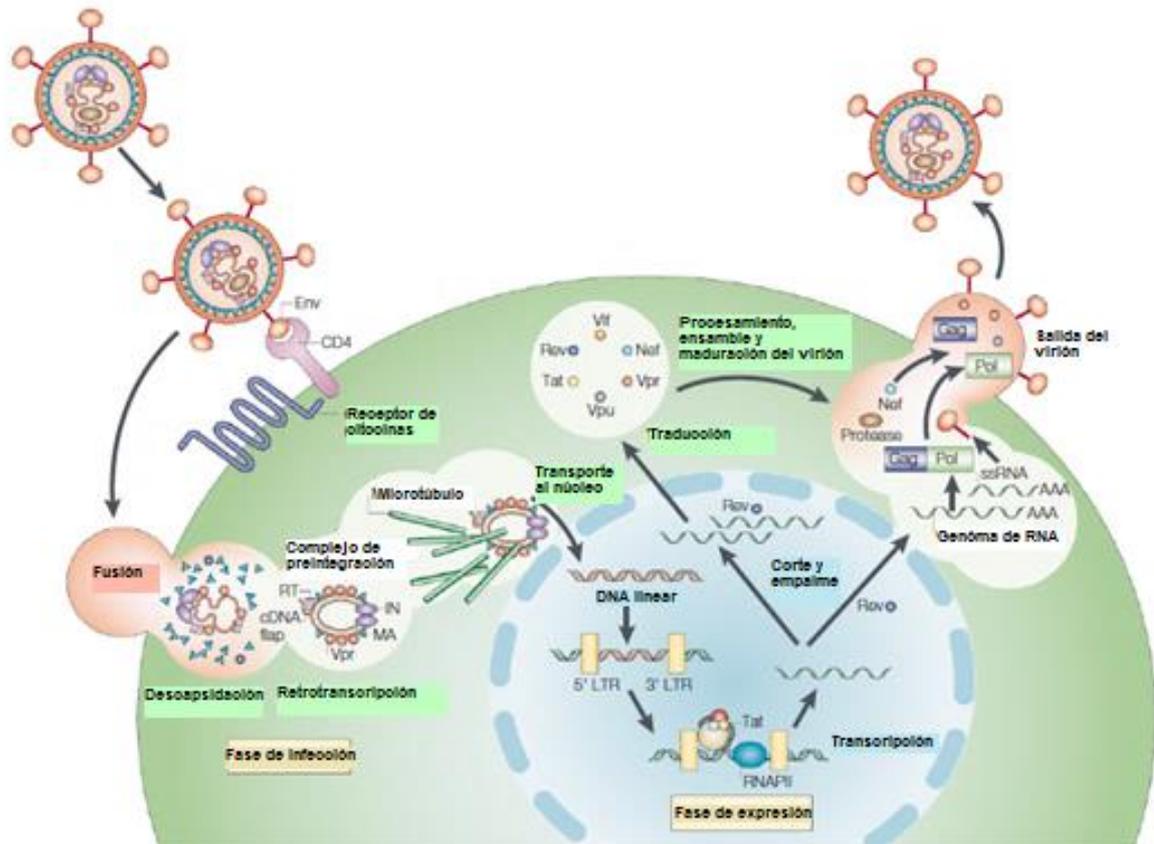


Figura 3. Ciclo de replicación del VIH. El VIH a través de sus proteínas de membrana y superficie se une al receptor CD4 y al correceptor CXCR4 o CCR5 presentes en la membrana de la célula huésped, esta interacción permite la fusión de la membrana del virión con la membrana celular. Posteriormente, en el citoplasma se lleva a cabo el proceso de descapsidación, formación del complejo de preintegración (PIC) y la retrotranscripción. El PIC es transportado hacia el núcleo celular, donde se lleva a cabo la integración del genoma viral en el genoma de la célula huésped. A partir del genoma viral integrado o provirus, se genera los transcritos virales, los cuales serán traducidos en las proteínas estructurales, enzimas virales, proteínas accesorias y reguladoras, las cuales permiten que se lleva a cabo de forma eficaz el ciclo de replicación del VIH. Los viriones se ensamblan en el citoplasma y son liberados por gemación. Por último, las proteínas estructurales son procesadas por la proteasa viral, para la formación de un virión maduro. Modificado de Peterlin y Trono, 2003.

1.4 Historia natural de la infección por VIH

La historia natural del VIH en una persona sin tratamiento antirretroviral se divide en tres fases principales; fase aguda, fase crónica y fase de SIDA

(O’Cofaigh y Lewthwaite 2013; Deeks et al. 2015; McMichael et al. 2010). A continuación se describen las características de cada una de ellas

Fase aguda.

La transmisión del virus es el primer evento en la historia natural de la infección. El virus es capaz de transmitirse por contacto sexual, contacto directo con mucosas, contacto con objetos punzocortantes contaminados, transfusión sanguínea y transmisión de madre a hijo durante el embarazo, parto o lactancia (Deeks et al. 2015; McMichael et al. 2010).

Posterior a la transmisión, hay un periodo llamado fase eclipse con duración aproximada de 10 días. En este periodo el RNA viral no es detectable en plasma y las células infectadas llegan a órganos linfoides, dónde se encuentran las células blanco: linfocitos T CD4 CCR5+ activados (McMichael et al. 2010).

Al terminar la fase eclipse hay un pico en la viremia provocado por la alta tasa de replicación viral. Sólo el 20% de los linfocitos T CD4 de los tejidos linfoides asociados a mucosas (GALT) son infectados, sin embargo, el porcentaje restante muere debido a la activación e inflamación resultante (Dotish y Greene 2016). El pico en la carga viral en plasma, aproximadamente un millón de copias de RNA viral por ml de sangre, ocurre a los 21-28 días posteriores al evento de transmisión, en esta etapa se establece el reservorio y las personas presentan síntomas como fiebre, linfadenopatía generalizada, prurito y mialgia (Deeks et al. 2015; McMichael et al. 2010). El conteo promedio de linfocitos T CD4 de una persona VIH negativa en sangre es de 1200 células/ μ L; en una persona con VIH en fase aguda pueden disminuir por debajo de 200 células/ μ L (O’Cofaigh y Lewthwaite 2013).

Posteriormente, alrededor de la semana 12-20 de la infección, la carga viral en sangre disminuye lentamente hasta alcanzar un nivel estable conocido como “set point” de la carga viral. Durante el “set point” se seleccionan mutaciones de escape producto de la presión de selección de la inmunidad adaptativa. La cantidad de linfocitos T CD4 aumenta en sangre hasta 350-800 células/ μ l pero nunca se reestablecen los niveles basales. En el GALT los linfocitos T CD4 tampoco se reestablecen a niveles basales (Langford, Ananworachinich, y Cooper 2007; Deeks et al. 2015; O’Cofaigh y Lewthwaite 2013).

Las manifestaciones clínicas de esta etapa se deben a la respuesta inmunológica aguda, a la activación crónica del sistema inmunológico y a la carga viral alta. Algunas personas presentan síntomas como fiebre, linfadenopatía, faringitis, sarpullido, mialgia, diarrea y dolor de cabeza. Los síntomas aparecen entre la primera y sexta semana y llegan a tener hasta un mes de duración (Langford, Ananworachinich, y Cooper 2007).

Fase crónica

Posterior al establecimiento de “set point” comienza la fase crónica en la cual los niveles de replicación del virus se mantienen estables debido al equilibrio entre ésta y la respuesta inmunológica. La cantidad de células T CD4 se reestablece parcialmente, pero éstas se pierden poco a poco hasta llegar a la fase de SIDA, consecuencia de la activación e inflamación generalizada que caracteriza a la infección por VIH (Deeks et al. 2015; O’Cofaigh y Lewthwaite 2013). De acuerdo al tiempo de progresión, ésta puede ser calificada de tres formas: progresión rápida, progresión intermedia y progresión lenta o no progresión. La mayoría de la gente que vive con VIH (70-80%) es clasificada

con progresión intermedia, es decir, de no tomar tratamiento antirretroviral la fase crónica antes de SIDA puede durar entre 6 y 10 años. Del 10% al 15% de las personas que viven con VIH son progresores rápidos, llegando a SIDA en 6 a 12 meses. Por último los no progresores sólo representan el 5% de los casos y pueden permanecer con conteos de linfocitos de T CD4 y baja carga viral por más de 10 años (Langford, Ananworachinich, y Cooper 2007).

La fase crónica puede ser completamente asintomática o presentar linfadenopatía generalizada persistente (O’Cofaigh y Lewthwaite 2013).

Fase de SIDA

Con la pérdida progresiva de células T CD4 y aumento de la carga viral se incrementa el riesgo y susceptibilidad de padecer enfermedades infecciosas oportunistas. Cuando el conteo de linfocitos T CD4 disminuyen por debajo de 350 células/ μ l aumenta el riesgo de progresar a SIDA. Algunas de la infecciones y morbilidades indicadoras de la progresión son tuberculosis, anemia, trombocitopenia, pérdida repentina de peso, problemas gastrointestinales y cutáneos (Deeks et al. 2015; O’Cofaigh y Lewthwaite 2013).

Una vez que la carga viral es elevada y el conteo de células T CD4 disminuye por debajo de 200 células/ μ l se determina que la persona está en la etapa de SIDA. Enfermedades oportunistas como neumonía por *Pneumocystis sp*, toxoplasmosis cerebral, herpes mucocutáneo, reactivación de infecciones latentes de citomegalovirus (CMV) y demencia pueden presentarse. La mayoría de las muertes asociadas al SIDA son causadas por *Mycobacterium tuberculosis* (Figura 4) (O’Cofaigh y Lewthwaite 2013).

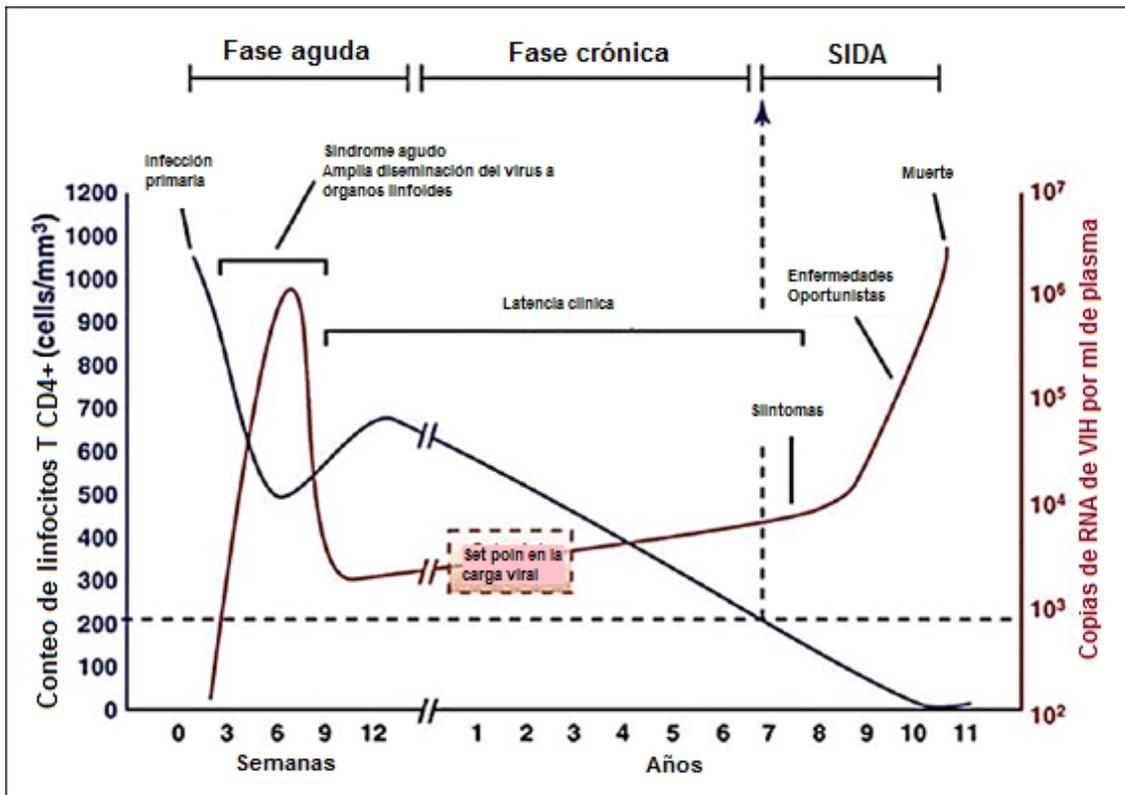


Figura 4. Historia natural de la infección por VIH. Durante la fase aguda se presentan síntomas clínicos asociados al síndrome agudo retroviral. Posteriormente, durante la fase crónica se alcanza un equilibrio entre la carga viral y la respuesta inmunológica, llamado "set point" viral. La fase crónica se caracteriza por generalmente no presentar síntomas clínicos. Por último, durante la fase de SIDA se observa una pérdida drástica de linfocitos T CD4 y un aumento de la carga viral, en esta fase se presentan infecciones oportunistas que ponen en riesgo a la vida de los individuos. Modificado de Munawwar y Singh, 2016.

Historia natural de la infección durante el TAR

El conocimiento del ciclo de replicación del VIH permitió el desarrollo de fármacos capaces de detener o disminuir la velocidad del ciclo de replicación viral. Estos fármacos actúan en diferentes puntos del ciclo de replicación; en la entrada del virus, la retrotranscripción, la integración y la salida del virión. Debido a la alta tasa de replicación viral (con una mutación cada 1,000-10,000 nucleótidos), las mutaciones de escape que impiden la acción de los

antirretrovirales, por lo que se crean constantemente alternativas terapéuticas (Arts y Hazuda 2012; Pau y George 2014).

La combinación de tres antirretrovirales dirigidos a inhibir por lo menos dos etapas del ciclo de replicación produce una reducción drástica en la carga viral hasta por debajo de los niveles de detección de los ensayos clínicos (menos de 40 copias de RNA/mL). Esto permite la reconstitución del sistema inmunológico y el aumento de linfocitos T CD4 en circulación en la gran mayoría de las personas (Arts y Hazuda 2012; Pau y George 2014).

A pesar del uso prolongado del TAR hay poblaciones celulares y sitios anatómicos donde se mantiene una replicación viral residual, es decir, el reservorio viral. Si el tratamiento es interrumpido hay un incremento rápido de la carga viral por lo que es necesario el uso de la terapia de forma permanente (Eisele y Siliciano 2012).

En conclusión, el uso adecuado del TAR suprime la carga viral a niveles indetectables, mejora el funcionamiento del sistema inmunológico, incrementa la cantidad de células T CD4, prolonga la sobrevivencia de los individuos, reduce las morbilidades asociadas a VIH, mejora la calidad de vida de los individuos y reduce el riesgo de transmisión del virus, pero no lo elimina del cuerpo (Pau y George 2014).

1.5 Respuesta inmunológica innata contra el VIH

Durante la infección aguda, la replicación viral, la muerte exacerbada de células T CD4 y la translocación bacteriana (resultado del daño en el GALT), provocan una tormenta de citocinas. IL-15, CXCL10 e interferones de tipo 1, aumentan de forma drástica únicamente durante la respuesta aguda. Sin embargo, IL-18, TNF α , IFN γ e IL-22 aumentan y se mantienen constantes en plasma durante toda la infección (Dotish y Greene 2016). La fuente de producción de estas citocinas son células dendríticas, monocitos, macrófagos, células NK, células NKT, células T y células B (Dotish y Greene 2016; McMichael et al. 2010; Espíndola et al. 2016).

Aunque tanto monocitos como macrófagos pueden ser blanco del VIH, menos del 1% de estas células son infectadas pero se cree que contribuyen a la viremia durante la fase de SIDA, al mantenimiento del reservorio y al desarrollo de problemas neurológicos (Espíndola et al. 2016). Por otra parte, la sobreestimulación de estas células, principalmente por productos bacterianos translocados desde mucosas, altera y disminuye su capacidad fagocítica (Espíndola et al. 2016; McMichael et al. 2010).

Las células dendríticas son muy importantes para el establecimiento de la infección inicial. Transportan a cientos de viriones dentro de los compartimientos membranales hasta el tejido linfoide mediante la adhesión de los viriones a la membrana celular a través de moléculas de unión como la lectina DC-SIGN (Z. Ahmed et al. 2015; Wilen, Tilton, y Doms 2012). Las células dendríticas se reducen en número, principalmente las plasmacitoides, durante la infección aguda. Éstas últimas aumentan la producción de

indolaminasa 2,3-dioxigenasa (IDO) que induce la generación de células T reguladoras (McMichael et al. 2010; Espíndola et al. 2016; Z. Ahmed et al. 2015).

Los neutrófilos representan el 70% de las células del sistema inmunológico circulantes. Debido a causas multifactoriales, como la infección de los precursores mieloides en la médula ósea y la inflamación crónica, se produce neutropenia (Espíndola et al. 2016). Algunos mecanismos efectores de los neutrófilos son la producción y liberación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y arginasa. Durante la infección por VIH, la capacidad de producción de ROS disminuye y la de arginasa aumenta. Además los neutrófilos presentan un fenotipo supresor al incrementar la expresión de PD-L1, ligando de la molécula co-inhibidora PD-1 (Espíndola et al. 2016).

Adicionalmente, las células NK responden ante las infecciones virales identificando a las células infectadas de acuerdo al patrón de receptores que expresan, además de tener capacidad citotóxica para eliminarlas. La proteína viral Nef, reduce la expresión de algunos de los ligandos reconocidos por las células NK. Se ha reportado la disminución de la producción de IFN γ y TNF α y un incremento en la producción de IL-10 por las células NK, lo cual está asociado a un fenotipo regulador (Espíndola et al. 2016; McMichael et al. 2010).

1.6 Respuesta inmunológica adaptativa contra el VIH

Posterior a la respuesta inmunológica innata, actúa la respuesta inmunológica adaptativa, la cual es ejecutada por los linfocitos B, linfocitos T CD4 (cooperadores) y linfocitos T CD8 (citotóxicos) (Bhardwaj, Hladik, y Moir 2012).

Los linfocitos B son secretores de anticuerpos (respuesta humoral) durante la respuesta inicial contra el VIH. Comúnmente la respuesta inicial de estas células contra VIH es poco específica ya que anticuerpos específicos a la microbiota intestinal tienen reconocimiento cruzado con proteínas del VIH (Moir y Fauci 2017). Es hasta la semana 4 de la infección que se producen anticuerpos contra epítomos de gp120, sin embargo estos anticuerpos no son neutralizantes. Por otra parte, sólo aproximadamente el 10-20% de la población que vive con VIH desarrollan anticuerpos altamente neutralizantes, es decir anticuerpos que son capaces de reconocer al 90% de las variantes de virus circulantes (Moir y Fauci 2017; Bree y Lynch 2016). La infección por VIH provoca defectos en el desarrollo y respuesta de las células B, por ejemplo, se pierden poblaciones de memoria y aumentan las poblaciones de vida corta. Por otra parte, la reacción del centro germinal es afectada por la infección de los linfocitos T CD4 foliculares (T_{FH}), los cuales están involucrados en la generación de anticuerpos con mayor afinidad (Bree y Lynch, 2016; Z. Hu et al., 2015).

Los linfocitos T CD4 o cooperadores orquestan la respuesta inmunológica mediante señales de reclutamiento, maduración, proliferación, diferenciación y sobrevivencia a otras células del sistema inmunológico (Kalams y Walker 1998; Chevalier et al. 2016). A pesar de que las células CD4 activadas son el blanco

principal del VIH la respuesta eficiente de estas células está asociada con una carga viral baja y con la capacidad de controlar la infección (Chevalier et al. 2016; Ranasinghe et al. 2012; Kalams y Walker 1998; Dotish y Greene 2016). La mayoría de las células CD4 específicas a VIH reconocen epítomos de Gag, estas clonas se expanden principalmente durante la infección aguda, posteriormente, la respuesta disminuye, sin embargo, se mantiene una activación inmunológica crónica caracterizada por la expresión de marcadores asociados a activación como HAL-DR, CD38 y CD69 (Ranasinghe et al. 2012; Chevalier et al. 2016). Esta expansión durante la fase aguda permite el apoyo a la respuesta de los linfocitos T CD8 los cuales establecen el *set point* en la carga viral (Kalams y Walker 1998; Passaes y Sáez-Ciri3n 2014).

La mayoría de las investigaciones en la respuesta inmunológica adaptativa durante la infección con VIH, se han enfocado en la respuesta de las células T CD8 o linfocitos citot3xicos (CTL), la cual comienza en la semana 1-2 de la infección (McMichael et al. 2010). Las CTLs tienen la capacidad de eliminar células infectadas y regular la infección viral mediante la secreci3n de citocinas antivirales, la inducci3n de la muerte celular dependiente de FAS y mediante la liberaci3n de gr3nulos que contienen granzima y perforina, que en conjunto provocan apopt3sis en la c3lula blanco (McMichael et al. 2010; Killian et al. 2013; Boppana y Goepfert 2018; Arnoczy et al. 2012; Gulzar y Copeland 2004).

La tasa de mutaci3n del VIH es muy alta por lo que las variaciones en sus p3ptidos dificultan e impiden el reconocimiento de las células infectadas por las CTL, de esta forma el virus es capaz de evadir la respuesta inmunológica (Gulzar y Copeland 2004). La presi3n de selecci3n que representan las CTLs para el VIH tambi3n gui3a y promueve la selecci3n de mutaciones de escape

que evadan el reconocimiento del sistema inmunológico (Boppana y Goepfert 2018; Gulzar y Copeland 2004). La activación crónica del sistema inmunológico y de las células T CD8, junto con la exposición persistente al antígeno provoca en las CTLs un fenotipo exhausto caracterizado por la pérdida de producción de citocinas antivirales, la pérdida de la capacidad citotóxica, la disminución en la proliferación y el aumento en la expresión de receptores co-inhibidores (Kalams y Walker 1998; Boppana y Goepfert 2018; Gulzar y Copeland 2004).

1.7 Modulación de la respuesta inmunológica

Para que se inicie la respuesta de las células T ante un antígeno, los linfocitos T, necesitan tres señales que provee la célula presentadora de antígeno (Abbas, Lichtman, y Pillai 2015; Murphy 2012).

La primera señal es la unión del TCR con el MHC. Las células presentadoras de antígeno (APC) fagocitan y procesan los antígenos y estos son presentados en fracciones peptídicas mediante el complejo principal de histocompatibilidad (MHC). Las células T, mediante el receptor de células T (TCR), reconocen el péptido específico presentado por las APC vía MHC en la sinapsis inmunológica. Las células CD4 reconocen péptidos presentados vía MHC-II, mientras que las células CD8 vía MHC-I (Murphy 2012; Abbas, Lichtman, y Pillai 2015).

La segunda señal es la co-estimulación la cual provee la APC al linfocito mediante la expresión de los ligandos de las moléculas co-estimuladoras en las células T. La señal de co-estimulación permite la sobrevivencia, expansión clonal, producción de citocinas y diferenciación de los linfocitos. Algunos de los

receptores de co-estimulación son CD28, ICOS, OX40 y CD27, sus respectivos ligandos son CD80/CD86, B7-H2, OX40L y CD70 (Chen y Flies 2013; Murphy 2012). En ausencia de la segunda señal, las células se vuelven anérgicas y pierden la capacidad de activarse y responder a posteriores estímulos (Murphy 2012).

La tercera señal son las citocinas, IL-2 induce la proliferación celular mientras que IL-12, IL-4 e IL-6 permiten la diferenciación de las células T en distintas subpoblaciones (Figura 5) (Murphy 2012).

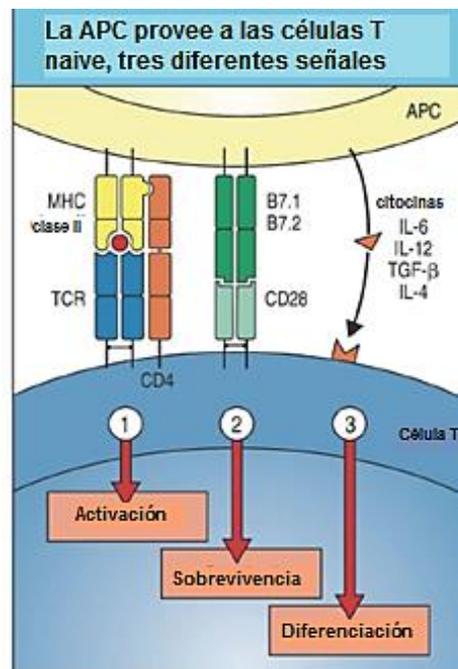


Figura 5. Modelo de tres señales para la activación del linfocito T. La célula presentadora provee de tres señales diferentes a las células T para que puedan activarse. La primera señal es la unión del TCR con el MHC unido al péptido presentado. La segunda señal es la señal provista por las moléculas co-estimuladoras en las células T, que al unirse a sus ligandos en la APC, reciben señales de supervivencia, proliferación y producción de citocinas. La tercera señal son las citocinas producidas por la APC que inducen proliferación y diferenciación de las células T. Modificado de Murphy, 2012.

La activación de las células T, es un proceso dinámico en el que señales de activación e inhibición son recibidas por la célula T de forma simultánea. El destino de la célula y de la respuesta inmunológica depende de la intensidad de la señal activadora o inhibidora (Chen y Flies 2013). La regulación e inhibición de la respuesta inmunológica es importante para evitar respuestas exacerbadas, enfermedades autoinmunes y para la generación de la tolerancia inmunológica (Haining 2012). Las proteínas inmunoreguladoras o también llamadas moléculas co-inhibidoras son las encargadas de regular la respuesta inmunológica al detener el ciclo celular y las funciones efectoras además de inducir apoptosis de las células que expresan estos receptores (Chen y Flies 2013; Murphy 2012). Estas moléculas son expresadas en la célula T y sus respectivos ligandos en otras células del sistema inmunológico y por células de origen no hematopoyético. Los mecanismos de regulación de las moléculas co-inhibidoras son tres: competencia por ectodominio entre moléculas co-estimuladoras y co-inhibidoras, modulación de mediadores intracelulares involucrados en la cascada de señalización del TCR e inducción de genes inhibidores (Chen y Flies 2013).

A continuación se describe la acción de algunas proteínas inmunoreguladoras y su mecanismo regulador.

PD-1

PD-1, también llamado CD279 o receptor de muerte programada-1. Es una proteína inducible que se expresa en la membrana celular de linfocitos T y B, células NK, NKT y monocitos activados (S Vigano, Perreau, y Harari 2012; Sharpe et al. 2007; Pauken y Wherry 2015; Berger y Pu 2018; Sharpe y

Pauken 2017). Su expresión es inducida por la señal de activación del TCR y por citocinas de cadena α (IL-2, IL-7, IL-15 e IL-21) (Sharpe y Pauken 2017; Kinter et al. 2008).

Sus ligandos son PD-L1 y PD-L2, el primero de estos se expresa de forma constitutiva en una gran variedad de células del sistema inmunológico y de origen no hematopoyético como células endoteliales, epiteliales, musculares y hepatocitos. Citocinas como interferones tipo 1 y 2, TNF, IL-10 y citocinas de cadena α común, regulan de forma positiva la expresión de este ligando. La expresión de PD-L2 es inducida durante procesos de inflamación en células dendríticas y macrófagos por IFN γ , GM-CSF (factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos) e IL-4 (S Vigano, Perreau, y Harari 2012; Sharpe et al. 2007; Pauken y Wherry 2015; Berger y Pu 2018; Sharpe et al. 2007).

Estructuralmente es un monómero con un dominio extracelular variable tipo inmunoglobulina con una cola citoplasmática con un motivo inhibitor del inmunoreceptor basado en tirosina (ITIM) y un motivo de cambio de inmunoreceptor basado en tirosina (ITSM) (Keir et al. 2008; Sharpe y Pauken 2017). Los motivos ITIM e ITSM reclutan a las tirosinas fosfatasas SHP-1 y SHP-2 que atenúan la señal activadora del TCR (Odorizzi y Wherry 2012; Sharpe y Pauken 2017; Chen y Flies 2013; Wherry y Kurachi 2015). PD-1 también induce la expresión del gen BATF que codifica para la proteína AP-1, un represor de la transcripción de genes activadores (Wherry y Kurachi 2015). La señalización de PD-1 también produce cambios metabólicos en las células T. Reduce el metabolismo de glucosa y glutamina, restringiendo la fuente de energía de la célula T (Sharpe y Pauken 2017).

PD-L1

El ligando de PD-1, también conocido como B7-H1 o CD274, también tiene una función inhibidora (Kythreotou et al. 2017; Sharpe y Pauken 2017; Chen y Flies 2013). Como ya se mencionó anteriormente, se expresa en una gran variedad de células de origen hematopoyético y no hematopoyético incluyendo a los linfocitos T. Su expresión es inducida por citocinas de cadena α , los interferones de tipo 1 y 2, TNF e IL-10 (Sharpe y Pauken 2017; Kythreotou et al. 2017; Kinter et al. 2008). La forma de inhibición de esta molécula es mediante competencia por el ectodominio ya que se puede unir con CD80, el ligando de la molécula co-estimuladora CD28 (Park et al. 2010; Azuma et al. 2008). Tiene una estructura extracelular compuesta por un dominio tipo Ig-V y uno tipo Ig-C. Su cola citoplasmática es de 30 aminoácidos y no se ha determinado si tiene dominios capaces de transducir señales intracelulares (Keir et al. 2008; Kythreotou et al. 2017; Park et al. 2010, 7), sin embargo, hay evidencia que indica que podría transmitir una señal inhibidora en la célula T (Chen y Flies 2013; Azuma et al. 2008, 7; Park et al. 2010, 7-).

Tim-3

La inmunoglobulina 3 de células T o Tim-3, es un receptor inhibidor con un dominio de inmunoglobulina y mucina extracelular. En los inicios de su descubrimiento se consideraba que únicamente se expresaba en células T CD4 Th1, es decir una subpoblación de linfocitos T que secretan citocinas proinflamatorias como IFN γ . Posteriormente se describió su expresión en linfocitos T CD8, monocitos, células dendríticas, macrófagos activados, células

NKT y en la subpoblación de células T CD4 Th17 (S Vigano, Perreau, y Harari 2012; Haining 2012; Wherry y Kurachi 2015; Anderson, Joller, y Kuchroo 2016; Du et al. 2017, 3; Zhu, Anderson, y Kuchroo 2011). La expresión de Tim-3 es inducida por la señalización a través del TCR y por las citocinas de cadena α IL-2, IL-7, IL-15, IL-21 (Mujib et al. 2012; Anderson, Joller, y Kuchroo 2016; Zhu, Anderson, y Kuchroo 2011). Se han identificado diversos ligandos para este receptor, Galectina-9 es el más estudiado. La unión del receptor con este ligando reduce la producción de IFN γ e induce procesos apoptóticos (Anderson, Joller, y Kuchroo 2016; Du et al. 2017, 3). Galectina-9 es expresada en diferentes tipos celulares como linfocitos T CD4 y células endoteliales, se sabe que el IFN γ es capaz de inducir su expresión (Thijssen et al. 2015; Oomizu et al. 2012; Alam et al. 2011). Tim-3 es una molécula involucrada en la activación, diferenciación y proliferación de las células T (Avery et al. 2018; Anderson, Joller, y Kuchroo 2016). La cola citoplasmática de este receptor se encuentra unido a el adaptador molecular Bat-3, proteínas capaz de reclutar la forma activa de la tirosina cinasa Lck la cual está involucrada en aumentar la señal intracelular del TCR. Una vez que Tim-3 se une al ligando Galectina-9 los residuos de tirosina de la cola citoplasmática son fosforilados, provocando el desplazamiento de Bat-3 y por tanto de Lck y reduciendo la señal del TCR (Odorizzi y Wherry 2012; Rangachari et al. 2012; Haining 2012).

Lag-3

Lag-3, CD223 o gen activador de linfocitos-3 pertenece a la superfamilia de las Ig. Se expresa en células T activadas, células B, NK y células dendríticas. Su expresión es inducida por IFN γ , IL-2, IL-7, IL-12 y la señal del TCR. Su ligando

es la proteína MHC-II al cual se une con mayor afinidad que CD4. Estructuralmente es una molécula homóloga a CD4, posee cuatro dominios extracelulares tipo Ig (Larsson et al. 2013; Odorizzi y Wherry 2012; Anderson, Joller, y Kuchroo 2016; Li et al. 2004; Joller y Kuchroo 2017; Workman y Vignali 2005; Workman, Dugger, y Vignali 2002). En su cola citoplasmática tiene diferentes motivos con el potencial de reclutar moléculas adaptadoras y mandar una señal intracelular, sin embargo, se desconoce la vía de señalización debido a que no posee motivos inhibidores similares a los de otras proteínas inmunoreguladoras (Odorizzi y Wherry 2012; Workman, Dugger, y Vignali 2002). Una de las regiones en la cola citoplasmática, KIEELE, es capaz de mandar una señal inhibidora, atenuando la señalización del TCR, la proliferación, la producción de citocinas y el flujo de Ca^{2+} intracelular, necesario para la activación del linfocito (Larsson et al. 2013; Long et al. 2018; Workman, Dugger, y Vignali 2002).

TIGIT

También llamada inmunoglobulina de células T con dominio ITIM o Vstm3, es expresada en células NK, NKT, células T, monocitos y células dendríticas, posterior a su activación. Pertenece a la superfamilia de los receptores Ig por lo que su estructura se compone de dominio extracelular IgV y una cola citoplasmática con motivos ITIM y tipo ITT. Posee dos ligandos CD155/PVR, CD112 los cuales son expresados en células T, células B, NK, NKT, células dendríticas, monocitos y células no hematopoyéticas como células endoteliales y fibroblastos. En las células pertenecientes al sistema inmunológico estos ligandos son expresados posterior a la activación celular (Joller y Kuchroo

2017; Jossefsson et al. 2018; Yu et al. 2009). PVR es la neectina que desencadena la función inhibidora de TIGIT (Boles et al. 2009; Stengel et al. 2012; Maier et al. 2007). Hay cuatro mecanismos por los cuales TIGIT puede regular la respuesta inmunológica. El primer mecanismo es mediante el reclutamiento de la fosfatasa SHIP-1 y SHP-2 a su cola citoplasmática atenuando la señalización del TCR y limitando la proliferación celular y producción de citocinas (Yu et al. 2009). Se desconoce la vía de señalización de este receptor pero se ha comprobado que promueve la expresión de factores antiapoptóticos y la producción de IL-1, IL-7 e IL-15, asegurando la sobrevivencia de las células T (Yu et al. 2009; Manier, Chiang, y Grogan 2017; Anderson, Joller, y Kuchroo 2016). El segundo mecanismo consiste en la competencia por el ligando CD155 con el receptor co-estimulador CD226/DNAM-1. El tercer mecanismo es mediante la unión *cis* con CD226 en la misma célula, evitando la dimerización de esta proteína y por lo tanto su capacidad de transducir una señal activadora. Por último, CD155 es capaz de mandar una señal en las APC, reduciendo la producción de IL-12 y aumentando la producción de IL-10 y TGF- β , estableciendo un perfil tolerogénico en la célula presentadora de antígeno (Anderson, Joller, y Kuchroo 2016; Joller y Kuchroo 2017; Yu et al. 2009; Manier, Chiang, y Grogan 2017).

CD160

La proteína reguladora CD160 se expresa principalmente en células NK y en menor medida en NKTs, mastocitos y en linfocitos T CD8 y CD4 (Le Bouteiller et al. 2011; Larsson et al. 2013; Odorizzi y Wherry 2012; Sedy et al. 2013; del

Rio et al. 2010). En células NK su expresión es inducida por IL-2, IL-12, IL-15 e IL-18 (Le Bouteiller et al. 2011, 160; Sedy et al. 2013). Posee dos isoformas, ambas tienen la misma estructura extracelular, una glicosilfosfatidilinositol (GPI) con un dominio Ig (Le Bouteiller et al. 2011, 160; El-Far et al. 2014). La diferencia entre ambas isoformas es el dominio transmembranal que está ausente en una de ellas (El-Far et al. 2014). Posee tres ligandos, el primero de ellos es HVEM, el cual es expresado en células T activadas, células B, células dendríticas, monocitos, neutrófilos y células de tejido parenquimatoso. CD160 también puede unirse a CD48 y al MHC-I pero con menor afinidad que a HVEM (Odorizzi y Wherry 2012; Muscate et al. 2018; del Rio et al. 2010). No se conoce la vía de señalización por la cual CD160 inhibe la respuesta inmunológica. Existe evidencia de que la fracción GPI de la estructura de CD160 está involucrada en mandar señales para la reducción de la fosforilación de CD3, regulación del flujo de Ca^{2+} intracelular, modulación de los complejos de señalización que se traslocan a las balsas lipídicas, inhibición la producción de citocinas, de la proliferación y de genes involucrados en el transporte de nutrientes en células T (Le Bouteiller et al. 2011, 160; Larsson et al. 2013; Sedy et al. 2013; Cai y Freeman 2009). Por otra parte CD160 compite con la proteína co-estimuladora LIGHT por la unión a HVEM (del Rio et al. 2010; Kaye 2008). La función de CD160 depende directamente del tipo celular en que se exprese y del receptor al que se una. En células NK si interactúa con el MHC-I provee de una señal co-estimuladora, aumentando su capacidad de ejercer funciones efectoras, sin embargo se desconoce si tiene la misma función en células T (Le Bouteiller et al. 2011, 160; Sedy et al. 2013; del Rio et al. 2010).

2 Antecedentes

2.1 Expresión de proteínas inmunoreguladoras, efectos y consecuencias en linfocitos T CD8 durante la infección por VIH

El VIH provoca diversos desequilibrios en las células del sistema inmunológico y en su capacidad de responder ante diferentes estímulos. En el caso de los linfocitos T CD8 adquieren un fenotipo exhausto caracterizado por la expresión múltiple de moléculas co-inhibidoras, la cual es diferencial y dependiente de la subpoblación celular (células efectoras, memoria efectora, memoria central y células de memoria tipo troncales). Por otra parte la expresión de las proteínas inmunoreguladoras, se mantiene elevada y constante a pesar del uso temprano del TAR, a comparación de individuos VIH- (Wykes y Lewin 2017; Seddiki, Brezar, y Draenert 2014; Khaitan y Unutmaz 2011; El-Far et al. 2008).

Como se mencionó anteriormente las moléculas co-inhibidoras, suprimen la respuesta inmunológica y son muy importantes para evitar daños en tejidos y respuestas autoinmunes. Durante la infección por VIH, la expresión sostenida de estas moléculas provoca un fenotipo exhausto especialmente en células T, el cual impacta en la capacidad de las T CD8 para ejercer sus funciones efectoras (Wykes y Lewin 2017; Khaitan y Unutmaz 2011; El-Far et al. 2008). El cansancio celular o fenotipo exhausto es un estado disfuncional adquirido, caracterizado por la pérdida jerárquica y progresiva de funciones efectoras, aumento de la expresión de receptores inhibidores, expresión alterada de factores de transcripción clave (T-bet, Eomes), cambios metabólicos, aumento de la expresión de marcadores de activación, incapacidad del establecimiento y

mantenimiento de subpoblaciones de memoria independientes del contacto con el antígeno y niveles elevados de citocinas proinflamatorias en suero (Wherry y Kurachi 2015; Kahan, Wherry, y Zajac 2015; S Vigano, Perreau, y Harari 2012; Pauken y Wherry 2015).

A pesar de que las células son disfuncionales no son inertes y son capaces de ejercer presión selectiva que guía la aparición de mutaciones de escape (Wherry y Kurachi 2015).

Los factores por los que se puede generar el cansancio celular son los siguientes: exposición prolongada al antígeno, desensibilización a las vías de co-estimulación, incremento en el microambiente celular de citocinas antiinflamatorias como IL-10, TGF β y el incremento de células T reguladoras (Wherry y Kurachi 2015; Kahan, Wherry, y Zajac 2015; El-Far et al. 2008; Pauken y Wherry 2015).

A continuación se describen los hallazgos respecto a la expresión de las moléculas co-inhibidoras en linfocitos T CD8 durante la infección por VIH.

En el año 2006 los equipos de Day et al, Trautmann et al y Petrovas et al, describieron que la expresión de PD-1 está aumentada en los linfocitos T CD8 tanto en células totales como en células específicas a VIH (Day et al. 2006; Trautmann et al. 2006; Petrovas et al. 2006). La expresión de este receptor correlacionó positivamente con la presencia de marcadores de progresión de la infección, como la carga viral y negativamente con la pérdida de células T CD4 y la producción de citocinas. También describieron la expresión diferencial de

PD-1 en las subpoblaciones de células T CD8. PD-1 se expresa principalmente en células efectoras (T_E), de memoria efectora (T_{ME}) y de memoria central (T_{MC}). El bloqueo de PD-1 y su ligando PD-L1 con anticuerpos aumentó la producción de citocinas, la sobrevivencia y la capacidad de proliferación de las células T CD8 específicas a VIH. El tratamiento antirretroviral (ART) tiene un efecto positivo reduciendo la expresión de PD-1 en las células específicas a VIH, pero no lo suficiente para llegar a niveles observados en individuos VIH-, esto correlaciona con la disminución de la carga viral (Day et al. 2006; Trautmann et al. 2006; Petrovas et al. 2006; Correa-Rocha et al. 2018).

En otro estudio se demostró que la expresión de PD-L1 no disminuye durante el uso del TAR en células T CD8, por lo que se asumió que la regulación de la expresión de PD-1 y su ligando son diferentes (Rosignoli et al. 2007).

Por otra parte, se ha observado que el aumento de PD-1 correlaciona positivamente con el aumento de los marcadores de activación CD38 y HLA-DR (Trautmann et al. 2006; Sauce et al. 2007; Vollbrecht et al. 2010; Sachdeva et al. 2010; Correa-Rocha et al. 2018).

El uso de primates no humanos como modelos de la infección por VIH es amplio en estudios inmunológicos debido a la similitud con el humano. Recreando la infección con el VIS (Virus de la Inmunodeficiencia en Simios), Velu et al y Petrovas et al (2007) observaron una expresión alta de PD-1 en células específicas a VIS en tejidos donde hay más replicación viral que en sangre (Velu et al. 2007; Petrovas et al. 2007). Al igual que en modelos *in vitro*, el bloqueo de PD-1 y PD-L1 mejoró la capacidad responsiva de las células T

CD8 en sangre y en tejido, en conjunto con la disminución de la carga viral (Petrovas et al. 2007; Velu et al. 2007; 2009; Mylvaganam et al. 2018).

Estudios posteriores se enfocaron en la expresión de otras moléculas co-inhibidoras. Jones en el 2008 describió que durante la infección por VIH hay un aumento en la expresión de TIM-3 en linfocitos T CD8 a comparación de individuos VIH-. Al igual que PD-1, la expresión de Tim-3 correlacionaba positivamente con la carga viral y la disminución en la producción de citocinas. La expresión de Tim-3 también está incrementada en células específicas a VIH, por lo que el bloqueo con anticuerpos específicos a Tim-3, restaura la proliferación y la producción de citocinas (Jones et al. 2008). Esto mismo fue reportado posteriormente por Sakhdari (2012), quien observó que además de la expresión de Tim-3, las células T CD8 tienen alterada la expresión del factor de transcripción T-bet. En estudios en modelos de primates no humanos, Tim-3 se expresa principalmente en linfocitos T CD8 de memoria efectora específicos a VIH en tejido linfoide y en sangre (Sakhdari et al. 2012). El bloqueo dual de PD-1 y Tim-3 con anticuerpos demostró mayores efectos positivos en comparación con el bloqueo de solo uno de estos receptores (Fujita et al. 2014; Grabmeier-Pfistershammer et al. 2017).

En investigaciones independientes se estudió la expresión de CD160, TIGIT y LAG-3 en células T CD8 totales y específicas a VIH durante la infección aguda y crónica. Estos marcadores fueron asociados con el progreso rápido de la infección, cansancio celular, pérdida de producción de citocinas y menor capacidad para degranular (Peretz et al. 2012; El-Far et al. 2014; Tian et al. 2015; Chew et al. 2016; Tauriainen et al. 2017; Rutishauser et al. 2017).

Peretz et. al., describieron que la coexpresión de CD160 y PD-1 en linfocitos T CD8 es característica de un fenotipo con mayor disfunción a comparación de las células que expresan únicamente uno de los receptores. También observaron que durante la infección aguda hay una mayor expresión de CD160 en linfocitos T CD8 y que ésta disminuye en la infección crónica pero no regresa a niveles previos a la infección (Peretz et al. 2012). El uso de anticuerpos contra CD160 y HVEM restaura parcialmente la producción de citocinas, obteniendo mejores resultados si se bloquea de forma simultánea con PD-1 (Peretz et al. 2012; Jensen et al. 2015; El-Far et al. 2014). Jensen et. al., describieron la co-expresión de PD-1 y CD160 en individuos a los que se les dio seguimiento durante el uso del TAR. No se encontraron diferencias en la expresión de éstas proteínas en linfocitos T CD8, respecto al inicio temprano o tardío del uso del TAR (respecto a la cantidad de células CD4 con las que se inició el tratamiento), pero si se observó una reducción en comparación de la expresión antes del inicio del TAR (Jensen et al. 2015).

Lag-3 se expresa de forma diferencial entre las diferentes subpoblaciones de células T CD8, principalmente en células de memoria transicional y de memoria efectora. Al igual que PD-1, la expresión aumentada de la proteína Lag-3 en linfocitos T CD8 específicos a VIH correlaciona positivamente con la progresión de la infección y con marcadores de activación. El bloqueo de Lag-3 y PD-1 de forma separada restaura en menor magnitud la respuesta de las células específicas a VIH en comparación con el bloqueo dual de estas proteínas (Tian et al. 2015).

Chew et. al., estudiaron de forma simultánea la expresión de TIGIT en tejido linfoide y sangre de personas VIH+ y en primates no humanos infectados con

VIS. TIGIT se expresa más en células T CD8 efectoras y de memoria efectora en comparación de las otras subpoblaciones principalmente en tejido linfoide, en células específicas a VIH y VIS (Chew et al. 2016). Las células T CD8 positivas a TIGIT también co-expresan PD-1; el bloqueo de estos receptores revierte el fenotipo exhausto en las células específicas, pero no encontraron diferencias entre el bloqueo individual o dual de estas proteínas (Chew et al. 2016; Tauriainen et al. 2017). Tauriainen et. al., reportaron que el tratamiento antirretroviral no tiene un efecto positivo en los niveles de expresión de TIGIT en las células T CD8, sin importar si el tratamiento fue iniciado en una fase temprana o tardía de la infección. Hay una correlación positiva entre la expresión de TIGIT y los marcadores de activación CD38 y HLA-DR en células T CD8 (Tauriainen et al. 2017).

Yamamoto et. al., estudiaron la coexpresión de PD-1, CD160, Tim-3 y LAG-3. Reportó que la coexpresión de estos marcadores en células T CD8, correlaciona positivamente con la carga viral y de forma negativa con la capacidad de producir citocinas. Por otra parte el TAR tiene un efecto positivo en la reducción de la expresión de PD-1 y CD160, sin embargo, observó un aumento en la expresión de LAG-3 en la subpoblación de células T CD8 de memoria central. También reportaron que el patrón de expresión de las moléculas co-inhibidoras difiere dependiendo de la especificidad (VIH y CMV), la subpoblación celular y los marcadores de activación. De igual forma, la capacidad de responder de los linfocitos T CD8 depende del patrón de coexpresión de las proteínas inmunoreguladoras y el bloqueo simultáneo de éstas tiene un efecto positivo en la producción de citocinas (Yamamoto et al. 2011).

Respecto el efecto del inicio del TAR en una etapa temprana o tardía de la infección en la coexpresión de TIGIT, CD160 y PD-1 en células T CD8 se encontró que el uso del TAR disminuye la expresión de los marcadores pero no se encontraron diferencias entre la etapa de la infección en que se inició el uso del tratamiento (Rutishauser et al. 2017).

No se han realizado estudios de la expresión simultánea de PD-1, PD-L1, Tim-3, Lag-3, TIGIT y CD160 y la distribución de la expresión de estas moléculas entre las diferentes subpoblaciones de memoria de células específicas a VIH. Tampoco se ha estudiado la dinámica y relación de la co-expresión de múltiples marcadores inhibitorios y de marcadores de activación cuando las personas inician TAR. Entender la dinámica de la expresión de las moléculas co-inhibidoras permitiría entender el papel que tienen las proteínas co-inhibidoras durante la infección crónica del VIH contribuyendo al conocimiento necesario para la aplicación de una inmunoterapia para restaurar la funcionalidad de las células T CD8.

3 Hipótesis

El tratamiento antirretroviral exitoso tendrá un impacto positivo en el tiempo, al provocar la disminución de la activación crónica, la disminución del porcentaje y expresión de las proteínas inmunoreguladoras LAG-3, PD-1, PDL-1, TIGIT, TIM-3 y CD160 en los linfocitos T CD8 totales y en linfocitos T CD8 específicos a VIH.

4 Objetivos

4.1 Objetivo general

Determinar si al cabo de dos años, el uso del TAR provoca cambios en el porcentaje y la expresión de las diferentes proteínas inmunoreguladoras en linfocitos T CD8 específicos al VIH y si estos cambios están asociados a variaciones en la expresión de proteínas usadas como marcadores de activación.

4.2 Objetivos específicos

- Conocer si la reducción de la carga viral, consecuencia del uso del TAR, provoca la disminución en la expresión de las proteínas inmunoreguladoras LAG-3, PD-1, PDL-1, TIGIT, TIM-3 y CD160 en los linfocitos T CD8 específicos al VIH.
- Estudiar de forma simultánea la expresión y dinámica de las proteínas inmunoreguladoras LAG-3, PD-1, PDL-1, TIGIT, TIM-3 y CD160 en linfocitos T CD8 específicos al VIH en individuos que inician TAR y después de dos años con éste.
- Determinar si existe una asociación entre la expresión de las proteínas inmunoreguladoras y los marcadores de activación inmunológica CD38, HLA-DR, CD69 y Ki67 en linfocitos T CD8 después de dos años con TAR.

5 Metodología

5.1 Muestras del estudio

Los participantes de este estudio fueron reclutados en el Departamento de Investigación en Enfermedades Infecciosas del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas”, Secretaría de Salud como parte del protocolo B22-10. Posterior al consentimiento firmado, los participantes (n=23) fueron seleccionados y divididos en los siguientes grupos, participantes que a la fecha basal de toma del TAR tenían un conteo de más de 350 células T CD4 por μL de sangre (n=11) y participantes que a la fecha de la toma basal del inicio del TAR tenían un conteo menor a 350 células T CD4 por μL de sangre (n=12). Se realizó el seguimiento a uno y dos años de uso del TAR de cada uno de los participantes. Ninguno de los participantes de este estudio tuvo aumentos temporales en la carga viral ($\text{cv} > 100$ copias de RNA/ml; blips) y permanecieron con carga viral indetectable una vez que llegaron a esta. Se obtuvieron muestras de sangre periférica antes del inicio del TAR, al año y dos años después del inicio del tratamiento y se separaron células mononucleares de sangre periférica (CMSP) que fueron criopreservadas para su uso posterior. En la Tabla 1 se encuentran las características de la cohorte de estudio.

Tabla 1. Características de la cohorte de estudio antes del uso del tratamiento antirretroviral (TAR).

	<350 CD4 Tc	>350 CD4 Tc	<i>p</i>
Número de participantes	11	12	
Hombres/Mujeres	10/1	11/1	
Edad (años)	41.91	35.25	
media (min-máx)	(29 - 54)	(25 - 56)	
Conteo de células T CD4 (células/ul)	204.1	510.8	<0,0001
media (min-máx)	(56 - 327)	(399 - 711)	
% de células T CD4	12.45	20.25	0,0023
media (min-máx)	(4 - 28)	(13 - 26)	
Conteo de células T CD8 (células/ul)	1,068	1,499	
media (min-máx)	(437 - 2,125)	(943 - 2,836)	
% de células T CD8	58.73	56.17	
media (min-máx)	(37 - 78)	(39 - 68)	
Cociente CD4:CD8	0.2364	0.375	0,0052
media (min-máx)	(0.1 - 0.75)	(0.18 - 0.65)	
Carga viral en plasma (copias RNA/ml)	512,583	170,704	
media (min-máx)	(17,432 - 3,655,348)	(4,504 - 705,668)	
Log de carga viral en plasma	5.162	4.792	
media (min-máx)	(4.24 - 6.56)	(3.65 - 5.85)	

5.2 Determinación de marcadores de inhibición inmunológica

Descongelación de muestras criopreservadas

Las muestras criopreservadas de células mononucleares de sangre periférica (CMSP), fueron calentadas a 37° C a baño maría y resuspendidas en medio R10 (RPMI (BioWhittaker, Suiza) suplementado con 10% suero bovino fetal (Hyclone Gelifesciences, Inglaterra), 1% L-Glutamina (Mediatech Corning,

Nueva York), 1% estreptomina-penicilina (Mediatech, Corning Nueva York)). Posteriormente, las células fueron centrifugadas y resuspendidas en medio R10 a una densidad de 2×10^6 células/ml y se dejaron reposar por 24 hr a 37°C.

Estimulación y tinción de CMSP para citometría

Posterior a 24 horas de cultivo, 2×10^6 de células fueron estimuladas con péptidos de la proteína Gag de VIH (2 µg/mL; cat.160415FO-01, JPT, Alemania) o con medio R10, por 18 hr a 37°C y en presencia del 0.3 µg/mL de anti CD28/49d (cat.347690, BD Biosciense, California) más 1.5 µg/mL de monensina (cat.347690, BD Biosciense, California).

Después de 18 hr de estímulo, las células fueron lavadas con una solución de PBS-EDTA 1mM e incubadas con anticuerpos específicos. Se realizó una preincubación con el anticuerpo anti-TIM-3 (Clona F38-2E2) a 37°C por 10 minutos, después se preincubaron los anticuerpos anti-CCR7 (Clona G043H7) y anti-LAG-3 (Cat. fab2319f) por 20 minutos a 37°C. Posteriormente las células fueron teñidas con un marcador de viabilidad LIVE/DEAD (AmCyan, Life Technologies) y subsecuentemente con un *mix* con los anticuerpos: anti-TIM-3 (Clona F38-2E2), anti-LAG-3 (Cat. fab2319f), anti-CD95 (Clona DX2), anti-PD-1 (Clona EH12.2H7), anti-CD8 (Clona RPA-T8), anti-CD3 (Clona UCHT1), anti-CD45RO (Clona UCHL1), anti-TIGIT (Clona MBSA43), anti-CD4 (Clona SK3), anti-PD-L1 (Clona MIH1) y anti-CD160 (Clona BY55). Estos anticuerpos fueron incubados por 30 minutos a 4°C. Para la tinción intracelular las células fueron fijadas y permeabilizadas usando el kit BD Cytfix/Cytoperm (BD Biosciences, California) siguiendo el protocolo del proveedor y teñidas con anti-IFN γ (Clona

B27) por 1 hora a temperatura ambiente. Las células fueron lavadas con PBS y fijadas con formalina al 1% en PBS.

5.3 Determinación de marcadores de activación inmunológica

Posterior a la descongelación de las células y un reposo de 18 hr en medio R10, las células fueron lavadas con PBS e incubadas con el bloqueador Fc Human TruStain FcX (Biolegend) y teñidas para determinar la expresión de marcadores de activación. Brevemente, las células se incubaron con el anticuerpo anti-CCR7 (Clona 3D12) por 15 minutos a 37° C seguido de la tinción con el marcador de viabilidad y subsecuentemente con los anticuerpos extracelulares. Los anticuerpos usados para esta tinción fueron: anti-PD-1 (Clona EH12.2H7), anti-CD8 (Clona RPA-T8), anti-CD3 (Clona UCHT1), anti-CD16 (Clona 3G8), anti-CD38 (Clona HIT2), anti-CXCR5 (Clona RF8B2), anti-CD4 (Clona RPA-T4), anti-CD56 (Clona B159), anti-CD69 (ClonaFN50), anti-CD45RA (Clona HI100) y anti-HLA-DR (Clona L243). Para la tinción intracelular las células fueron fijadas y permeabilizadas usando el kit BD Cytfix/Cytoperm (BD Biosciences, California) siguiendo el protocolo del proveedor y teñidas con anti-Ki67 (Clona B56) por 1 hora a temperatura ambiente. Las células fueron lavadas con PBS y fijadas con formalina al 1% en PBS.

5.4 Análisis de citometría de flujo

Las CMSP fueron analizadas en un citómetro de flujo LSR Fortessa (BD Biosciences, California). Los datos obtenidos se analizaron en el programa

FlowJo. Las subpoblaciones de células T CD8 fueron determinadas de acuerdo a la expresión de CCR7, CD45RA, CD45RO y CD95, células T naive (T_N) (CD45RA+ CD45RO- CCR7+ CD95-), células T efectoras (T_E) (CD45RA+ CD45RO- CCR7-), células T de memoria efectora (T_{ME}) (CD45RA- CD45RO+ CCR7-), células T de memoria central (T_{MC}) (CD45RA- CD45RO+ CCR7+) y células T de memoria tipo troncales (T_{SCM} , sus siglas en inglés stem cell like memory) (CD45RA+ CD45RO- CCR7+ CD95-). Se ha reportado que la expresión de marcadores de activación y co-inhibición en células naive es casi nula (Chattopadhyay y Roederer 2010) por lo cual se usó la expresión de los marcadores en estas células, para determinar la expresión positiva en las subpoblaciones restantes de células T CD8. La respuesta específica a VIH se determinó a partir de las células productoras de IFN γ .

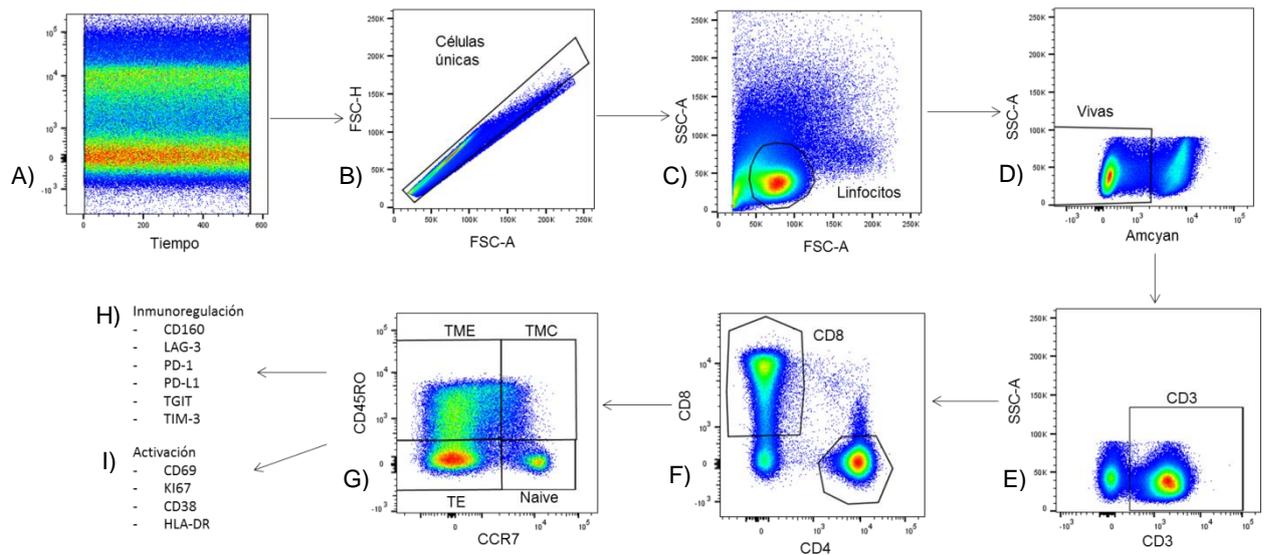


Figura 6. Ejemplo representativo de la estrategia de análisis de datos de citometría de flujo de linfocitos T CD8. A) Tiempo de adquisición. B) Células únicas (FSC-H vs FSC-A). C) Linfocitos de acuerdo a sus características morfológicas de tamaño y granularidad (SSC-A vs FSC-A). D) Viabilidad celular (SSC-A vs Amcyan). E) Células T o CD3+ (SSC-A vs CD3). F) Células T CD4+ y CD8+ (CD8 vs CD4). G) Subpoblaciones de linfocitos T CD8 Naive, efectoras (TE), memoria efectora (TME) y memoria central (TMC) (CD45RO vs CCR7). H) Proteínas inmunoreguladoras evaluadas en las subpoblaciones células T CD8 (CD160, LAG-3, PD-1, PD-L1, TIGIT y TIM-3). I) Proteínas asociadas a activación evaluadas en las subpoblaciones de linfocitos T CD8 (CD69, KI67, CD38 y HLA-DR).

5.5 Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos se realizaron en el programa Graphpad Prism 7.04. Se utilizó la prueba de Friedman y Wilcoxon para comparar la expresión de las moléculas co-inhibidoras durante el seguimiento del TAR. Las pruebas de Kruskal-Wallis y Mann-Whitney fueron usadas para comparar entre las subpoblaciones de células T CD8 de los diferentes grupos.

6 Resultados

6.1 Subpoblaciones de células T CD8 antes del tratamiento antirretroviral (TAR)

Para describir el porcentaje de células T CD8 positivas a las proteínas inmunoregulatoras o co-inhibidoras antes del TAR, primero quisimos conocer la distribución de las subpoblaciones de células T CD8 entre los grupos de estudio (Figura 7). De acuerdo a lo esperado se encontró una distribución diferencial de las subpoblaciones de células T CD8 en los dos grupos de estudio (<350 CD4 y >350 CD4). Las subpoblaciones de linfocitos T CD8 con mayor porcentaje en ambos grupos fueron las subpoblaciones TE (52.61% y 45.73% para los grupos <350 CD4 y >350 CD4, respectivamente) y ME (37.58% y 34.87% para <350 CD4 y >350 CD4, respectivamente). No se encontraron diferencias significativas entre grupos.

La subpoblación T_{SCM}, representó solo el 0.1649% y 0.2481% del total de células T CD8 en los dos grupos <350 CD4 y >350 CD4 respectivamente. Al ser un porcentaje muy bajo y conformado por pocos eventos, el análisis de la expresión de las proteínas inmunoregulatoras en esta subpoblación no fue considerado posteriormente

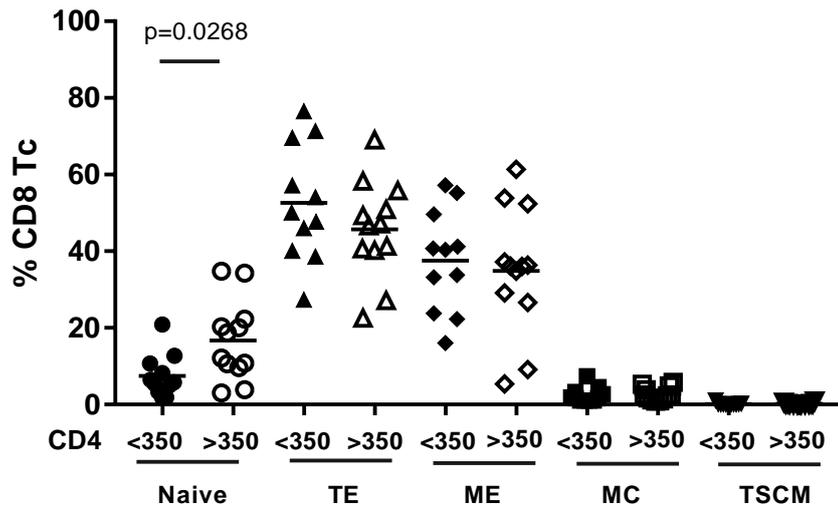


Figura 7. Subpoblaciones de células T CD8 antes del TAR. Comparación de la distribución de las subpoblaciones de células T CD8. Naive (círculos), TE (triángulos, efectoras), ME (rombo, memoria efectora), MC (cuadrados, memoria central) y T_{SCM} (triángulos invertidos, memoria tipo troncal) en los grupos de <350 (figuras sólidas) y >350 (figuras vacías) células T CD4 antes del TAR. Se usó la prueba estadística de Mann-Whitney para la comparación entre grupos, ($p < 0.05$).

6.2 Porcentaje de células T CD8 positivas a proteínas inmunoreguladoras antes del TAR

Se estudió el porcentaje de células T CD8 positivas a las proteínas inmunoreguladoras CD160, LAG-3, PD-1, PD-L1, TIGIT y TIM-3 en los linfocitos T CD8 totales así como en las subpoblaciones naive, TE, ME y MC, en ambos grupos de estudio (<350 CD4 y >350 CD4; Figura 8).

En ambos grupos (<350 CD4 y >350 CD4) fue posible observar un porcentaje alto de células T CD8 totales TIGIT+ antes del inicio del TAR. Por otra parte, se observó una distribución diferencial de las proteínas inmunoreguladoras en las diferentes subpoblaciones de células T CD8, la subpoblación naive fue la población con menor porcentaje de células positivas a estas proteínas.

En el grupo que inició TAR con <350 CD4, el porcentaje de células T CD8 totales positivas a LAG-3, PD-1 y TIGIT fue mayor en las subpoblaciones TE ($p=<0.0001$, $p=<0.0001$, $p=0.0001$), ME ($p=0.0006$, $p=<0.0001$, $p=0.0001$) y MC ($p=0.0032$, $p=<0.0001$, $p=<0.0001$, LAG-3+, PD-1+ y TIGIT+ respectivamente) comparado con su expresión en células naive. El porcentaje de células T CD8 CD160 positivas es mayor en la subpoblación TE respecto a las células naive ($p=0.0041$). Se observó un mayor porcentaje de células TIM-3 positivas de la subpoblación MC respecto a las células naive ($p=0.0002$). Sorprendentemente, se encontró un aumento en el porcentaje de células naive positivas a PD-L1 y TIM-3, respecto a las células TE ($p=0.0013$, $p=<0.0001$).

En el grupo de >350 CD4, el porcentaje de células T CD8 totales CD160+, PD-1+ y TIGIT+ fue mayor en las subpoblaciones TE ($p=<0.0001$, $p=<0.0001$, $p=0.0001$), ME ($p=<0.0001$, $p=<0.0001$, $p=0.0001$) y MC ($p=<0.0001$, $p=<0.0001$, $p=<0.0001$, CD160+, PD-1+ y TIGIT+ respectivamente) a comparación de las células naive. Se observó un mayor porcentaje de células T CD8 MC LAG-3+ ($p=0.0056$), PD-L1+ ($p=0.0014$) y TIM-3+ ($p=<0.0001$) respecto a las células naive.

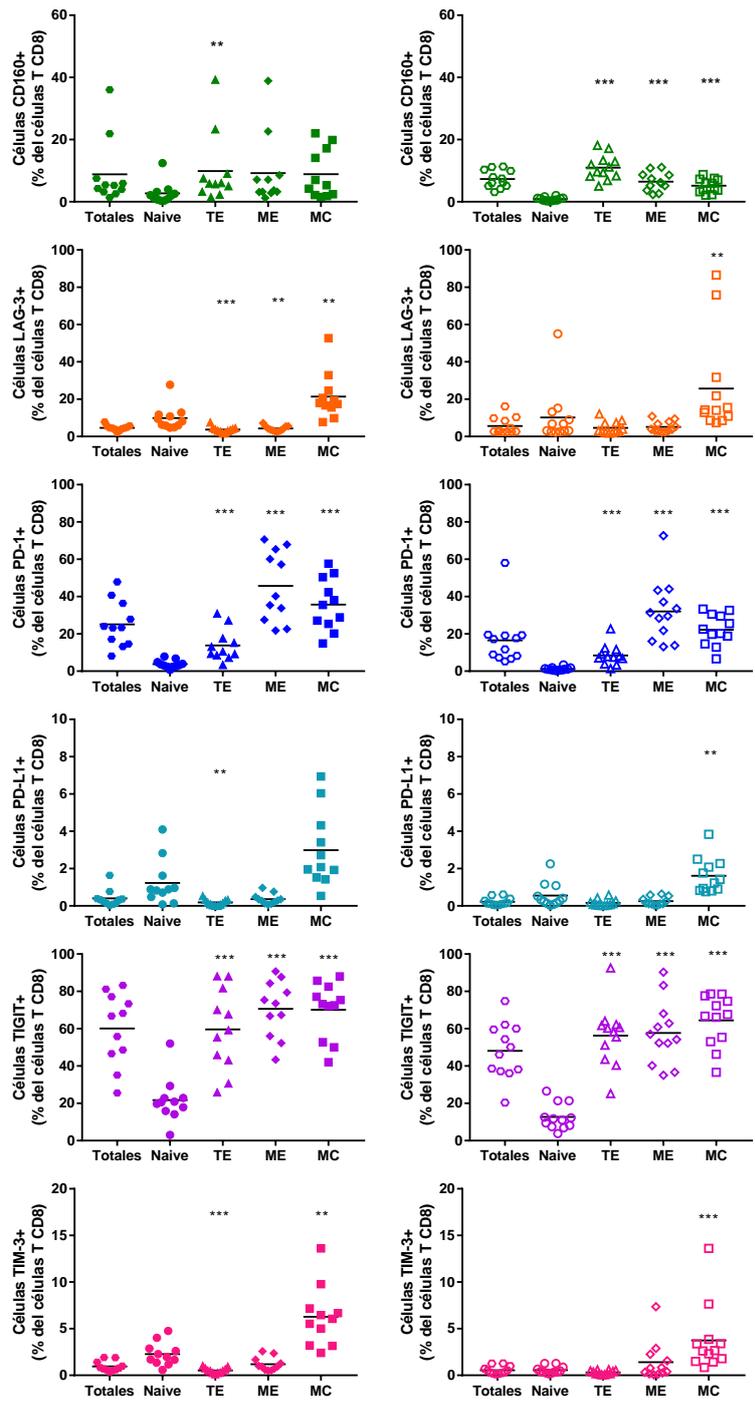


Figura 8. Porcentaje de células positivas a las proteínas inmunoreguladoras en las subpoblaciones de células T CD8 antes del TAR. Comparación del porcentaje de células CD160+ (verde), LAG-3+ (naranja) y PD-1+ (azul marino), PD-L1+ (azul claro), TIGIT+ (morado), TIM-3+ (rosa) en linfocitos T CD8 totales, (hexágonos) y en sus subpoblaciones naiva (círculos), TE (triángulos, efectoras), ME (rombo, memoria efectora) y MC (cuadrados, memoria central) entre los grupos de <350 (figuras sólidas) y >350 (figuras vacías) células T CD4 antes del TAR. Se usó la prueba estadística de Mann-Whitney para la comparación de los porcentajes de una subpoblación respecto a las subpoblación naiva. ** $p < 0.01$ y **** $p < 0.0001$ con respecto a las células naiva.

6.3 El porcentaje de células T CD8 positivas a proteínas inmunoreguladoras no se asocia con el número de células T CD4 antes de empezar el TAR

Para determinar si el número de células T CD4 impacta en el porcentaje de células T CD8 que expresan proteínas inmunoreguladoras se comparó el porcentaje de células T CD8 positivas a las proteínas inmunoreguladoras entre los grupos de estudio (<350 CD4 Tc y >350 CD4; Tabla 2). No se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos de estudio en el porcentaje de linfocitos T CD8 totales positivos a las proteínas inmunoreguladoras. Tampoco se encontraron diferencias en el porcentaje de células T CD8 positivas a las proteínas inmunoreguladoras en las subpoblaciones de células T CD8, entre ambos grupos de estudio (<350 CD4 y >350 CD4), excepto en la subpoblación naive PD-1+ (p=0.0007) y TIM-3+ (p=<0.0001) en la que se observó un mayor porcentaje de células positivas a las proteínas inmunoreguladoras en el grupo que inició TAR con <350 CD4.

Por lo tanto, el porcentaje de células T CD8 positivas a las proteínas inmunoreguladoras no se asocia con el conteo de células T CD4 antes del inicio del TAR.

Tabla 2. Comparación del porcentajes de células positivas a las proteínas inmunoreguladoras en linfocitos T CD8 totales y sus subpoblaciones, entre los grupos <350 y >350 células T CD4

	CD160	LAG-3	PD-1	PD-L1	TIGIT	TIM-3
Totales	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Naive	ns	ns	p=0.0007*	ns	ns	p=<0.0001*
TE	ns	ns	ns	ns	ns	ns
ME	ns	ns	ns	ns	ns	ns
MC	ns	ns	ns	ns	ns	ns

Se usó la prueba estadística de Mann-Whitney para la comparación de los porcentajes entre los grupos <350 CD4 y >350 CD4, estadística significativa p<0.01, * porcentaje mayor en <350 CD4, ns (no significativo).

6.4 Cambios en el porcentaje de células T CD8 positivas a las proteínas inmunoreguladoras posterior al uso de TAR

Se estudió el impacto del uso del TAR en el porcentaje de células T CD8 positivas a las proteínas inmunoreguladoras. Para esto, se comparó el porcentaje de linfocitos T CD8 totales positivos a las proteínas inmunoreguladoras antes y a dos años del uso ininterrumpido de TAR (Figura 9).

No se observaron cambios en el porcentaje de células T CD8 CD160+, LAG-3+, PD-L1+, TIGIT+ y TIM-3+ posterior a dos años de TAR en ningún grupo de estudio (<350 CD4 y >350 CD4; Figura 9). Se observó una reducción en el porcentaje de linfocitos T CD8 PD-1+ posterior a 2 años de TAR tanto en el grupo de <350 CD4 ($p=0.001$) y como en el grupo >350 CD4 ($p=0.0049$) respecto a el porcentaje en la toma basal.

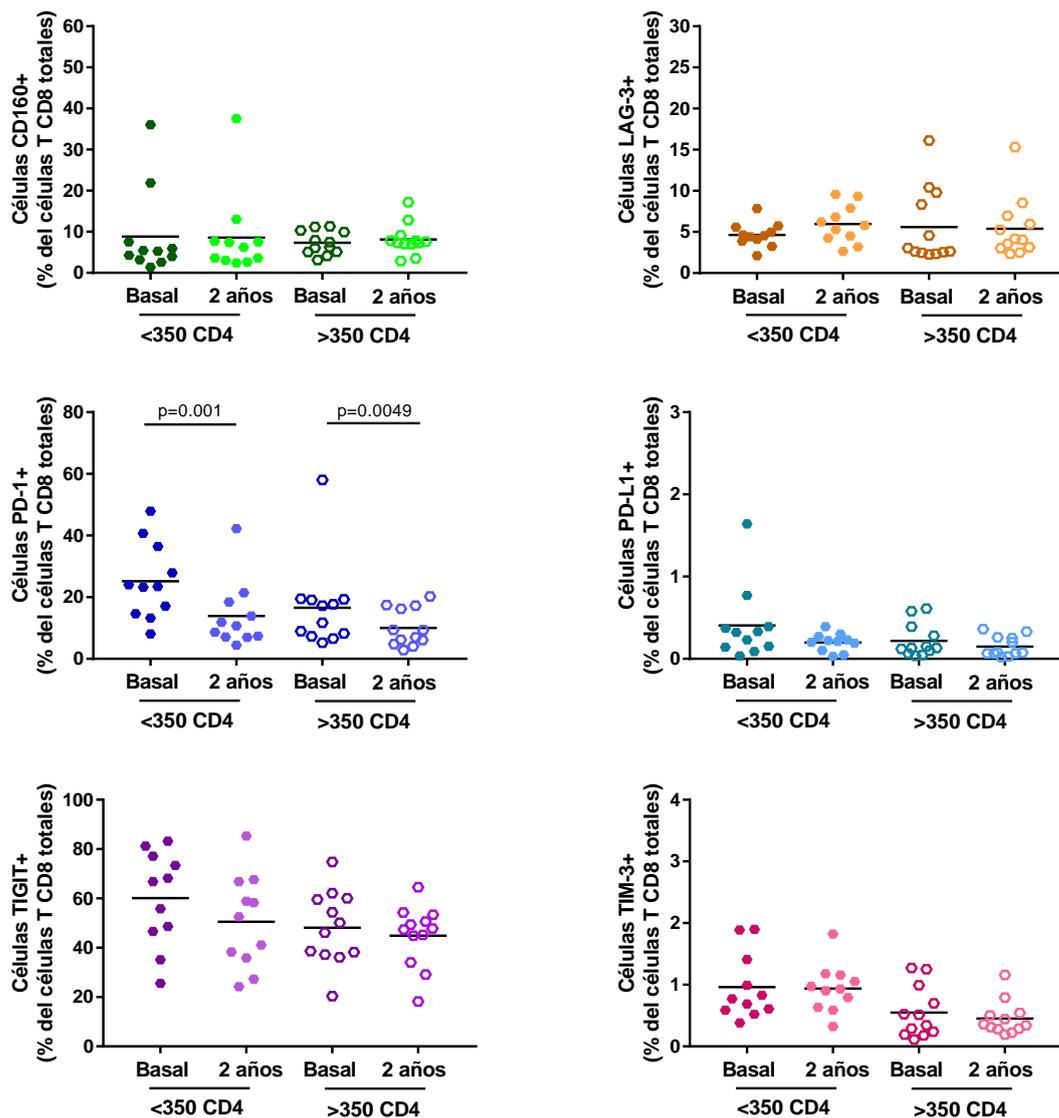


Figura 9. Porcentaje de células T CD8 totales positivas a proteínas inmunoreguladoras después de 2 años de TAR. Células T CD8 totales CD160+ (verde), LAG-3+ (naranja), PD-1+ (azul marino), PD-L1+ (azul claro), TIGIT+ (morado) y TIM-3+ (rosa), antes (colores oscuros) y después de 2 años de TAR (colores claros), en los grupos de <350 (figuras sólidas) y >350 (figuras vacías) células T CD4 antes del TAR. Se usó la prueba estadística de Wilcoxon para la comparación de los porcentajes de la toma basal respecto a 2 años con TAR, ($p < 0.01$).

Posteriormente se buscó estudiar la existencia de cambios en el porcentaje de células positivas a las proteínas inmunoreguladoras, en las subpoblaciones de células T CD8, después del uso del TAR (Tabla 3).

Tabla 3. Comparación del porcentaje de células positivas a proteínas inmunoreguladoras en linfocitos T CD8 y sus subpoblaciones, entre los grupos <350 y >350 células T CD4 después de dos años con TAR.

	CD160		LAG-3		PD-1		PD-L1		TIGIT		TIM-3	
	<350 CD4	>350 CD4	<350 CD4	>350 CD4	<350 CD4	>350 CD4	<350 CD4	>350 CD4	<350 CD4	>350 CD4	<350 CD4	>350 CD4
Totales	ns	ns	ns	ns	p=0.001	p=0.0049	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Naive	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
TE	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
ME	ns	ns	ns	ns	p=0.001*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
MC	ns	ns	ns	ns	p=0.001*	p=0.0015*	ns	p=0.001*	ns	ns	ns	ns

Se usó la prueba estadística de Wilcoxon para la comparación de los porcentajes de la toma basal respecto a 2 años con TAR, estadística significativa $p < 0.01$, *porcentaje mayor en la toma basal respecto al porcentaje después de 2 años con TAR, ns (no significativo).

Al igual que en el análisis de los porcentajes de células T CD8 totales, no se observaron cambios en el porcentaje de células positivas a CD160, LAG-3, TIGIT y TIM-3. Se observó una reducción en el porcentaje de células T CD8 PD-1+ en la subpoblación ME a los dos años de TAR solo en el grupo de <350 CD4 ($p=0.001$) y en la subpoblación MC en ambos grupos de estudio ($p=0.001$, $p=0.0015$, <350 CD4 y >350 CD4 respectivamente) (Figura 10). Por último, se observó una reducción en el porcentaje de células T CD8 PD-L1+ posterior al uso del TAR únicamente en el grupo de >350 CD4 en la subpoblación MC ($p=0.001$).

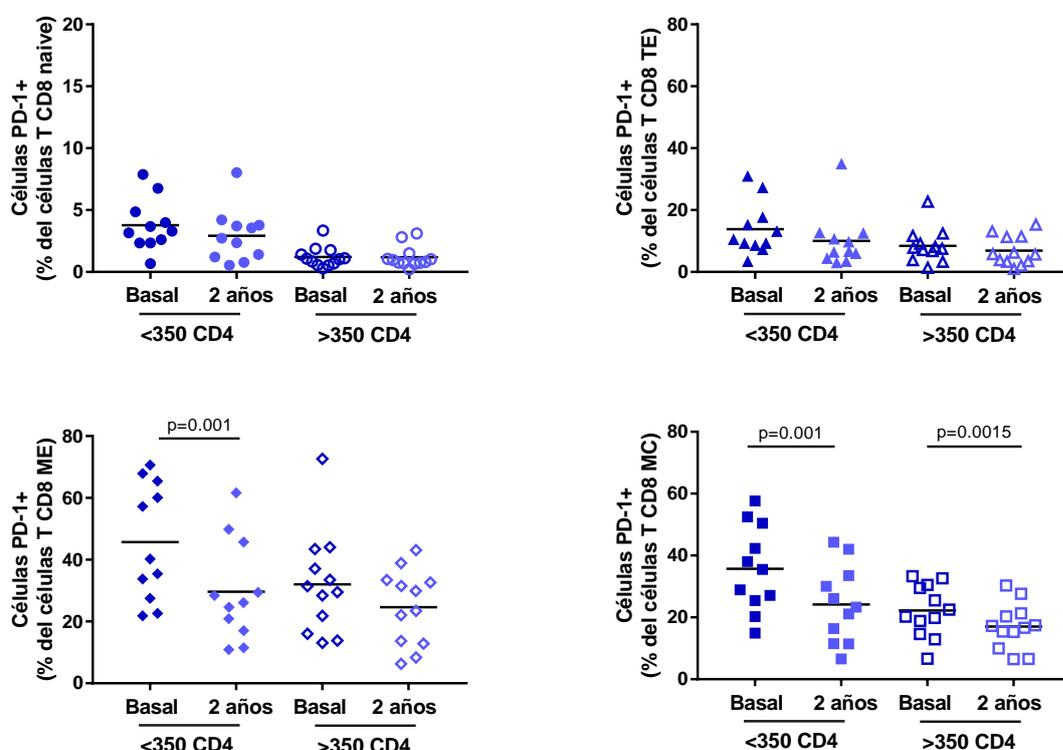


Figura 10. Porcentaje células PD-1+ en las subpoblaciones de células T CD8 después de 2 años de TAR. Células T CD8 naive (círculos), TE (triángulos, efectoras), ME (rombos, memoria efectora) y MC (cuadrado, memoria central) PD-1+, antes (colores oscuros) y después de 2 años con TAR (colores claros), en los grupos de <350 (figuras sólidas) y >350 (figuras vacías) células T CD4 antes del TAR. Se usó la prueba estadística de Wilcoxon para la comparación de los porcentajes de la toma basal respecto a 2 años con TAR, ($p<0.01$).

6.5 Respuesta específica a VIH antes y después del TAR

Para evaluar el porcentaje de las proteínas inmunoreguladoras en las células T CD8 específicas a VIH se estimularon CMSP con péptidos de la proteína Gag de VIH. Las células productoras de IFN γ fueron identificadas como células específicas a VIH.

Primeramente se evaluó el porcentaje de células específicas a VIH del total de células T CD8 y de sus subpoblaciones en ambos grupos de estudio (<350 CD4 y más de 350 CD4) antes del inicio del TAR (toma basal; Figura 11) y a los dos años con TAR (Figura 12).

En concordancia con otros reportes, el porcentaje de células T CD8 específicas a VIH en ambos grupos de estudio antes del inicio del TAR fue menor al 1%, 0.689% \pm 0.698 en el grupo con <350 CD4 y 0.30% \pm 0.438 en el grupo de >350 CD4 (Figura 11). La mayoría de las células específicas a VIH se encuentran distribuidas en las subpoblaciones ME 1.30% \pm 1.337 y 0.67% \pm 1.035 (en los grupos <350 CD4 y >350 CD4 respectivamente) y MC 1.62 % \pm 1.946 y 0.06% \pm 1.233 (en los grupos <350 CD4 y >350 CD4 respectivamente; Figura 11). No se encontraron diferencias significativas entre los porcentajes de células específicas a VIH entre ambos grupos de estudio por lo que inferimos que ambos grupos tienen el mismo porcentaje de células específicas a VIH antes del tratamiento antirretroviral.

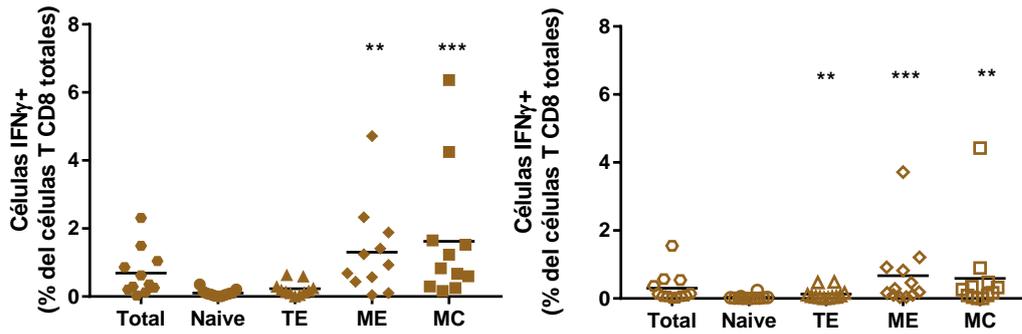


Figura 11. Porcentaje de células IFN γ + en las subpoblaciones de células T CD8 antes del TAR. Comparación del porcentaje de células IFN γ + (café) en linfocitos T CD8 totales (hexágonos) y en las subpoblaciones naive (círculos), TE (triángulos, efectoras), ME (rombo, memoria efectora) y MC (cuadrados, memoria central) entre los grupos de <350 (figuras sólidas) y >350 (figuras vacías) células T CD4 antes del TAR. Se usó la prueba estadística de Mann-Whitney para la comparación de los porcentajes de las subpoblaciones de células T CD8 respecto a la población naive. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.0001$.

El porcentaje de células T CD8 IFN γ + totales y en sus subpoblaciones, después de dos años de tratamiento antirretroviral (Figura 12) mostró una disminución de células específicas a VIH después de dos años de TAR en la subpoblación de MC, tanto en el grupo de <350 CD4 ($p = 0.001$) como en el de >350 CD4 ($p = 0.0005$). Así mismo, se observó una disminución de los linfocitos T CD8 totales específicos a VIH únicamente en el grupo que empezó TAR con >350 CD4 ($p = 0.0005$) con el mismo patrón observado en las subpoblaciones TE ($p = 0.0005$) y de ME ($p = 0.0005$).

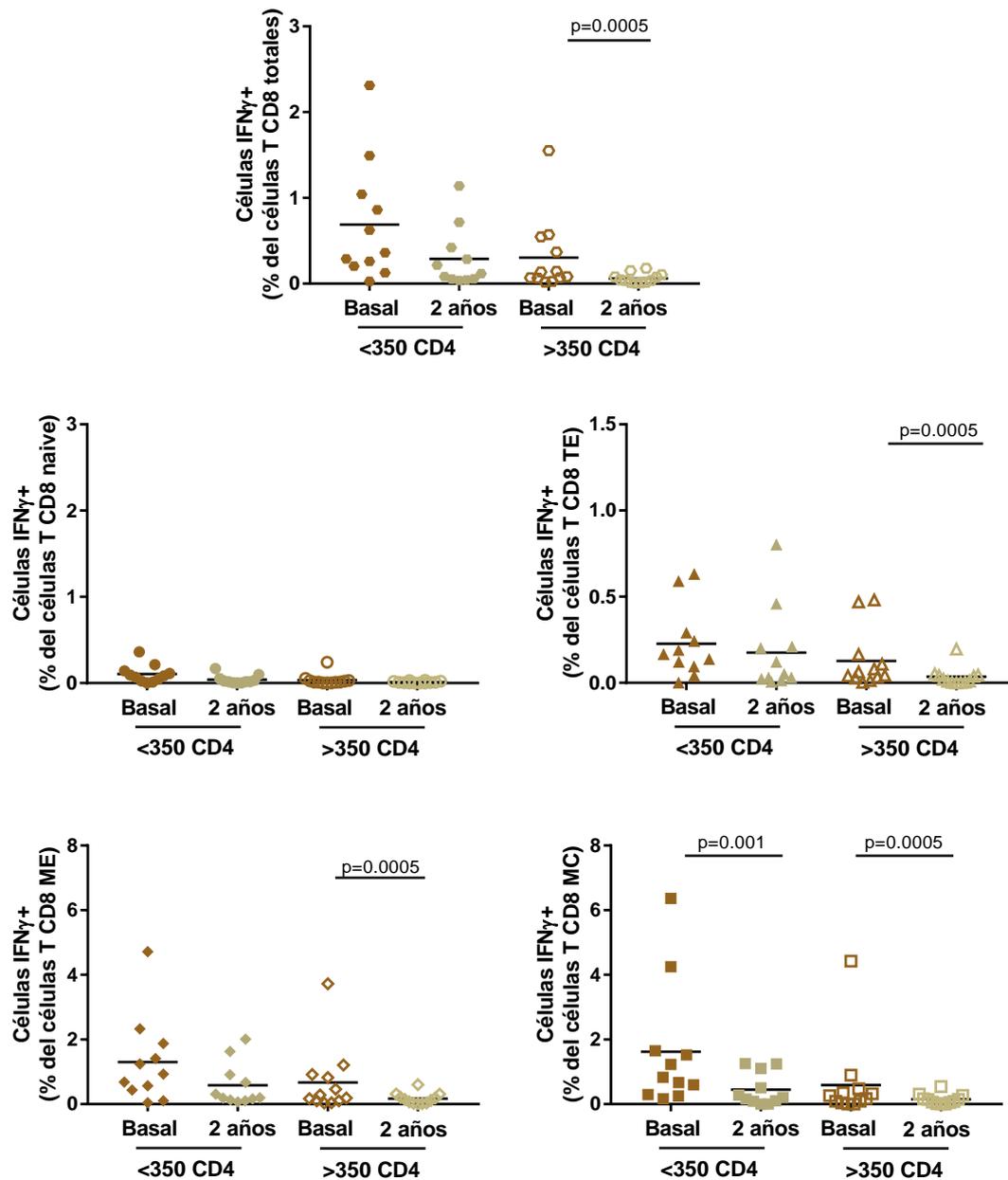


Figura 12. Porcentaje de células IFN γ + en las subpoblaciones de células T CD8 después de 2 años de TAR. Células T CD8 naive (círculos), TE (triángulos, efectoras), ME (rombos, memoria efectora) y MC (cuadrado, memoria central) IFN γ +, antes (colores oscuros) y después de 2 años de TAR (colores claros), en los grupos de <350 (figuras sólidas) y >350 (figuras vacías) células T CD4 antes del TAR. Se usó la prueba estadística de Wilcoxon para la comparación de los porcentajes de células específicas a VIH entre la toma basal y con dos años de TAR, ($p < 0.01$).

6.6 Expresión de las proteínas inmunoreguladoras en células específicas a VIH después del uso del TAR

Posteriormente, quisimos evaluar el impacto del TAR en la expresión de las proteínas inmunoreguladoras en las células T CD8 específicas a VIH después de 2 años de TAR (intensidad mediana de fluorescencia, MFI). No se encontraron diferencias significativas en la expresión de CD160, LAG-3, PD-L1 y TIM-3 en las células CD8 totales después de dos años de TAR, en ambos grupos (<350 CD4 y >350 CD4). Únicamente se observó una disminución en el MFI de PD-1 en células T CD8 totales, después de dos años de TAR, en el grupo de <350 CD4 ($p=0.0029$; Tabla 4).

Tabla 4. Comparación de la expresión de las proteínas inmunoreguladoras en células T CD8 específicas a VIH (IFN γ +) y sus subpoblaciones entre los grupos <350 y >350 células T CD4, después de dos años de TAR.

	Expresión relativa (IMF)											
	CD160		LAG-3		PD-1		PD-L1		TIGIT		TIM-3	
	<350 CD4	>350 CD4	<350 CD4	>350 CD4	<350 CD4	>350 CD4	<350 CD4	>350 CD4	<350 CD4	>350 CD4	<350 CD4	>350 CD4
Totales	ns	ns	ns	ns	p=0.0029*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
TE	ns	ns	p=0.0195*	p=0.0425*	p=0.0137*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
ME	ns	ns	p=0.0244*	p=0.0005*	p=0.042*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	p=0.0078*
MC	ns	ns	p=0.002*	p=0.0186*	p=0.0244*	p=0.0210	ns	ns	p=0.0322*	ns	ns	Ns

Se usó la prueba estadística de Wilcoxon para la comparación de los porcentajes de células específicas a VIH entre la toma basal y con dos años de TAR ($p < 0.05$), *disminución de la expresión de las proteínas inmunoreguladoras después de dos años con TAR, respecto a la toma basal, ns (no significativo).

Después de analizar los cambios en el MFI de las proteínas inmunoreguladoras en células T CD8 totales específicas a VIH entre la toma basal y después de dos años con TAR proseguimos a estudiar la expresión de estas proteínas en las subpoblaciones de linfocitos T CD8 específicos a VIH después de dos años con TAR (Tabla 4, Figuras 13 y 14). De todas las proteínas inmunoreguladoras estudiadas los principales cambios se encontraron en la expresión de LAG-3 y PD-1. Se encontró una disminución de la expresión de LAG-3 entre la toma basal y después de dos años con TAR en las subpoblaciones TE ($p=0.0273$ y $p=0.0425$, en los grupos <350 CD4 y >350 CD4, respectivamente), ME ($p=0.0244$ y $p=0.0005$, en los grupos <350 CD4 y >350 CD4, respectivamente) y MC ($p=0.002$ y $p=0.0186$ en los grupos de <350 CD4 y >350 CD4, respectivamente) (Tabla 4 y Figura 13).

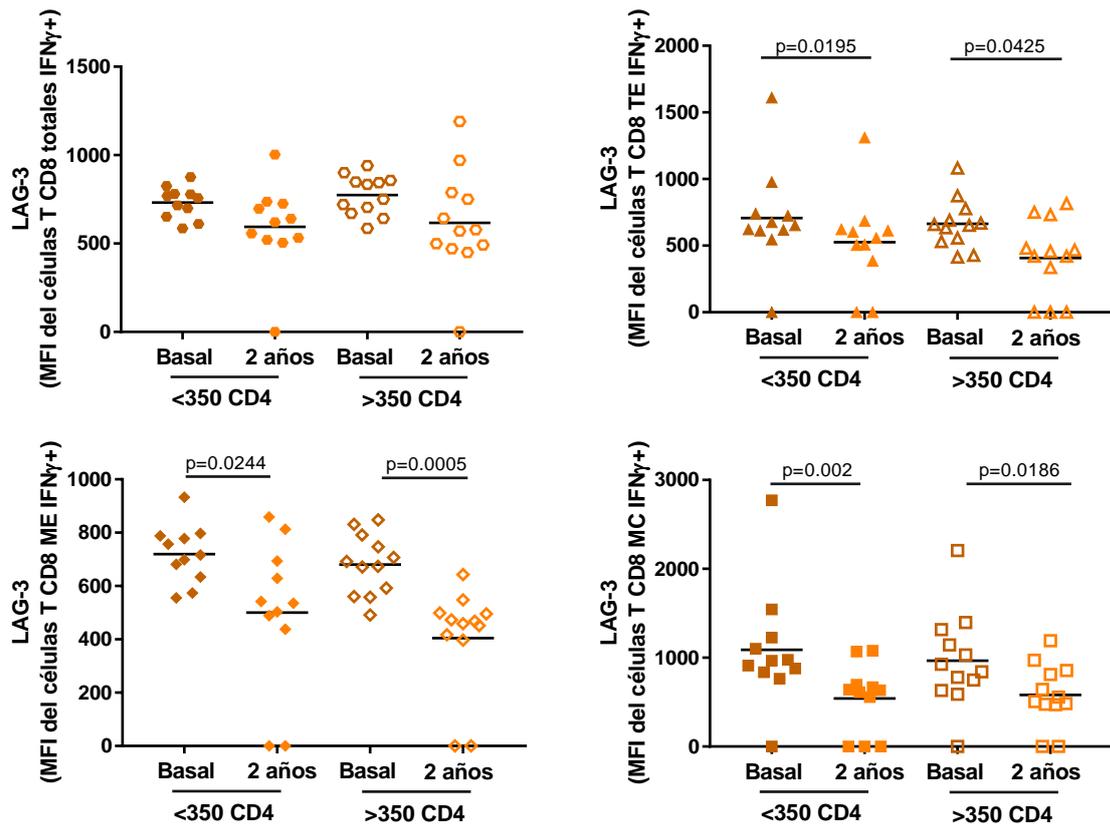


Figura 13. Expresión de LAG-3 en las subpoblaciones de células T CD8 específicas a VIH, después de 2 años de TAR. Células T CD8 totales (hexágonos), TE (triángulos, efectoras), ME (rombos, memoria efectora) y MC (cuadrados, memoria central) Toma basal (colores oscuros) y toma después de 2 años con TAR (colores claros), en los grupos de <350 (figuras sólidas) y >350 células T CD4 antes del TAR. Se usó la prueba estadística de Wilcoxon para la comparación de los porcentajes de células específicas a VIH entre la toma basal y con dos años de TAR ($p<0.05$).

La expresión de la proteína PD-1 disminuyó significativamente después del TAR, principalmente en el grupo que inició TAR con <350 CD4, en las subpoblaciones de células T CD8 específicas a VIH TE ($p= 0.0137$), ME ($p=0.042$) y MC ($p=0.0244$). En el grupo de >350 CD4, solo se observó la disminución de la expresión de PD-1 en las células T CD8 específicas a VIH de MC ($p=0.0210$) (Tabla 4 y Figura 14).

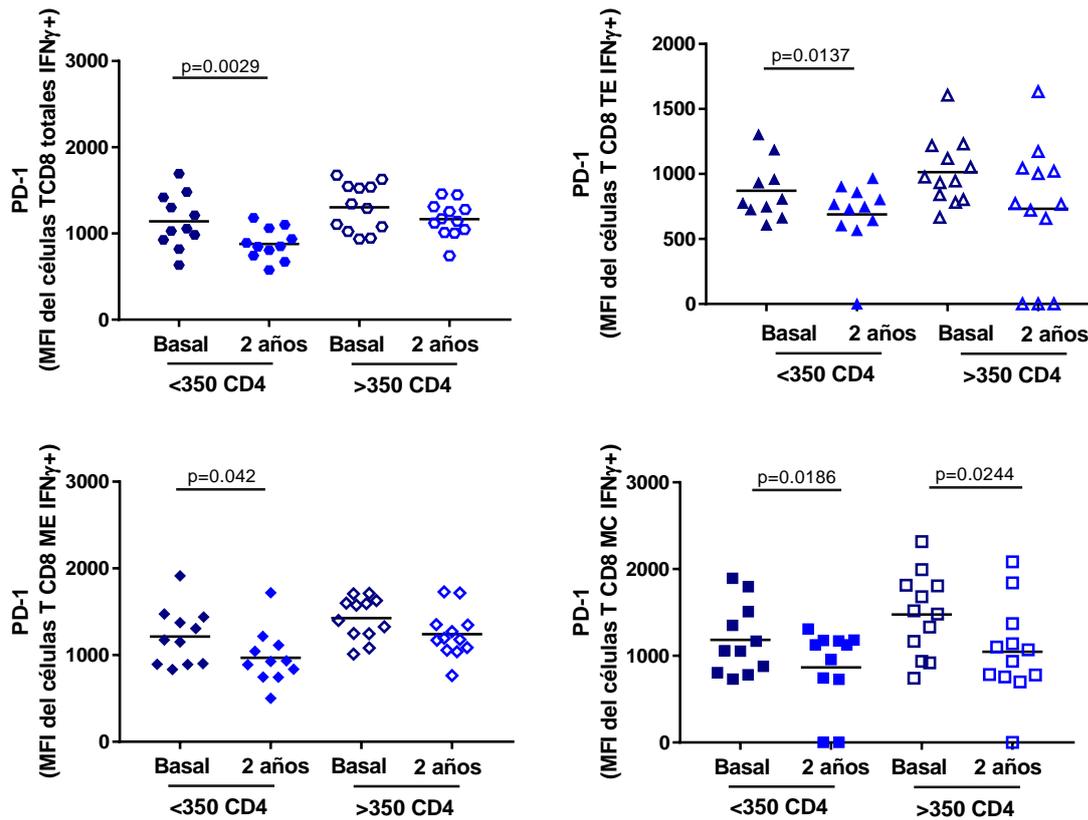


Figura 14. Expresión de PD-1+ en las subpoblaciones de células T CD8 específicas a VIH, después de 2 años de TAR. Células T CD8 totales (hexágonos), TE (triángulos, efectoras), ME (rombos, memoria efectora) y MC (cuadrados, memoria central) PD-1+ específicas a VIH (IFN γ +), antes (colores oscuros) y después de 2 años de TAR (colores claros), en los grupos de <350 (figuras sólidas) y >350 (figuras vacías) células T CD4 antes del TAR. Se usó la prueba estadística de Wilcoxon para la comparación de los porcentajes de células específicas a VIH entre la toma basal y con dos años de TAR ($p < 0.05$).

Por último, también se observó la disminución de la expresión de TIGIT en las células T CD8 específicas a VIH MC ($p=0.0322$) de los participantes que iniciaron TAR con <350 CD4 mientras la disminución de la expresión de TIM-3 se observó en las células T CD8 específicas a VIH ME en el grupo de <350 CD4 ($p=0.0078$; Tabla 4).

6.7 Activación por TCR en linfocitos T CD8 antes y durante el TAR, análisis de la expresión de CD69

Como se describió en la introducción, se sabe que existe una relación de las proteínas inmunoreguladoras y el estado de activación de los linfocitos T CD8 durante la infección por VIH. Para conocer si existe una asociación entre la expresión de las proteínas inmunoreguladoras y el estado de activación de las células T CD8 antes y durante el tratamiento antirretroviral, primero se analizó la expresión y el porcentaje de proteínas asociadas con activación (CD69, HLA-DR y CD38) y proliferación celular (Ki67) en las dos tomas de los grupos de estudio.

Encontramos que el porcentaje de linfocitos T CD8 CD69+ en el grupo <350 CD4 fue de 3.655% \pm 2.151 y de 3.983% \pm 3.42 en el grupo >350 CD4. No se encontraron diferencias significativas en la distribución de las células CD69+ en las subpoblaciones de células T CD8 (naive, TE, ME y MC) en ninguno de los dos grupos de estudio. Así mismo, encontramos que el número de células T CD4 con que se inicia el TAR (<350 CD4 y >350 CD4) no impacta en el porcentaje de células CD69+ de CD8 totales ni en sus subpoblaciones (naive, TE, TEM y TCM)

Para conocer el impacto del TAR en la expresión de CD69, se comparó el porcentaje de linfocitos T CD8 CD69+ antes y después de dos años de TAR (Figura 15). Se encontró una disminución del porcentaje de linfocitos T CD8 CD69+ en el grupo >350 CD4 ($p=0.0044$) posterior a dos años con TAR. Se observó también una disminución en el porcentaje de linfocitos T CD8 CD69+ posterior a dos años con TAR, en la subpoblación MC en ambos grupos de estudio ($p=0.0068$ y $p=0.0010$, <350 CD4 y >350 CD4 respectivamente).

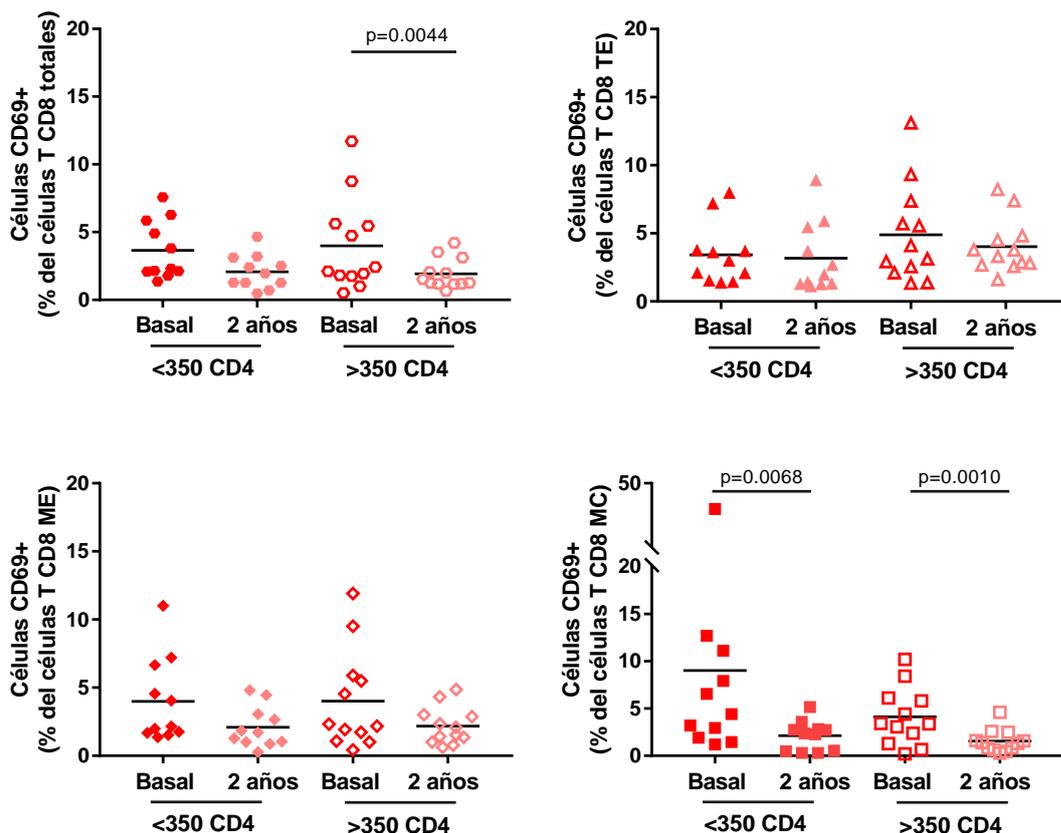


Figura 15. Porcentaje células CD69+ en las subpoblaciones de células T CD8 después de 2 años de TAR. Porcentaje de células CD69+ en células T CD8 totales (hexágonos), TE (triángulos, efectoras), ME (rombos, memoria efectora) y MC (cuadrados, memoria central), antes (colores oscuros) y después de 2 años con TAR (colores claros). Grupo que inició TAR con <350 (figuras sólidas) y con >350 (figuras vacías) células T CD4. Se usó la prueba estadística de Wilcoxon para la comparación de los porcentajes de células CD69+ entre la toma basal y con dos años de TAR ($p < 0.01$).

6.8 Marcadores de activación en células T CD8 antes y durante el TAR, análisis de la expresión de HLA-DR y CD38

Para evaluar la activación independiente de TCR de los linfocitos T CD8 se estudió el porcentaje de linfocitos T CD8 y sus subpoblaciones que fueron dobles positivos a HLA-DR y CD38 antes del TAR en ambos grupos de estudio (<350 CD4 y >350 CD4). En la toma basal, el porcentaje de linfocitos T CD8 HLA-DR+ CD38+ fue de $5.918\% \pm 4.981$ en el grupo <350 CD4 y de $9.023\% \pm 4.634$ en el grupo >350 CD4.

Por otra parte, en el grupo >350 CD4 se observó una distribución diferencial en el porcentaje de las células HLA-DR+ CD38+ de las subpoblaciones. Se encontró un mayor porcentaje de células HLA-DR+ CD38+ en la subpoblación TE ($p=0.0001$) y ME ($p=0.0001$) comparadas con las células naive. Por otra parte, observamos que el número de células T CD4 con que se inicia el TAR (<350 CD4 y >350 CD4) no influye en el porcentaje de células T CD8 HLA-DR+ CD38+ totales ni en el porcentaje de las células con marcadores de activación en las subpoblaciones de linfocitos T CD8 (naive, TE, TEM y TCM).

Para evaluar el impacto del TAR en la expresión de HLA-DR+ CD38+ se comparó el porcentaje de linfocitos T CD8 HLA-DR+ CD38+ antes y después de dos años de TAR (Figura 16). Se encontró una disminución del porcentaje de linfocitos T CD8 HLA-DR+ CD38+ en el grupo >350 CD4 después de dos años con TAR ($p=0.0005$, al comparar la toma basal). Se observó una disminución a dos años con TAR en el porcentaje de linfocitos T CD8 HLA-DR+ CD38+ en la subpoblación TE ($p=0.0024$) y ME ($p=0.0005$) en el grupo de >350 CD4 y en ambos grupos de estudio, en la subpoblación MC ($p=0.0068$ y $p=0.0005$, <350 CD4 y >350 CD4 respectivamente).

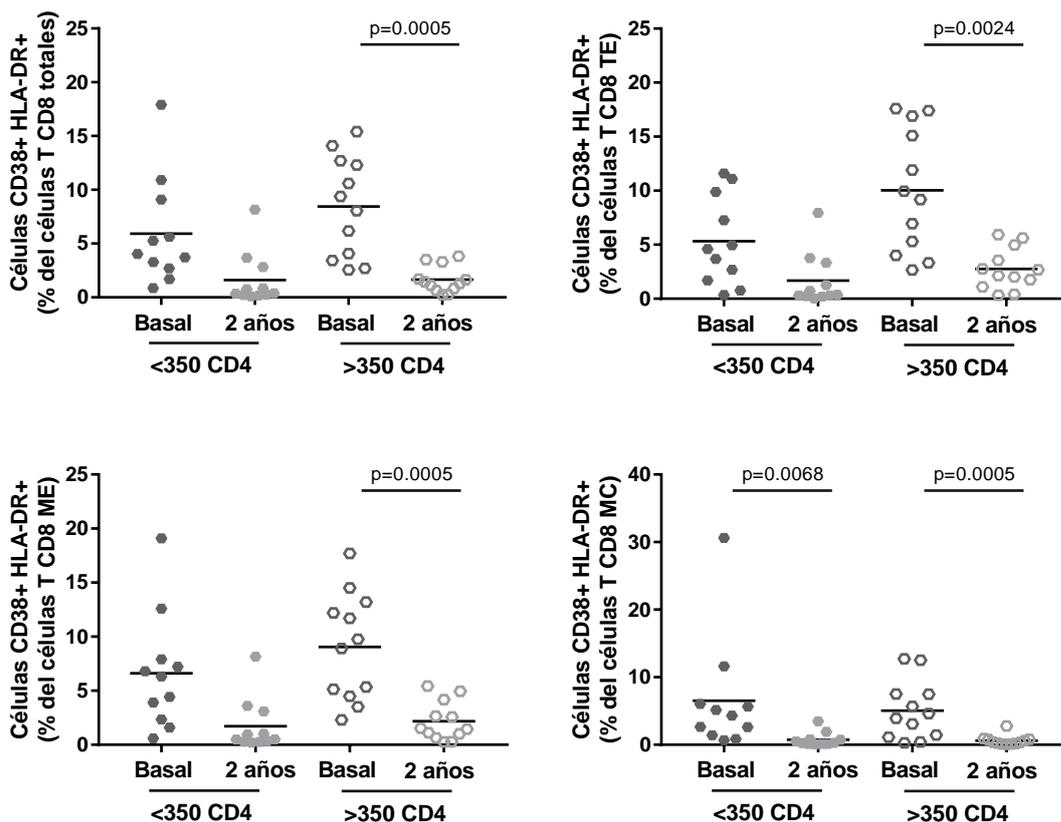


Figura 16. Porcentaje células HLA-DR+ CD38+ en las subpoblaciones de células T CD8, después de 2 años de TAR. Porcentaje de células T CD8 HLA-DR+ CD38+ totales (hexágonos), TE (triángulos, efectoras), ME (rombos, memoria efectora) y MC (cuadrados, memoria central) antes (colores oscuros) y después de 2 años con TAR (colores claros). Grupo que inició TAR con <350 (figuras sólidas) y con >350 (figuras vacías) células T CD4. Se usó la prueba estadística de Wilcoxon para la comparación de los porcentajes de células CD69+ entre la toma basal y con dos años de TAR.

6.9 Marcador de proliferación celular en linfocitos T CD8 antes y durante el TAR, análisis de la expresión de Ki67.

Una forma de evaluar la activación en linfocitos es mediante el estudio de marcadores de proliferación celular como Ki67, el cual ha sido estudiado tanto en activación por TCR y en activación bystander (no específica). Se analizó el porcentaje células Ki67+ en linfocitos T CD8 totales como en sus subpoblaciones en la muestra basal de ambos grupos de estudio (<350 CD4 y >350 CD4).

El porcentaje de linfocitos T CD8 Ki67+ fue de 1.292% (DS \pm 1.547) en el grupo <350 CD4 y de 0.3906% (DS \pm 0.3436) en el grupo >350 CD4, de acuerdo a lo reportado anteriormente. No se encontraron diferencias significativas en la distribución de las células Ki67+ en las subpoblaciones de linfocitos T CD8 en ninguno de los dos grupos de estudio. Se evaluó el impacto del número de células T CD4 con que se inicia TAR (<350 CD4 y >350 CD4) en la en el porcentaje de células T CD8 Ki67+, no se encontraron diferencias significativas entre el porcentaje de células T CD8 totales Ki67+ entre ambos grupos estudio (<350 CD4 y >350 CD4). Sin embargo, se encontró un porcentaje mayor de células Ki67+ en la subpoblación TE ($p=0.010$) y ME ($p=0.0007$) del grupo de >350 CD4, comparado con el grupo <350 CD4 en la toma basal.

También se encontró una disminución del porcentaje de linfocitos T CD8 Ki67+ en el grupo >350 CD4 ($p=0.0049$) posterior a dos años de TAR, disminución que se observó en la subpoblación de ME en el grupo de >350 CD4 ($p=0.0015$).

6.10 Asociación entre proteínas inmunoreguladoras y proteínas asociadas a activación en linfocitos T CD8, antes y después del TAR

Finalmente, para conocer si existe una asociación entre la expresión de proteínas inmunoreguladoras y proteínas asociadas a la activación en linfocitos T CD8 se realizaron correlaciones entre el porcentaje de células T CD8 positivas a PD-1, LAG-3 y TIGIT con el porcentaje de células T CD8 positivas a CD69, Ki67 y el porcentaje de dobles positivas a HLA-DR y CD38. Se decidió estudiar PD-1 y LAG-3 debido a que fueron las proteínas en las que se observó una disminución en la expresión en los linfocitos T CD8 posterior al TAR. Por otra parte, nos interesó

estudiar las asociaciones con TIGIT debido a que el porcentaje de células T CD8 TIGIT+ es de >50% antes del TAR y también posterior a este, por lo que es considerada un porcentaje alto.

En la toma basal se encontraron asociaciones del porcentaje de células T CD8 PD-1+ y LAG-3+ con las proteínas asociadas a activación en los linfocitos T CD8 antes del TAR (Figura 17). Se observó una asociación positiva del porcentaje de células T CD8 totales PD-1+ con el porcentaje de células T CD8 totales Ki67+ ($p=0.0017$, $r=0.494$), con la subpoblación TE ($p=0.043$, $r=0.425$). También se encontró una correlación positiva entre el porcentaje de células T CD8 totales LAG-3+ y las células T CD8 totales CD69+ ($p=0.00468$, $r=0.568$) y en las subpoblaciones TE ($p=0.01314$, $r=0.0509$) y ME ($p=0.0386$, $r=0.434$).

Por último, las asociaciones encontradas después de dos años con TAR fueron entre el porcentaje de células T CD8 totales TIGIT+ y el porcentaje de células T CD8 totales CD69+ ($p=0.001$, $r=0.649$), y en las subpoblaciones TE ($p=0.015$, $r=0.521$), ME ($p=0.011$, $r=0.520$) y MC ($p=0.014$, $r=0.507$; Figura 18). También se encontró una asociación positiva del porcentaje de células T CD8 totales TIGIT+ y el porcentaje de células T CD8 totales dobles positivas a HLA-DR y CD38 ($p=0.032$, $r=0.449$), y en la subpoblación TE ($p=0.010$, $r=0.521$) y MC ($p=0.0001$, $r=0.711$).

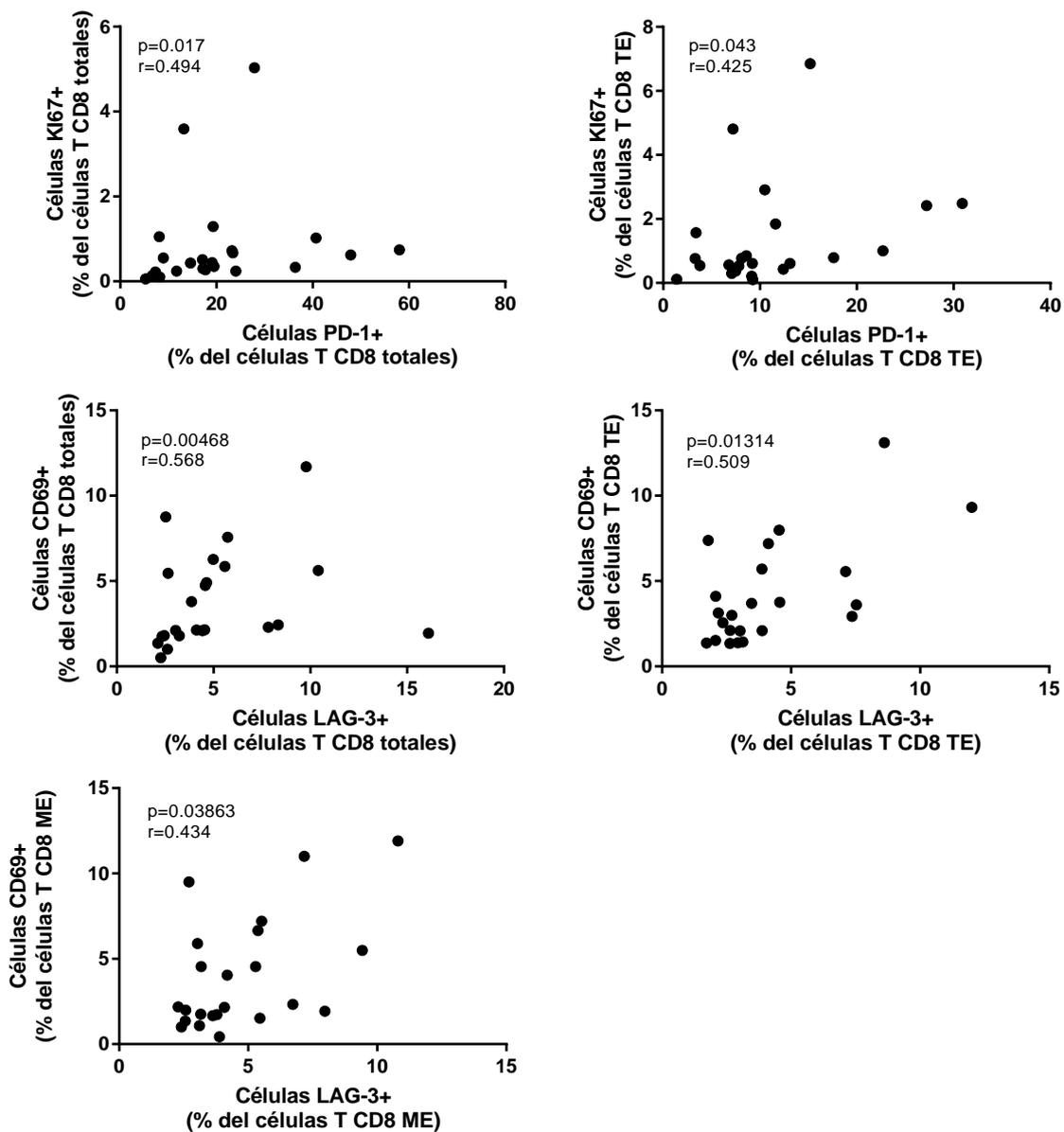


Figura 17. Asociación entre proteínas inmunoreguladoras y marcadores asociados a activación en la toma basal. Correlación entre el porcentaje de linfocitos T CD8 PD-1+ y LAG-3+ con y células Ki67+ y CD69+ en células totales y en las subpoblaciones TE (efectora) y ME (memoria efectora) en la toma basal. Se utilizó la prueba de correlación de Spearman, ($p < 0.05$).

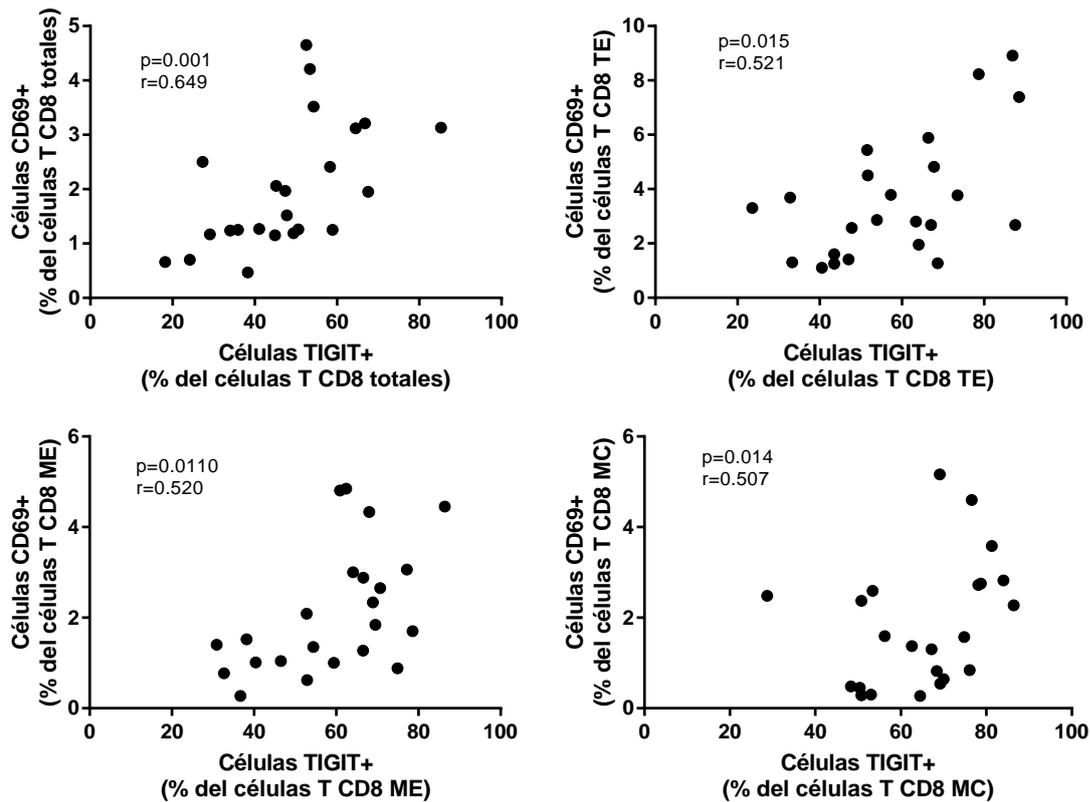


Figura 18. Asociación entre el porcentaje de células TIGIT+ con las células CD69+ en linfocitos T CD8 después del TAR. Correlación entre el porcentaje de linfocitos T CD8 TIGIT+ y CD69+ en células T CD8 totales y en sus subpoblaciones TE (efectora), ME (memoria efectora) y MC (memoria central) después de dos años de TAR. Se utilizó la prueba de correlación de Spermán, ($p < 0.05$).

7 Discusión

Se ha reportado que en infecciones crónicas, como la infección por VIH, la respuesta de las células T CD8 o CTL es afectada por la exposición prolongada al antígeno, la desensibilización a las vías de co-estimulación y el microambiente pro-inflamatorio (El-Far et al. 2014; Kahan, Wherry, y Zajac 2015; Khaitan y Unutmaz 2011; Pauken y Wherry 2015; Seddiki, Brezar, y Draenert 2014; Wykes y Lewin 2017). Esto provoca la pérdida de producción de citocinas antivirales, de la pérdida de capacidad citotóxica, disminución de la capacidad proliferativa y el aumento de la expresión de proteínas

inmunoreguladoras o co-inhibidoras, características de un fenotipo exhausto en células T (Boppana y Goepfert 2018; Gulzar y Copeland 2004; Kalams y Walker 1998).

Pese a que anteriormente se ha descrito el aumento en la expresión de proteínas co-inhibidoras en linfocitos T CD8 durante la infección por VIH (Khaitan y Unutmaz 2011; Seddiki, Brezar, y Draenert 2014; Wykes y Lewin 2017), pocos estudios han analizado la expresión simultánea de PD-1, PD-L1, Tim-3, Lag-3, TIGIT y CD160 en linfocitos T CD8 específicos a VIH, durante el tratamiento antirretroviral (TAR). En este estudio se encontró que la disminución de la carga viral debido al apego al TAR tiene un efecto positivo en la disminución de la expresión de PD-1 y LAG-3 en células T CD8. Por otra parte, se encontró una asociación positiva entre algunas proteínas inmunoreguladoras con proteínas asociadas a la activación de células T.

De acuerdo con reportes anteriores, la expresión de las proteínas inmunoreguladoras es diferencial entre las subpoblaciones de linfocitos T CD8 (Chew et al. 2016; Petrovas et al. 2006; Sakhdari et al. 2012; Tian et al. 2015; Trautmann et al. 2006; Yamamoto et al. 2011). Encontramos que el porcentaje de células positivas a las proteínas inmunoreguladoras fue mayor en las poblaciones TE, ME y MC, respecto a las células naive, lo cual está relacionado con la cinética de expresión de estas proteínas posterior a la activación celular (Joller y Kuchroo 2017; Larsson et al. 2013; Mujib et al. 2012; Odorizzi y Wherry 2012; Sharpe y Pauken 2017; Selena Vigano et al. 2014). En homeostasis, las proteínas co-inhibidoras comienzan a expresarse posterior a la activación celular y mantienen su expresión mientras esté presente el

antígeno (Correa-Rocha et al. 2018; Day et al. 2006; Jensen et al. 2015; Petrovas et al. 2006; Rutishauser et al. 2017; Trautmann et al. 2006; Yamamoto et al. 2011). En cambio, durante la infección por VIH, observamos un fenotipo exhausto caracterizado por el aumento continuo de la expresión de proteínas inmunoreguladoras.

Llama la atención que en este estudio se encontró un aumento en el porcentaje de linfocitos T CD8 PD-L1+ y TIM-3+ en la subpoblación naive. Durante la infección por VIH se han reportado niveles altos de TGF- β (Kekow et al. 1990; Navikas et al. 2008; Poli y Fauci 1992) y de acuerdo a algunos autores, esta citocina es capaz de inducir la expresión de PD-L1 en células T CD8 (Baas et al. 2016; C. Sun, Mezzadra, y Schumacher 2018). En este estudio se trabajó con muestras criopreservadas por lo que los niveles de algunas citocinas en el medio de cultivo podrían no ser comparables a los niveles en plasma. Sin embargo, surge la incógnita sobre si es posible que los niveles altos de TGF- β en plasma durante la infección por VIH pudieran provocar cambios metabólicos irreversibles en células T naive que induzcan la expresión sostenida de PD-L1.

La expresión de Tim-3 es inducida por las citocinas de cadena α común (IL-2, IL-7, IL-15, IL-21) (Mujib et al. 2012; Anderson, Joller, y Kuchroo 2016; Zhu, Anderson, y Kuchroo 2011), y durante la infección por VIH se han observado niveles altos de IL-7 e IL-15 (Freeman et al. 2016; Shive et al. 2016; Stacey et al. 2009). Por lo que de igual forma que en el caso de PD-L1, surge la incógnita sobre si la expresión elevada de Tim-3 en células T CD8 naive puede deberse a los altos niveles de IL-7 e IL-15 durante la infección por VIH, los

cuales podrían estar induciendo cambios metabólicos irreversibles en dicha subpoblación.

Cabe destacar que la proteína inmunoreguladora con mayor porcentaje de células T CD8 totales y en las subpoblaciones fue TIGIT (>50% de células positivas a TIGIT). Este porcentaje concuerda con lo reportado en células T CD8 de sangre durante la infección crónica y aguda de VIH (Chew et al. 2016; Tauriainen et al. 2017).

El conteo de células T CD4 con el que se inicia el TAR es un valor muy usado para evaluar la efectividad del tratamiento en individuos VIH+ así como una aproximación del estado inmunológico y de la etapa de la infección en la que se encuentran las personas que viven con VIH (O'Cofaigh y Lewthwaite 2013). Las células T CD4 cumplen un papel muy importante al orquestar la respuesta inmunológica (Murphy 2012) y la reducción de su número durante la infección por VIH se ha asociado con cambios en la expresión de proteínas implicadas en la activación y diferenciación de células T CD8 (Moir, Chun, y Fauci 2011). Sin embargo, de acuerdo a diversos autores, el conteo de células T CD4 no influye en el porcentaje de células T CD8 positivas las proteínas co-inhibidoras (Jensen et al. 2015; Rutishauser et al. 2017). El fenotipo exhausto en células T CD8 podría estar generado por factores independientes al grado de afectación del sistema inmunológico provocado por la infección por VIH. Una causa probable al fenotipo exhausto es el estado de activación residual observado durante algunas infecciones virales y bacterianas (Boyman 2010; Eberl, Brawand, y MacDonald 2000; Ehl et al. 1997; Lertmemongkolchai et al. 2001; Tough, Borrow, y Sprent 1996).

La evaluación del impacto del TAR en los linfocitos T CD8 con fenotipo exhausto permite comprender mejor el proceso de restauración de las funciones efectoras (Fenwick et al. 2019). En este estudio se observó la reducción del porcentaje de células PD-1+ en células T CD8 totales y en las subpoblación MC y ME en concordancia a lo reportado por otros (Correa-Rocha et al. 2018; Day et al. 2006; Petrovas et al. 2006; Trautmann et al. 2006). En estos estudios previos, la disminución de PD-1 correlaciona con la disminución de la carga viral por lo que se ha propuesto que el porcentaje de células T CD8 PD-1+ se asocia con la presencia del antígeno (Correa-Rocha et al. 2018; Day et al. 2006; Petrovas et al. 2006; Trautmann et al. 2006). Contrario a lo esperado, en este trabajo no se observó una reducción en el porcentaje de linfocitos T CD8 positivos a las demás proteínas inmunoreguladoras lo que sugiere que su expresión podría estar regulada por mecanismos independientes a la regulación de PD-1 (Hoffmann et al. 2016).

Las células T CD8 específicas a VIH fueron identificadas a partir de la producción de IFN γ posterior al estímulo con péptidos de Gag. Encontramos un porcentaje <1%, que concuerda con lo reportado por otros autores (Mollet et al. 2000; Y. Sun et al. 2003; Wilson et al. 2000). La mayoría de las células específicas se encontraron en las subpoblaciones de ME y MC en ambos grupos de estudio en concordancia con la biología de las células T, ya que las células naive no producen o casi no producen IFN γ debido a que no han sido activadas (de Araújo-Souza, Hanschke, y Viola 2015; Hosking, Flynn, y Whitton 2014). De acuerdo a lo esperado, también observamos una disminución en el

porcentaje de las células específicas a VIH al comparar con el porcentaje basal, lo que puede deberse a la disminución de la carga viral (Casazza et al. 2001; Mollet et al. 2000; Perdomo-Celis, Taborda, y Rugeles 2019; Rinaldo et al. 2000). La producción diferencial de IFN γ en las subpoblaciones de células T CD8 se mantuvo después de dos años con TAR.

Debido a que el porcentaje de las células específicas a VIH es menor al 1%, analizar el porcentaje de las células positivas a las proteínas inmunoreguladoras podría mostrar resultados imprecisos. Por esta razón se decidió analizar la expresión de las proteínas inmunoreguladoras determinado por la intensidad mediana de fluorescencia (MFI) (Gratama et al. 1998).

Al evaluar el efecto a dos años con TAR en la expresión de las proteínas inmunoreguladoras en las células específicas a VIH encontramos una reducción de la expresión de PD-1 en las células T CD8 totales y en las subpoblaciones TE, ME y MC, principalmente en el grupo de estudio <350 CD4. Es probable que únicamente observemos la reducción en este grupo de estudio debido a una menor capacidad de respuesta ante la estimulación. Por el contrario, el inicio del tratamiento con >350 CD4 está asociado con una mayor capacidad de las células T CD8 de señalizar a través del TCR y activarse (Perdomo-Celis, Taborda, y Rugeles 2019) y por lo tanto de aumentar la expresión de PD-1 ante la estimulación con péptidos de VIH.

Llama la atención que también fue posible observar una reducción de la expresión de LAG-3 en linfocitos T CD8 específicos a VIH en las subpoblaciones TE, ME y MC independientemente de la cantidad de células con las que se inició el TAR. Esto es destacable debido a que la expresión de

LAG-3 ha sido estudiada principalmente en células T CD4 ya que estructuralmente, LAG-3 es una proteína homóloga a CD4 (Larsson et al. 2013) y su expresión en linfocitos T CD4 está asociada al reservorio viral (Fromentin et al. 2016). Sin embargo, la relevancia de (Graydon, Balasko, y Fowke 2019) la expresión de LAG-3 en células T CD8 no se ha caracterizado. Se ha propuesto que el medio pro-inflamatorio característico de la infección por VIH aumenta la expresión de LAG-3 en los linfocitos T CD8, los cuales, al entrar en contacto con células T CD4 infectadas, pueden recibir señales inhibitorias a través de LAG-3 (Graydon, Balasko, y Fowke 2019). Se ha mostrado que linfocitos T CD4 infectados con VIH aumentan la producción de la proteína soluble Galectina-3 (Graydon, Balasko, y Fowke 2019), la cual es un ligando alternativo de LAG-3 (Long et al. 2018). Los linfocitos T CD8 específicos a VIH que expresan LAG-3 podrían recibir señales inhibitorias por la interacción con el ligando soluble, Galectina-3 (Graydon, Balasko, y Fowke 2019) y disminuir su capacidad de ejercer funciones efectoras. Por otra parte, la interacción de la célula CD8 con el linfocito T CD4 infectado a través de la sinapsis inmunológica TCR - MHC-I promueve la unión de LAG-3 con el ligando MHC-II presente en la membrana de linfocitos T CD4 (Graydon, Balasko, y Fowke 2019), produciendo una disminución en la respuesta antiviral de las células T CD8.

En este estudio observamos que la expresión de LAG-3 está aumentada en las células específicas a VIH en las subpoblaciones TE, ME y MC, las cuales están encargadas de ejercer funciones efectoras para la eliminación de células infectadas. Sin embargo, es probable que las células T CD8 específicas a VIH que entran en contacto con células infectadas, reciban señales inhibitorias a través de los mecanismos ya mencionados. Por lo que el tratamiento, al

disminuir la carga viral y con ello la cantidad de células infectadas, produce una disminución en la expresión de LAG-3 en los linfocitos T CD8.

Por tanto es probable que el TAR tenga un efecto positivo en las células específicas a VIH al reducir la expresión de las proteínas inmunoreguladoras LAG-3 y PD-1. Esto podría reflejarse en la reducción del estado disfuncional de linfocitos T CD8 y la restauración parcial del sistema inmunológico en conjunto con la disminución del ambiente pro-inflamatorio como resultado de la adhesión al TAR.

Por otra parte, en esta tesis nos interesamos en determinar si existen asociaciones entre las proteínas inmunoreguladoras y marcadores asociados a activación. Para ello, se evaluaron los marcadores asociados a activación en linfocitos T CD8 totales en la toma basal y posterior a dos años con TAR, mediante la determinación y caracterización de los marcadores CD69, HLA-DR (Reddy et al. 2004; Shipkova y Wieland 2012) y CD38 (Quarona et al. 2013; Sandoval-Montes y Santos-Argumedo 2005). Además evaluamos de forma indirecta la capacidad proliferativa de los linfocitos T CD8 con el marcador Ki67 (Shipkova y Wieland 2012; X. Sun y Kaufman 2018).

CD69 es una proteína asociada a la activación del linfocito por la vía del TCR, pertenece a las proteínas de activación de expresión temprana, es decir, es posible detectar transcritos del gen de CD69 a los 30-60 minutos y detectar la proteína en membrana posterior a 2-3 horas de la señalización por el TCR (Pitsios et al. 2008; Ziegler, Ramsdell, y Alderson 1994). En condiciones de homeostasis, CD69 mantiene una expresión constante hasta por tres días, y

disminuye con la ausencia del antígeno (Ziegler et al. 1993; Ziegler, Ramsdell, y Alderson 1994). Posterior a su expresión, se ha observado un aumento en la producción de citocinas como IL-2, IL-12 y TNF- α , así como un aumento del flujo intracelular de Ca²⁺ y un aumento en la señalización por mTOR (Cibrián y Sánchez-Madrid 2017; Sancho, Gómez, y Sánchez-Madrid 2005). La expresión de CD69 en linfocitos T dada la activación por TCR está asociada con cambios metabólicos relacionados con procesos de proliferación, supervivencia y diferenciación de los linfocitos T (Cibrián y Sánchez-Madrid 2017).

Se ha reportado un aumento en la expresión de CD69 en células T CD8 de individuos VIH+ sin TAR y una disminución de la expresión de CD69 después del inicio del TAR (Pitsios et al. 2008). En este estudio encontramos que el porcentaje de células T CD8 totales CD69+ disminuye a los dos años de tratamiento en el grupo que inició tratamiento con >350 CD4 y en la subpoblación de MC en ambos grupos de estudio. La disminución de CD69 en el grupo >350 CD4 durante el TAR puede deberse a una menor afectación del sistema inmunológico por la infección de VIH debido a un mayor número de células T CD4, las cuales regulan la activación de las células T CD8. Es probable que la disminución de la carga viral durante el TAR pudiera tener como consecuencia una disminución de la expresión de CD69 en linfocitos T CD8 y esta pudiera estar relacionada con la cantidad de células T CD4 con que se inicia el tratamiento.

Durante la infección por VIH también se ha reportado la expresión aumentada de los marcadores de asociados a activación en células T CD8 HLA-DR y

CD38 (Gonzalez, Taborda, y Rugeles 2017). Las células T CD8 HLA-DR+ CD38+ exhiben importantes funciones efectoras durante la infección aguda de VIH relacionadas con el control de la carga viral, como alta proliferación, citotoxicidad y producción de citocinas con actividad antiviral (Gonzalez, Taborda, y Rugeles 2017). Sin embargo, si el estado de activación durante la fase crónica de la infección por VIH se mantiene de forma sostenida es posible observar la pérdida de funciones y de la capacidad proliferativa de las células T, así como un aumento de la expresión de proteínas inmunoreguladoras (Gonzalez, Taborda, y Rugeles 2017).

CD38 es una glicoproteína de membrana que se expresa de forma constitutiva en linfocitos, la expresión de CD38 es alta en timocitos y disminuye posterior a la maduración de los linfocitos T (Malavasi et al. 1992). Se ha reportado que CD38 tiene actividad ectoenzimática que induce transducción de señales y también actúa como una proteína de adhesión (Savarino et al. 2000). La expresión de CD38 aumenta en linfocitos T efectoras y de memoria (Savarino et al. 2000) y es inducida por estímulos mitogénicos como la citocina IL-2 (Sandoval-Montes y Santos-Argumedo 2005). Debido a esto, la expresión de CD38 no está asociada estrictamente a una activación por TCR y representa un reflejo de activación independiente del TCR. La proteína CD38 en linfocitos T activados se ha asociado a un aumento en la producción de IL-6 (Savarino et al. 2000), IFN γ , IL-10, IL-2 y con el aumento en la expresión de CD25 (Malavasi et al. 1992), así como con la proliferación celular y producción de mediadores implicados en la regulación del Ca²⁺ y NAD⁺ intracelular (Savarino et al. 2000).

En relación con HLA-DR, esta es una molécula de MCH de clase II considerada un marcador de activación tardío. Su expresión aumenta posterior a 3-5 días de la activación (Shipkova y Wieland 2012) y puede ser inducida tanto por la activación del TCR o de forma independiente de este (Palacios 1982). Su expresión en linfocitos T ha sido asociada a la expresión de CD25 y a la proliferación celular (Caruso et al. 1997).

En este estudio encontramos que el mayor porcentaje de células dobles positivas CD38+ HLA-DR+ se encuentra en las subpoblaciones efectora y de ME y de MC, en concordancia con lo reportado anteriormente (L. Kestens et al. 2008). Al evaluar el efecto TAR en las células T CD8 dobles positivas a CD38+ HLA-DR+ encontramos una reducción del porcentaje de células positivas a ambas proteínas posterior a dos años de TAR principalmente en el grupo >350 CD4. La disminución de los porcentajes de células T CD8 CD38+ HLA-DR+ durante el TAR se ha asociado con una disminución en la carga viral y principalmente con el conteo y la restauración de la población de linfocitos T CD4 (Gonzalez, Taborda, y Rugeles 2017; Luc Kestens et al. 1992; Ruggiero et al. 2018; Tilling et al. 2002).

Una forma alternativa de evaluar la activación celular y proliferación celular es mediante la determinación de la expresión de la proteína Ki67 la cual tiene dominios de unión a la cromatina y ha sido asociada a la regulación del ciclo celular, el mantenimiento de la heterocromatina y el ensamblaje de la capa pericromosómica en los cromosomas mitóticos (X. Sun y Kaufman 2018). Ki67

se expresa principalmente durante la fase S del ciclo celular, por lo que es un marcador comúnmente usado para evaluar la proliferación celular (Juríková et al. 2016; Sales Gil y Vagnarelli 2018). En nuestros análisis hallamos que el porcentaje de células T CD8 positivas a Ki67 fue igual en todas las subpoblaciones en la toma basal. Esto podría indicar una nula o casi nula expansión de las células T CD8, lo que otros autores han atribuido al aumento de las proteínas inmunoreguladoras durante la infección por VIH (Boppana y Goepfert 2018; Gulzar y Copeland 2004; Kalams y Walker 1998). Al evaluar el efecto del TAR en la expresión de Ki67, encontramos una disminución del porcentaje de células T CD8 positivas a Ki67 únicamente en el grupo que inició tratamiento con >350 CD4 en la subpoblación TE. Esto nos podría indicar que el estado del sistema inmunológico antes del TAR es determinante en la regulación del ciclo celular de los linfocitos T CD8. Sin embargo, es importante recordar que la expresión de Ki67 en los linfocitos T no es un indicador totalmente certero de proliferación celular, por lo que para evaluarla de forma precisa sería necesario realizar un ensayo de proliferación celular.

Con los resultados observados respecto a los marcadores asociados a activación podemos afirmar que el TAR tiene un efecto positivo en la disminución de la activación crónica en linfocitos T CD8, que podría estar asociado a la disminución de la carga viral con la consecuente regulación parcial del ambiente pro-inflamatorio producido por la viremia y la muerte exacerbada de células T CD4.

Por último, se estudiaron las asociaciones de las proteínas inmunoreguladoras y los marcadores asociados a activación en linfocitos T CD8 en la toma basal y posterior a dos años con TAR. Interesantemente, en la toma basal, encontramos asociaciones positivas entre PD-1 y Ki67 en linfocitos T CD8 totales y en la subpoblación TE, mientras que LAG-3 y CD69 mostraron una asociación positiva en linfocitos T CD8 totales y ME. En estudios previos se ha correlacionado Ki67 y PD-1 con la expansión de células T CD8 con fenotipo efector y con la carga viral (Day et al. 2006). Esta asociación podría ser un indicativo de activación y expansión celular como respuesta a la replicación del virus más que a fenotipo exhausto (Breton et al. 2013).

La asociación positiva entre LAG-3 y CD69 en células T CD8 no se ha reportado en el contexto de la infección por VIH. Sin embargo, los resultados aquí mostrados, son contradictorios respecto a lo reportado por Macon-Lemaitre y colaboradores, quienes observaron una asociación negativa entre ambos marcadores en muestras *ex vivo* de donadores sanos (Macon-Lemaitre y Triebel 2005). Estas incongruencias podrían deberse a las diferencias metodológicas realizadas entre ambas investigaciones. En esta tesis, se evaluaron las asociaciones de los marcadores en el contexto de la infección por VIH, por lo que los resultados observados podrían adjudicarse a la desregulación en la activación de linfocitos T CD8 durante la infección por VIH. Así, la expresión de LAG-3 podría estar asociada a un estado de activación celular promovido por la carga viral en conjunto con la señalización del TCR. Llama la atención que posterior al uso del TAR las asociaciones con LAG-3 no fueron encontradas, pero si se encontró una asociación positiva entre el

porcentaje de células TIGIT+ con CD69 en células totales y las subpoblaciones TE, ME y MC, y la asociación del porcentaje de TIGIT con el porcentaje de células HLADR+ CD38+ en las subpoblaciones TE y TCM.

La asociación de CD69 con TIGIT no ha sido descrita en el contexto de la infección por VIH y el TAR. La asociación de estas proteínas podría deberse a una activación de linfocitos T CD8, que en el contexto del TAR, no sería mediada directamente por la carga viral sino también por la translocación de productos bacterianos del intestino a la sangre. Se ha reportado que la estimulación de TLR con LPS induce la expresión de CD69 en linfocitos T CD8 en el contexto de la infección por VIH (Funderburg et al. 2008). El tejido linfoide asociado a mucosa intestinal (GALT) es gravemente afectado desde la fase aguda de la infección por VIH. Como consecuencia se ha reportado la translocación de productos bacterianos como el LPS hacia la sangre en individuos en fase crónica y en individuos con TAR lo cual provoca un estado de activación crónica del sistema inmunológico (Marchetti, Tincati, y Silvestri 2013; Moir, Chun, y Fauci 2011; Nazli et al. 2010; Sandler y Douek 2012). Por lo que la expresión de TIGIT en linfocitos T CD8 podría estar asociada a la translocación de productos bacterianos y a la activación crónica producto de esta. Para comprobarlo se podría comparar la expresión TIGIT y de marcadores de activación en células T CD8 de individuos con o sin TAR a las que se inhiba la señalización por TLR-4 y sean estimuladas con LPS. Además de hacer asociaciones de TIGIT y los marcadores de activación con LPS en plasma.

Como se mencionó anteriormente, la expresión de CD38 y HLA-DR puede ser inducida por la activación inespecífica mediada por citocinas, independiente a la señalización del TCR (Palacios 1982; Sandoval-Montes y Santos-Argumedo 2005). La asociación del porcentaje de células T CD8 TIGIT+ con el porcentaje de células T CD8 HLA-DR+ CD38+, podría ser producto de la activación celular inespecífica. Por lo que la asociación TIGIT y HLA-DR/CD38, podría permitir la evaluación de la activación inespecífica en la infección por VIH.

De forma muy interesante, nuestros resultados nos permiten hacer las siguientes suposiciones: 1) los mecanismos de regulación de la expresión de las proteínas inmunoreguladoras son diferentes e independientes entre sí; 2) la expresión de PD-1 y LAG-3 podría estar asociada a la activación por TCR, mientras que la expresión de TIGIT podría estar asociada a una activación inespecífica.

Una limitante de este estudio es que no fue posible evaluar los marcadores de activación en las células específicas a VIH por lo que estas suposiciones se realizan a partir del análisis de células T CD8 totales.

Finalmente, a partir de estos datos surge la incógnita sobre la existencia de patrón de expresión de las proteínas inmureguladoras antes y después del TAR. Para responder esta pregunta, podrían realizarse análisis bioinformáticos para el análisis de la co-expresión de las proteínas inmunoreguladoras.

8 Conclusiones

Durante la infección por VIH se ha observado el aumento de la expresión de proteínas inmunoreguladoras en células T CD8, lo cual está asociado con la pérdida y disminución de su capacidad proliferativa y de ejercer funciones efectoras. Este fenómeno es producto del cansancio celular y de factores característicos de infecciones virales crónicas. El objetivo de este estudio fue determinar si el uso TAR tiene un impacto positivo en la reducción de la expresión de las proteínas inmunoreguladoras en células específicas a VIH. Encontramos que el TAR tiene un efecto positivo al reducir la expresión de PD-1 y LAG-3 en células específicas a VIH (IFN γ +). Por otra parte, encontramos asociaciones de las proteínas inmunoreguladoras con marcadores asociados a activación en linfocitos T CD8 antes y después del TAR. Destaca un patrón aparentemente asociado a la activación por TCR en la toma basal y con activación inespecífica posterior al TAR. Como perspectivas de este estudio, el análisis bioinformático de la co-expresión de las proteínas inmunoreguladoras permitiría determinar la existencia de un patrón de expresión diferencial entre la toma basal y posterior al TAR. Por último, el uso de anticuerpos específicos contra las proteínas inmunoreguladoras y el análisis de la polifuncionalidad de los linfocitos T CD8, permitirían estudiar si es posible restaurar el fenotipo exhausto o si afectaría en la activación de las células T CD8.

9 Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por la Comisión de Equidad y Género de las Legislaturas LX-LXI, y por la Comisión de Igualdad de la Legislatura LXII de la H. Cámara de Diputados de la República Mexicana.

A los participantes de los protocolos que sin su apoyo este proyecto no podría haberse llevado a cabo.

Al equipo médico y clínico del Departamento de Investigación en Enfermedades Infecciosas del INER.

Al grupo de investigación de la Dra. Perla M. Del Río y al Dr. Gustavo Reyes Terán, por la oportunidad y el apoyo para la realización de este proyecto.

10 Referencias

- Abbas, Abul, Andrew Lichtman, y Shiv Pillai. 2015. *Inmunología celular y molecular*. 8va Edición. España: El Sevier.
- Ahmed, Zahra, Tsunayoshi Kawamura, Shinji Shimada, y Vincent Piguet. 2015. «The Role of Human Dendritic Cells in HIV-1 Infection». *Journal of Investigative Dermatology* 135: 1225-33.
- Alam, Saydul, Hongling Li, Andriana Margariti, Daniel Martin, Anna Zampetaki, Ouassila Habi, Gillian Cockerill, Yanhua Hu, Qingbo Xu, y Lingfang Zeng. 2011. «Galectin-9 Protein Expression in Endothelial Cells Is Positively Regulated by Histone Deacetylase 3». *The Journal of Biological Chemistry* 286 (51): 44211-17.
- Anderson, Ana, Nicole Joller, y Vijay Kuchroo. 2016. «Lag-3, Tim-3, and TIGIT co-inhibitory receptors with specialized functions in immune regulation». *Immunity* 17 (44): 989-1004.
- Araújo-Souza, Patrícia S. de, Steffi C. H. Hanschke, y João P. B. Viola. 2015. «Epigenetic Control of Interferon-Gamma Expression in CD8 T Cells». *Journal of Immunology Research* 2015: 1-7. <https://doi.org/10.1155/2015/849573>.
- Arnoczy, Gretchen, Guido Ferrari, Nilu Goonetilleke, Tumena Corrah, Hui Li, Joann Kuruc, John Schmitz, et al. 2012. «Massive CD8 T Cell Response to Primary HIV Infection in the Setting of Severe Clinical Presentation». *AIDS Research and Human Retroviruses* 28 (8): 789-92.
- Arts, Eric, y Daria Hazuda. 2012. «HIV-1 Antiretroviral Drug Therapy». *Cold Spring Harbor Laboratory Press* 2 (a007161).
- Avery, Lyndsay, Jessica Filderman, Andrea Szymczak-Workman, y Lawrence Kane. 2018. «Tim-3 co-stimulation promotes short-lived effector T cells, restricts memory precursors, and is dispensable for T cell exhaustion». *PNAS*.

- Avila-Ríos, Santiago, Claudia García-Morales, Daniela Garrido-Rodríguez, Christopher Ormsby, Ramón Hernández-Juan, Jaime Andrade-Villanueva, Luz González-Hernández, Indiana Torres-Escobar, Samuel Navarro-Álvarez, y Gustavo Reyes-Terán. 2011. «National Prevalence and Trends of HIV Transmitted Drug Resistance in Mexico». *PLoS ONE* 6 (11).
- Azuma, Takeshi, Sheng Yao, Gefeng Zhu, Andrew Flies, Sarah Flies, y Lieping Chen. 2008. «B7-H1 is a ubiquitous antiapoptotic receptor on cancer cells». *Blood* 111 (7): 3635-43.
- Baas, Marije, Alix Besançon, Tania Goncalves, Fabrice Valette, Hideo Yagita, Birgit Sawitzki, Hans-Dieter Volk, et al. 2016. «TGFβ-Dependent Expression of PD-1 and PD-L1 Controls CD8+ T Cell Anergy in Transplant Tolerance». *ELife* 5 (enero).
<https://doi.org/10.7554/eLife.08133>.
- Berger, Kristin, y Jeffrey Pu. 2018. «PD-1 pathway and its clinical application: A 20 year journey after discovery of the complete human PD-1 gene». *Gene* 638: 20-25.
- Bhardwaj, Nina, Florian Hladik, y Susan Moir. 2012. «The immune response to HIV». Poster Nature Reviews Immunology.
- Boles, Kent, William Vermi, Fabio Facchetti, Anja Fuchs, Timothy Wilson, Thomas Diacovo, Marina Cella, y Marco Colonna. 2009. «A novel molecular interaction for the adhesion of follicular CD4 T cells to follicular DC». *European Journal of Immunology* 39: 695-703.
- Boppana, Sushma, y Paul Goepfert. 2018. «Understanding the CD8 T-cell response in natural HIV control». *F100Research* 985.
- Boyman, Onur. 2010. «Bystander Activation of CD4 T Cells: HIGHLIGHTS». *European Journal of Immunology* 40 (4): 936-39. <https://doi.org/10.1002/eji.201040466>.
- Bree, Godelieve, y Rebecca Lynch. 2016. «B cells in HIV pathogenesis». *Current Opinion Infectious Diseases* 29: 23-30.
- Breton, Gaëlle, Nicolas Chomont, Hiroshi Takata, Rémi Fromentin, Jeffrey Ahlers, Abdelali Filali-Mouhim, Catherine Riou, et al. 2013. «Programmed Death-1 Is a Marker for Abnormal Distribution of Naive/Memory T Cell Subsets in HIV-1 Infection». *The Journal of Immunology* 191 (5): 2194-2204. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1200646>.
- Cai, Guifang, y Gordon Freeman. 2009. «The CD160, BTLA, LIGHT/HVEM pathway: a bidirectional switch regulating T-cell activation». *Immunological Reviews* 229: 244-58.
- Campbell, Edward, y Thomas Hope. 2015. «HIV-1 capsid: the multifaceted key player in HIV-1 infection». *Nature Reviews Microbiology* 13: 471-83.
- Caruso, A., S. Licenziati, M. Corulli, A.D. Canaris, M.A. De Francesco, S. Fiorentini, L. Peroni, et al. 1997. «Flow Cytometric Analysis of Activation Markers on Stimulated T Cells and Their Correlation with Cell Proliferation». *Cytometry* 27 (1): 71-76.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0320\(19970101\)27:1<71::AID-CYTO9>3.0.CO;2-O](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0320(19970101)27:1<71::AID-CYTO9>3.0.CO;2-O).
- Casazza, Joseph P., Michael R. Betts, Louis J. Picker, y Richard A. Koup. 2001. «Decay Kinetics of Human Immunodeficiency Virus-Specific CD8+ T Cells in Peripheral Blood after Initiation of Highly Active Antiretroviral Therapy». *Journal of Virology* 75 (14): 6508-16.
<https://doi.org/10.1128/JVI.75.14.6508-6516.2001>.
- CENSIDA. 2018. «Boletín: Día Mundial del SIDA». CENSIDA.
- . 2020. «Boletín: Día Mundial del SIDA», CENSIDA.
- Chattopadhyay, Pratip K., y Mario Roederer. 2010. «Good Cell, Bad Cell: Flow Cytometry Reveals T-Cell Subsets Important in HIV Disease». *Cytometry Part A* 77A (7): 614-22.
<https://doi.org/10.1002/cyto.a.20905>.
- Chen, Lieping, y Dallas Flies. 2013. «Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition». *Nature Reviews Immunology* 13.
- Chevalier, Mathieu, Céline Didier, Pierre-Marie Girard, Maria Manea, Pauline Campa, Françoise Barré-Sinoussi, Daniel Scott-Algara, y Laurence Weiss. 2016. «CD4 T-Cell Responses in Primary HIV Infection: Interrelationship with Immune Activation and Virus Burden». *Frontiers in immunology* 7 (395).

- Chew, Glen, Tsuyoshi Fujita, Gabriela Webb, Benjamin Burwitz, Helen Wu, Jason Reed, Katherine Hammond, et al. 2016. «TIGIT Marks Exhausted T Cells, Correlates with Disease Progression, and Serves as a Target for Immune Restoration in HIV and SIV Infection». *PLoS Pathogens*.
- Cibrián, Danay, y Francisco Sánchez-Madrid. 2017. «CD69: From Activation Marker to Metabolic Gatekeeper». *European Journal of Immunology* 47 (6): 946-53. <https://doi.org/10.1002/eji.201646837>.
- Ciuffi, A. 2016. «The benefits of integration». *Clinical Microbiology and Infection* 22: 324–332.
- Cochrane, Alan. 2011. «Human Immunodeficiency Virus». En *Fundamentals of Molecular Virology*, de Nicholas Acheson, 2da edición, 354-58. Estados Unidos de América: Wiley.
- Comité Consultivo Alemán de Sangre (Arbeitskreis Blut), Subgrupo 'Evaluación de Patógenos. 2016. «Human Immunodeficiency Virus (HIV)». *Transfusion Medicine and Hemotherapy* 43: 203-22.
- Córdoba, José, Samuel Ponce de León, y José Valdespino, eds. 2009. *25 años de SIDA en México: Logros, desaciertos y retos*. 2da Edición. México: Instituto Nacional de Salud Pública.
- Correa-Rocha, Rafael, Jacobo Lopez-Abente, Carolina Guitierrez, Verónica Pérez-Ferández, Adrián Prieto-Sánchez, Santiago Moreno-Guillen, María-Ángeles Muñoz-Fernández, y Marjorie Pion. 2018. «CD72/CD100 and PD-1/PD-L1 markers are increased on T and B cells in HIV-1+ viremic individuals, and CD72/CD100 axis is correlated with T-cell exhaustion». *PLoS ONE*.
- Day, Cheryl, D.E Kaufmann, Photini Kiepela, Julia Brown, Eshia Moodley, Sharon Reddy, Elizabeth Mackey, et al. 2006. «PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression». *Nature* 443: 350-54.
- Deeks, Steve, Julie Overbaugh, Andrew Philips, y Susan Buchbinder. 2015. «HIV infection». *Nature Reviews* 1: 1-22.
- Dotish, Gilad, y Wamer Greene. 2016. «Dissecting How CD4 T Cells Are Lost During HIV Infection». *Cell Host & Microbe* 19: 280-91.
- Du, Wenwen, Min Yang, Abbey Turner, Chunling Xu, Robert Ferris, Jianan Huang, Lawrence Kane, y Bin Feng Lu. 2017. «TIM-3 as a Target for Cancer Immunotherapy and Mechanisms of Action». *International Journal of Molecular Sciences* 18 (645).
- Eberl, Gérard, Pierre Brawand, y H. Robson MacDonald. 2000. «Selective Bystander Proliferation of Memory CD4+ and CD8+ T Cells Upon NK T or T Cell Activation». *The Journal of Immunology* 165 (8): 4305-11. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.165.8.4305>.
- Ehl, Stephan, Joachim Hombach, Peter Aichele, Hans Hengartner, y Rolf M. Zinkernagel. 1997. «Bystander Activation of Cytotoxic T Cells: Studies on the Mechanism and Evaluation of In Vivo Significance in a Transgenic Mouse Model». *Journal of Experimental Medicine* 185 (7): 1241-52. <https://doi.org/10.1084/jem.185.7.1241>.
- Eisele, Evelyn, y Robert Siliciano. 2012. «Redefining the Viral Reservoirs that Prevent HIV-1 Eradication». *Immunity* 37: 377-88.
- El-Far, Mohamed, Rabih Halwani, Elias Said, Lydie Trautmann, Mehrnoosh Doroudchi, Loury Janbazian, Simone Fonseca, et al. 2008. «T-cell Exhaustion in HIV Infection». *Current HIV/AIDS Reports* 5: 13-19.
- El-Far, Mohamed, Charles Pellerin, Louise Pilote, Jean-Francois Fortin, Ivan Lessard, Yoav Peretz, Elizabeth Wardrop, et al. 2014. «CD160 isoforms and regulation of CD4 and CD8 T-cell responses». *Journal of Translational Medicine* 12 (217).
- Espíndola, Milena, Luana Soares, Leonardo Galvao-Lima, Fabiana Zambuzi, Maira Cacemiro, Veronica Brauer, y Fabiani Frantz. 2016. «HIV infection: focus on the innate immune cells». *Immunology Research*.

- Fenwick, Craig, Victor Joo, Patricia Jacquier, Alessandra Noto, Riddhima Banga, Matthieu Perreau, y Giuseppe Pantaleo. 2019. «T-cell Exhaustion in HIV Infection». *Immunological Reviews* 292 (1): 149-63. <https://doi.org/10.1111/imr.12823>.
- Fettig, Jade, Mahesh Swaminathan, Christopher Murrill, y Jonathan Keplan. 2014. «Global Epidemiology of HIV». *Infect Dis Clin North Am* 28 (3): 323-37.
- Freed, Eric. 2015. «HIV-1 assembly, release and maturation». *Nature Reviews Microbiology*, 1-13.
- Freeman, Michael L., Carey L. Shive, Thao P. Nguyen, Souheil-Antoine Younes, Soumya Panigrahi, y Michael M. Lederman. 2016. «Cytokines and T-Cell Homeostasis in HIV Infection». *Journal of Infectious Diseases* 214 (suppl 2): S51-57. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw287>.
- Fromentin, Rémi, Wendy Bakeman, Mariam B. Lawani, Gabriela Khoury, Wendy Hartogensis, Sandrina DaFonseca, Marisela Killian, et al. 2016. «CD4+ T Cells Expressing PD-1, TIGIT and LAG-3 Contribute to HIV Persistence during ART». Editado por Daniel C. Douek. *PLoS Pathogens* 12 (7): e1005761. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005761>.
- Fujita, Tsuyoshi, Benjamin Burwitz, Glen Chew, Jason Reed, Reesab Pathak, Elizabeth Seger, Kiera Clayton, et al. 2014. «Expansion of Dysfunctional Tim-3–Expressing Effector Memory CD8+ T Cells during Simian Immunodeficiency Virus Infection in Rhesus Macaques». *Journal of Immunology* 193: 5576-83.
- Funderburg, Nicholas, Angel A. Luciano, Wei Jiang, Benigno Rodriguez, Scott F. Sieg, y Michael M. Lederman. 2008. «Toll-Like Receptor Ligands Induce Human T Cell Activation and Death, a Model for HIV Pathogenesis». Editado por Derya Unutmaz. *PLoS ONE* 3 (4): e1915. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001915>.
- Gonzalez, Sandra Milena, Natalia Andrea Taborda, y María Teresa Rugeles. 2017. «Role of Different Subpopulations of CD8+ T Cells during HIV Exposure and Infection». *Frontiers in Immunology* 8 (agosto). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00936>.
- Grabmeier-Pfistershammer, Katharina, Carmen Stecher, Markus Zettl, Sandra Roskopf, Armin Rieger, Gerhard Zlabinger, y Peter Steinberger. 2017. «Antibodies targeting BTLA or TIM-3 enhance HIV-1 specific T cell responses in combination with PD-1 blockade». *Clinical Immunology* 183: 167-73.
- Gratama, Jan W., Jean-Luc D'hautcourt, Frank Mandy, Gregor Rothe, David Barnett, George Janossy, Stefano Papa, Gerd Schmitz, Rodica Lenkei, y The European Working Group on Clini. 1998. «Flow Cytometric Quantitation of Immunofluorescence Intensity: Problems and Perspectives». *Cytometry* 33 (2): 166-78. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0320\(19981001\)33:2<166::AID-CYTO11>3.0.CO;2-S](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0320(19981001)33:2<166::AID-CYTO11>3.0.CO;2-S).
- Graydon, Colin G., Allison L. Balasko, y Keith R. Fowke. 2019. «Roles, Function and Relevance of LAG3 in HIV Infection». Editado por Tom C. Hobman. *PLoS Pathogens* 15 (1): e1007429. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007429>.
- Gulzar, Naveed, y Karen Copeland. 2004. «CD8+ T-Cells: Function and Response to HIV Infection». *Current HIV Research* 2: 23-37.
- Haining, Nicholas. 2012. «Thinking inside the box: how T cell inhibitory receptors signal». *Nature Medicine* 18 (9): 1394-1400.
- Hamelaar, Joris. 2012. «The origin and diversity of the HIV-1 pandemic». *Trends in Molecular Medicine* 18 (3): 182-92.
- . s. f. «Implications of HIV diversity for the HIV-1 pandemic». *Journal of Infection* 66 (2012): 391-400.
- Hoffmann, Matthias, Nikos Pantazis, Genevieve Martin, Stephen Hickling, Jacob Hurst, Jodi Meyerowitz, Christian Willberg, et al. 2016. «Exhaustion of Activated CD8 T Cells Predicts Disease Progression in Primary HIV-1 Infection». *PLoS Pathogens*.
- Hosking, Martin P., Claudia T. Flynn, y J. Lindsay Whitton. 2014. «Antigen-Specific Naive CD8+ T Cells Produce a Single Pulse of IFN- γ In Vivo within Hours of Infection, but without

- Antiviral Effect». *The Journal of Immunology* 193 (4): 1873-85.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1400348>.
- Hu, Wei-Shau, y Stephen Hughes. 2012. «HIV-1 Reverse Transcription». *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*.
- Hu, Zhiliang, Zhenwu Luo, Zhuang Wan, Hao Wu, Wei Li, Tong Zhang, y Wei Jiang. 2015. «HIV-associated memory B cell perturbations». *Vaccine* 33 (22): 2524-29.
- Jensen, Sanne, Anders Fomsgaard, Tine Larsen, Jeanette Tingstedt, Jan Gerstoft, Gitte Kronborg, Court Pedersen, y Ingrid Karlsson. 2015. «Initiation of Antiretroviral Therapy (ART) at Different Stages of HIV-1 Disease Is Not Associated with the Proportion of Exhausted CD8+ T Cells». *PLoS ONE*.
- Joller, Nicole, y Vijay Kuchroo. 2017. «Tim-3, Lag-3, and TIGIT». *Current Topics in Microbiology and Immunology* 410: 127-56.
- Jones, Brad, Lishomwa Ndhlovu, Jason Barbour, Premeet Sheth, Aashish Jha, Brian Long, Jessica Wong, et al. 2008. «Tim-3 expression defines a novel population of dysfunctional T cells with highly elevated frequencies in progressive HIV-1 infection». *Journal of Experimental Medicine* 205 (12): 2763-79.
- Jossefsson, Sarah, Kanutte Huse, Arne Kolstad, Klaus Beiske, Daniela Pende, Chloé Steen, Else Indeberg, et al. 2018. «T Cells Expressing Checkpoint Receptor TIGIT Are Enriched in Follicular Lymphoma Tumors and Characterized by Reversible Suppression of T-cell Receptor Signaling». *Clinical Cancer Research* 24 (4): 870-81.
- Juríková, Miroslava, Ľudovít Danihel, Štefan Polák, y Ivan Varga. 2016. «Ki67, PCNA, and MCM Proteins: Markers of Proliferation in the Diagnosis of Breast Cancer». *Acta Histochemica* 118 (5): 544-52. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2016.05.002>.
- Kahan, Shannon, John Wherry, y Allan Zajac. 2015. «T cell exhaustion during persistent viral infections». *Virology* 479-480: 180-93.
- Kalams, Spyros, y Bruce Walker. 1998. «The Critical Need for CD4 Help in Maintaining Effective Cytotoxic T Lymphocyte Responses». *Journal of Experimental Medicine* 188 (12): 2199-2204.
- Karn, Jonathan, y Martin Stoltzfus. 2012. «Transcriptional and Posttranscriptional Regulation of HIV-1 Gene Expression». *Cold Spring Harbor Laboratory Press* 4 (a006916): 1-17.
- Kaye, Jonathan. 2008. «CD160 and BTLA: LIGHTs out for CD4+ T cells». *Nature Immunology* 9 (2): 122-24.
- Keir, Mary, Manish Butte, Gordon Freeman, y Arlene Sharpe. 2008. «PD-1 and Its Ligands in Tolerance and Immunity». *The Annual Review of Immunology* 26: 677-704.
- Kekow, J., W. Wachsman, J. A. McCutchan, M. Cronin, D. A. Carson, y M. Lotz. 1990. «Transforming Growth Factor Beta and Noncytopathic Mechanisms of Immunodeficiency in Human Immunodeficiency Virus Infection.» *Proceedings of the National Academy of Sciences* 87 (21): 8321-25.
<https://doi.org/10.1073/pnas.87.21.8321>.
- Kestens, L., G. Vanham, C. Vereecken, M. Vandenbrouaene, G. Vercauteren, R. L. Colebunders, y P. L. Gigase. 2008. «Selective Increase of Activation Antigens HLA-DR and CD38 on CD45RO+ T Lymphocytes during HIV-1 Infection». *Clinical & Experimental Immunology* 95 (3): 436-41. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.1994.tb07015.x>.
- Kestens, Luc, Guido Vanham, Paul Gigase, Gloria Young, Irene Hannel, Francis Vanlangendonck, Frank Hulstaert, y Bruce Allen Bach. 1992. «Expression of Activation Antigens, HLA-DR and CD38, on CD8 Lymphocytes during HIV-1 Infection»: *AIDS* 6 (8): 793-98. <https://doi.org/10.1097/00002030-199208000-00004>.
- Khaitan, Alka, y Derya Unutmaz. 2011. «Revisiting Immune Exhaustion During HIV Infection». *Current HIV/AIDS Reports* 8 (1): 4-11.
- Killian, Scott, Fernando Teque, Robert Walker, Paul Meltzer, y Keith Killian. 2013. «CD8+ Lymphocytes Suppress Human Immunodeficiency Virus 1 Replication by Secreting Type I Interferons». *Journal of Interferon and Cytokine Research* 33 (11): 632-45.

- Kinter, Audrey, Emily Godbout, Jonathan McNally, Irini Sereti, Gregg Roby, Marie O'Shea, y Anthony Fauci. 2008. «The Common α -Chain Cytokines IL-2, IL-7, IL-15, and IL-21 Induce the Expression of Programmed Death-1 and Its Ligands». *The Journal of Immunology* 181: 6738-46.
- Kuiken, Carla, Brian Foley, Preston Marx, Steven Wolinsky, Thomas Leitner, Beatrice Hahn, Francince McCutchan, y Bette Korber, eds. 2008. *HIV Sequence Compendium*. Estados Unidos de América: Theoretical Biology and Biophysics.
- Kythreotou, Anthousa, Abdul Siddique, Francesco Mauri, Mark Bower, y David Pinato. 2017. «PD-L1». *Journal of Clinical Pathology* 0: 1-6.
- Langford, Simone, Jintanat Ananworachinich, y David Cooper. 2007. «Predictors of disease progression in HIV infection: a review». *AIDS Research and Therapy* 4 (1).
- Larsson, Marie, Esaki Shankar, Karlhans Che, Alireza Saeidi, Rada Ellegard, Muttiah Barathan, Vijayakumar Velu, y Adeeba Kamarulzaman. 2013. «Molecular signatures of T-cell inhibition in HIV-1 infection». *Retrovirology* 10 (31).
- Le Bouteiller, Philippe, Julie Tabiasco, Beata Polgar, Noemi Kozma, Jerome Giustiniani, Johan Siewiera, Alain Berrebi, Maryse Aguerre-Gir, Armand Bensussan, y Nabila Jabrane-Ferrat. 2011. «CD160: A unique activating NK cell receptor». *Immunology Letters* 138: 93-96.
- Lemey, Philippe, Oliver Pybus, Bin Wang, Nitin Saxena, Marco Salemi, y Ane-Mieke Vandamme. 2003. «Tracing the origin and history of the HIV-2 epidemic». *PNAS* 100 (1): 6588-92.
- Lertmemongkolchai, Ganjana, Guifang Cai, Christopher A. Hunter, y Gregory J. Bancroft. 2001. «Bystander Activation of CD8+ T Cells Contributes to the Rapid Production of IFN- γ in Response to Bacterial Pathogens». *The Journal of Immunology* 166 (2): 1097-1105. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.166.2.1097>.
- Li, Nianyu, Creg Workman, Stefani Martin, y Dario Vignali. 2004. «Biochemical Analysis of the Regulatory T Cell Protein Lymphocyte Activation Gene-3 (LAG-3; CD223)». *The Journal of Immunology* 173: 6806-12.
- Long, Long, Xue Zhang, Fuchun Chen, Qi Pan, Pronnaphat Phiphatwatchara, Yuyang Zeng, y Honglei Chen. 2018. «The promising immune checkpoint LAG-3: from tumor microenvironment to cancer immunotherapy». *Genes & Cancer* 9 (5-6): 176-89.
- Macon-Lemaitre, Laetitia, y Frederic Triebel. 2005. «The Negative Regulatory Function of the Lymphocyte-Activation Gene-3 Co-Receptor (CD223) on Human T Cells». *Immunology* 115 (2): 170-78. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2005.02145.x>.
- Maier, Michael, Sebastian Seth, Niklas Czeloth, Quan Qiu, Inga Ravens, Elisabeth Kremmer, Maria Ebel, et al. 2007. «The adhesion receptor CD155 determines the magnitude of humoral immune responses against orally ingested antigens». *European Journal of Immunology* 37: 2214-25.
- Malavasi, Fabio, Ada Funaro, Massimo Alessio, Lucia B. DeMonte, Clara M. Ausiello, Umberto Dianzani, Francesco Lanza, Elisabetta Magrini, Monica Momo, y Stefano Roggero. 1992. «CD38: A Multi-Lineage Cell Activation Molecule with a Split Personality». *International Journal of Clinical & Laboratory Research* 22 (1-4): 73-80. <https://doi.org/10.1007/BF02591400>.
- Manier, Nicholas, Eugene Chiang, y Jane Grogan. 2017. «TIGIT: A Key Inhibitor of the Cancer Immunity Cycle». *Trends in Immunology* 38 (1): 20-28.
- Marchetti, Giulia, Camilla Tincati, y Guido Silvestri. 2013. «Microbial Translocation in the Pathogenesis of HIV Infection and AIDS». *Clinical Microbiology Reviews* 26 (1): 2-18. <https://doi.org/10.1128/CMR.00050-12>.
- McMichael, Andrew, Persephone Borrow, Georgia Tomaras, Nile Goonetilleke, y Barton Haynes. 2010. «The immune response during acute HIV-1 infection: clues for vaccine development». *Nature Reviews Immunology* 10: 11-23.

- Mitchell, RS, BF Beitzel, SRW Schroder, P Shinn, y H Chen. 2004. «Retrovirus Integration into the Human Genome». *PLoS Biology* 2 (8): 1045.
- Moir, Susan, Tae-Wook Chun, y Anthony S. Fauci. 2011. «Pathogenic Mechanisms of HIV Disease». *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* 6 (1): 223-48. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-011110-130254>.
- Moir, Susan, y Anthony Fauci. 2017. «B-cell responses to HIV infection». *Immunological Reviews* 275: 33-48.
- Mollet, Lucile, Tai-Sheng Li, Assia Samri, Claire Tournay, Roland Tubiana, Vincent Calvez, Patrice Debré, Christine Katlama, y Brigitte Autran. 2000. «Dynamics of HIV-Specific CD8+ T Lymphocytes with Changes in Viral Load». *The Journal of Immunology* 165 (3): 1692-1704. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.165.3.1692>.
- Mujib, Shariq, Brad Jones, Calvin Lo, Nasra Aidarus, Kiera Clayton, Ali Sakhdari, Erika Benko, Colin Kovacs, y Mario Ostrowski. 2012. «Antigen-Independent Induction of Tim-3 Expression on Human T Cells by the Common γ -Chain Cytokines IL-2, IL-7, IL-15, and IL-21 Is Associated with Proliferation and Is Dependent on the Phosphoinositide 3-Kinase Pathway». *The Journal of Immunology* 188: 3745-56.
- Munawwar, Arshi, y Sarman Singh. 2016. «Human Herpesviruses as Copathogens of HIV Infection, Their Role in HIV Transmission, and Disease Progression». *Journal of Laboratory Physicians* 8 (1): 5-18.
- Murphy, Kenneth. 2012. *Janeway's Immunobiology*. 8va Edición. Estados Unidos de América: Garland Science.
- Muscate, Franziska, Nadine Stetter, Christoph Schramm, Julian Wiesch, Lidia Bosurgi, y Thomas Jacobs. 2018. «HVEM and CD160: Regulators of Immunopathology During Malaria Blood-Stage». *Frontiers in immunology* 9 (2611).
- Mylvaganam, Geetha, Lynette Chea, Gregory Tharp, Sekeenah Hicks, Vijayakumar Velu, Smita Iyer, Claire Deleage, et al. 2018. «Combination anti-PD-1 and antiretroviral therapy provides therapeutic benefit against SIV». *JCI Insight* 3 (18).
- Navikas, V., J. Link, B. Wahren, Ch. Persson, y H. Link. 2008. «Increased Levels of Interferon-Gamma (IFN- γ), IL-4 and Transforming Growth Factor-Beta (TGF- β) mRNA Expressing Blood Mononuclear Cells in Human HIV Infection». *Clinical & Experimental Immunology* 96 (1): 59-63. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.1994.tb06230.x>.
- Nazli, Aisha, Olivia Chan, Wendy N. Dobson-Belaire, Michel Ouellet, Michel J. Tremblay, Scott D. Gray-Owen, A. Larry Arsenaault, y Charu Kaushic. 2010. «Exposure to HIV-1 Directly Impairs Mucosal Epithelial Barrier Integrity Allowing Microbial Translocation». Editado por Thomas J. Hope. *PLoS Pathogens* 6 (4): e1000852. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000852>.
- O'Cofaigh, Emma, y Penny Lewthwaite. 2013. «Natural history of HIV and AIDS». *Medicine* 41 (8): 411-16.
- Odorizzi, Pamela, y John Wherry. 2012. «Inhibitory Receptors on Lymphocytes: Insights from Infections». *The Journal of Immunology* 188: 2957-65.
- ONUSIDA. 2020. «Estadísticas mundiales sobre el VIH». *Hoja Informativa-Últimas estadísticas sobre el estado de la epidemia de SIDA*.
- Oomizu, Souichi, Tomohiro Arikawa, Toshiro Niki, Takeshi Kadowaki, Masaki Ueno, Nozomu Nishi, Akira Yamauchi, Toshio Hattori, Tsutomu Masaki, y Mitsuomi Hirashima. 2012. «Cell Surface Galectin-9 Expressing Th Cells Regulate Th17 and Foxp3+ Treg Development by Galectin-9 Secretion». *PLoS ONE* 7 (11).
- Palacios, Ronald. 1982. «Mechanism of T Cell Activation: Role and Functional Relationship of HLA-DR Antigens and Interleukins». *Immunological Reviews* 63 (1): 73-110. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.1982.tb00412.x>.
- Park, Jang-June, Ryusuke Omiya, Yumiko Matsumara, Yukimi Sakoda, Atsuo Kuramasu, Mathew Augustine, Sheng Yao, et al. 2010. «B7-H1/CD80 interaction is required for the induction and maintenance of peripheral T-cell tolerance». *Blood* 116 (8): 1291-98.

- Passaes, Caroline, y Asier Sáez-Ciri3n. 2014. «HIV cure research: Advances and prospects». *Virology* 454-455: 340-52.
- Pau, Alice, y Jomy George. 2014. «Antiretroviral Therapy: Current Drugs». *Infectious Disease Clinics of North America* 28 (3): 371-402.
- Pauken, Kristen, y John Wherry. 2015. «Overcoming T cell exhaustion in infection and cancer». *Trends in Immunology* 36 (4): 265-76.
- Perdomo-Celis, Federico, Natalia A. Taborda, y Maria T. Rugeles. 2019. «CD8+ T-Cell Response to HIV Infection in the Era of Antiretroviral Therapy». *Frontiers in Immunology* 10 (agosto). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01896>.
- Peretz, Yoav, Zhong He, Yu Shi, Bader Yassine-Diab, Jean-Philippe Goulet, Rebeka Bordi, Ali Filali-Mouhim, et al. 2012. «CD160 and PD-1 Co-Expression on HIV-Specific CD8 T Cells Defines a Subset with Advanced Dysfunction». *PLoS Pathogens* 8 (8).
- Peterlin, Matija, y Didier Trono. 2003. «Hide, shield and strike back: How HIV-Infected cells avoid immune eradication». *Nature Reviews* 3: 97-107.
- Petrovas, Constantinos, Joseph Casazza, Jason Brenchley, David Price, Emma Gostick, William Adams, Melissa Precopio, et al. 2006. «PD-1 is a regulator of virus-specific CD8+ T cell survival in HIV infection». *Journal of Experimental Medicine* 203 (10): 2281-92.
- Petrovas, Constantinos, David Price, Joseph Mattapallil, David Ambrozak, Chirstof Geldmacher, Valentina Cecchinato, Monica Vaccari, et al. 2007. «SIV-specific CD8+ T cells express high levels of PD1 and cytokines but have impaired proliferative capacity in acute and chronic SIVmac251 infection». *Blood* 110 (3).
- Pitsios, C., A. Dimitrakopoulou, K. Tsalimalma, T. Kordosis, y H. Choremi-Papadopoulou. 2008. «Expression of CD69 on T-cell Subsets in HIV-1 Disease». *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation* 68 (3): 233-41. <https://doi.org/10.1080/00365510701630227>.
- Poli, Guido, y Anthony S. Fauci. 1992. «The Effect of Cytokines and Pharmacologic Agents on Chronic HIV Infection». *AIDS Research and Human Retroviruses* 8 (2): 191-97. <https://doi.org/10.1089/aid.1992.8.191>.
- Quarona, Valeria, Gianluca Zaccarello, Antonella Chillemi, Enrico Brunetti, Vijay Kumar Singh, Enza Ferrero, Ada Funaro, Alberto L. Horenstein, y Fabio Malavasi. 2013. «CD38 and CD157: A Long Journey from Activation Markers to Multifunctional Molecules: CD38 and CD157». *Cytometry Part B: Clinical Cytometry* 84B (4): 207-17. <https://doi.org/10.1002/cyto.b.21092>.
- Ranasinghe, Srinika, Michael Flanders, Sam Cutler, Damien Soghoian, Musie Ghebremichael, Isaiah Davis, Madelene Lindqvist, et al. 2012. «HIV-Specific CD4 T Cell Responses to Different Viral Proteins Have Discordant Associations with Viral Load and Clinical Outcome». *Journal of Virology* 86 (1): 277-83.
- Rangachari, Manu, Chen Zhu, Kaori Sakuishi, Sheng Xiao, Jozsef Karman, Andrew Chen, Mathieu Angin, et al. 2012. «Bat3 promotes T cell responses and autoimmunity by repressing Tim-3-mediated cell death and exhaustion». *Nature Medicine* 18 (9): 1394-1400.
- Reddy, Manjula, Edward Eirikis, Cuc Davis, Hugh M. Davis, y Uma Prabhakar. 2004. «Comparative Analysis of Lymphocyte Activation Marker Expression and Cytokine Secretion Profile in Stimulated Human Peripheral Blood Mononuclear Cell Cultures: An in Vitro Model to Monitor Cellular Immune Function». *Journal of Immunological Methods* 293 (1-2): 127-42. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2004.07.006>.
- Rinaldo, Charles R., Xiao-Li Huang, Zheng Fan, Joseph B. Margolick, Luann Borowski, Aki Hoji, Christine Kalinyak, et al. 2000. «Anti-Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) CD8+ T-Lymphocyte Reactivity during Combination Antiretroviral Therapy in HIV-1-Infected Patients with Advanced Immunodeficiency». *Journal of Virology* 74 (9): 4127-38. <https://doi.org/10.1128/JVI.74.9.4127-4138.2000>.

- Rio, M del, C Lucas, L Buhler, G Rayat, y J Rodriguez-Barbosa. 2010. «HVEM/LIGHT/BTLA/CD160 cosignaling pathways as targets for immune regulation». *Journal of Leukocyte Biology* 87: 223-35.
- Rosignoli, Guglielmo, Alison Cranage, Catherine Burton, Mark Nelson, Alan Steel, Brian Gazzard, Frances Gotch, y Nesrina Imami. 2007. «Expression of PD-L1, a marker of disease status, is not reduced by HAART in aviraemic patients». *AIDS* 21 (10): 1379-81.
- Ruggiero, Alessandra, Alessandro Cozzi-Lepri, Apostolos Beloukas, Douglas Richman, Saye Khoo, Andrew Phillips, Anna Maria Geretti, y ERAS Study Group. 2018. «Factors Associated With Persistence of Plasma HIV-1 RNA During Long-Term Continuously Suppressive Firstline Antiretroviral Therapy». *Open Forum Infectious Diseases* 5 (2). <https://doi.org/10.1093/ofid/ofy032>.
- Rutishauser, Rachel, Wendy Hartogensis, Deo Deguit, Melissa Krone, Rebecca Hoh, Frederick Hecht, Christopher Pilcher, et al. 2017. «Early and Delayed Antiretroviral Therapy Results in Comparable Reductions in CD8+ T Cell Exhaustion Marker Expression». *AIDS Research and Human Retroviruses* 33 (7): 658-67.
- Sachdeva, Meenakshi, Margaret Fischl, Rajendra Pahwa, Naresh Sachdeva, y Savita Pahwa. 2010. «Immune Exhaustion Occurs Concomitantly with Immune Activation and Decrease in Regulatory T Cells in Viremic Chronically HIV-1 Infected Patients». *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes* 15 (54): 447-54.
- Sakhdari, Ali, Shariq Mujib, Bahareh Vali, Feng Yue, Sonya MacParland, Kiera Clayton, Richard Jones, et al. 2012. «Tim-3 Negatively Regulates Cytotoxicity in Exhausted CD8+ T Cells in HIV Infection». *PLoS ONE* 7 (7).
- Sales Gil, Raquel, y Paola Vagnarelli. 2018. «Ki-67: More Hidden behind a 'Classic Proliferation Marker'». *Trends in Biochemical Sciences* 43 (10): 747-48. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2018.08.004>.
- Sancho, David, Manuel Gómez, y Francisco Sánchez-Madrid. 2005. «CD69 Is an Immunoregulatory Molecule Induced Following Activation». *Trends in Immunology* 26 (3): 136-40. <https://doi.org/10.1016/j.it.2004.12.006>.
- Sandler, Netanya G., y Daniel C. Douek. 2012. «Microbial Translocation in HIV Infection: Causes, Consequences and Treatment Opportunities». *Nature Reviews Microbiology* 10 (9): 655-66. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2848>.
- Sandoval-Montes, Claudia, y Leopoldo Santos-Argumedo. 2005. «CD38 Is Expressed Selectively during the Activation of a Subset of Mature T Cells with Reduced Proliferation but Improved Potential to Produce Cytokines». *Journal of Leukocyte Biology* 77 (4): 513-21. <https://doi.org/10.1189/jlb.0404262>.
- Santa-Marta, Mariana, Paula Matos de Brito, Ana Godinho-Santos, y Joao Goncalves. 2013. «Host factors and HIV-1 replication: clinical evidence and potential therapeutic approaches». *Frontiers in immunology* 4 (343): 1-20.
- Sauce, Delphine, Jorge Almeida, Martin Larsen, Laurine Haro, Brigitte Autran, Gordon Freeman, y Victor Appay. 2007. «PD-1 expression on human CD8 T cells depends on both state of differentiation and activation status». *AIDS* 21 (15): 2005-13.
- Savarino, Andrea, Flavia Bottarel, Fabio Malavasi, y Umberto Dianzani. 2000. «Role of CD38 in HIV-1 Infection: An Epiphenomenon of T-Cell Activation or an Active Player in Virus/Host Interactions?». *AIDS* 14 (9): 1079-89. <https://doi.org/10.1097/00002030-200006160-00004>.
- Seddiki, Nabila, Vendran Brezar, y Rika Draenert. 2014. «Cell exhaustion in HIV-1 infection: role of suppressor cells». *Current Opinion in HIV and AIDS* 9 (5): 452-58.
- Sedy, John, Ryan Bjordahl, Vasileios Bekiaris, Matthew Macauley, Brian Ware, Paula Norris, Nell Lurain, Chris Benedict, y Carl Ware. 2013. «CD160 Activation by Herpesvirus Entry Mediator Augments Inflammatory Cytokine Production and Cytolytic Function by NK Cells». *The Journal of Immunology* 191: 828-36.

- Sharpe, Arlene, y Kristen Pauken. 2017. «The diverse functions of the PD1 inhibitory pathway». *Nature Reviews Immunology* Advanced online publication.
- Sharpe, Arlene, John Wherry, Rafi Ahmed, y Gordon Freeman. 2007. «The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection». *Nature Immunology* 8 (3): 239-45.
- Shipkova, Maria, y Eberhard Wieland. 2012. «Surface Markers of Lymphocyte Activation and Markers of Cell Proliferation». *Clinica Chimica Acta* 413 (17-18): 1338-49. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2011.11.006>.
- Shive, Carey L., Brian Clagett, Marie R. McCausland, Joseph C. Mudd, Nicholas T. Funderburg, Michael L. Freeman, Souheil-Antoine Younes, et al. 2016. «Inflammation Perturbs the IL-7 Axis, Promoting Senescence and Exhaustion That Broadly Characterize Immune Failure in Treated HIV Infection»: *JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes* 71 (5): 483-92. <https://doi.org/10.1097/QAI.0000000000000913>.
- Simon, Viviana, y David Ho. 2003. «HIV-1 dynamics in vivo: Implications for therapy». *Nature Reviews Microbiology* 1: 181-90.
- Smith, Johanna, y René Daniel. 2006. «Following the Path of the Virus: The Exploitation of Host DNA Repair Mechanisms by Retroviruses». *ACS Chemical Biology* 1 (4): 217-26.
- Stacey, Andrea R., Philip J. Norris, Li Qin, Elizabeth A. Haygreen, Elizabeth Taylor, John Heitman, Mila Lebedeva, et al. 2009. «Induction of a Striking Systemic Cytokine Cascade Prior to Peak Viremia in Acute Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection, in Contrast to More Modest and Delayed Responses in Acute Hepatitis B and C Virus Infections». *Journal of Virology* 83 (8): 3719-33. <https://doi.org/10.1128/JVI.01844-08>.
- Stengel, Katharina, Kristin Harden-Bowles, Xi Yu, Lionel Rouge, Jianping Yin, Laetitia Comps-Agrar, Christian Wiesmann, Fernando Bazan, Dan Eaton, y Jane Grogan. 2012. «Structure of TIGIT immunoreceptor bound to poliovirus receptor reveals a cell-cell adhesion and signaling mechanism that requires cis-trans receptor clustering». *PNAS* 109 (14): 5399-5404.
- Sun, Chong, Riccardo Mezzadra, y Ton N. Schumacher. 2018. «Regulation and Function of the PD-L1 Checkpoint». *Immunity* 48 (3): 434-52. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.03.014>.
- Sun, Xiaoming, y Paul D. Kaufman. 2018. «Ki-67: More than a Proliferation Marker». *Chromosoma* 127 (2): 175-86. <https://doi.org/10.1007/s00412-018-0659-8>.
- Sun, Y., E. Iglesias, A. Samri, G. Kamkamidze, T. Decoville, G. Carcelain, y B. Autran. 2003. «A Systematic Comparison of Methods to Measure HIV-1 Specific CD8 T Cells». *Journal of Immunological Methods* 272 (1-2): 23-34. [https://doi.org/10.1016/S0022-1759\(02\)00328-9](https://doi.org/10.1016/S0022-1759(02)00328-9).
- Tauriainen, Johanna, Lydia Scharf, Juliet Frederiksen, Ali Naji, Hans-Gustaf Ljunggren, Anders Sonnerborg, Ole Lund, et al. 2017. «Perturbed CD8+ T cell TIGIT/CD226/PVR axis despite early initiation of antiretroviral treatment in HIV infected individuals». *Nature Scientific Reports* 7 (40354).
- Thijssen, Victor, Roy Heusschen, Jo Caers, y Arjan Griffioen. 2015. «Galectin expression in cancer diagnosis and prognosis: A systematic review». *Biochimica et Biophysica Acta* 1855: 235-47.
- Tian, Xiaoling, Anli Zhang, Chao Qiu, Wei Wang, Yu Yang, Chenli Qiu, Aiping Liu, et al. 2015. «The Upregulation of LAG-3 on T Cells Defines a Subpopulation with Functional Exhaustion and Correlates with Disease Progression in HIV-Infected Subjects». *Journal of Immunology* 194: 3873-82.
- Tilling, Richard, Sabine Kinloch, Li-Ean Goh, David Cooper, Luc Perrin, Fiona Lampe, John Zaunders, et al. 2002. «Parallel Decline of CD8+/CD38++ T Cells and Viraemia in Response to Quadruple Highly Active Antiretroviral Therapy in Primary HIV Infection»: *AIDS* 16 (4): 589-96. <https://doi.org/10.1097/00002030-200203080-00010>.

- Tough, D. F., P. Borrow, y J. Sprent. 1996. «Induction of Bystander T Cell Proliferation by Viruses and Type I Interferon in Vivo». *Science* 272 (5270): 1947-50.
<https://doi.org/10.1126/science.272.5270.1947>.
- Trautmann, Lydie, Lorry Janbazian, Nicolas Chomont, Elias Said, Sylvain Gimmig, Benoit Bessette, Mohamed-Rachid Boulassel, et al. 2006. «Upregulation of PD-1 expression on HIV-specific CD8+ T cells leads to reversible immune dysfunction». *Nature Medicine* 12 (10): 1198-1202.
- Turner, Brian, y Michael Summers. 1999. «Structural Biology of HIV». *Journal of Molecular Biology* 285: 1-32.
- Velu, Vijayakumar, Sinul Kannanganat, Chirs Ibegbu, Lakshmi Channareddi, Francois Villinger, Gordon Freeman, Rafi Ahmed, y Rama Amara. 2007. «Elevated Expression Levels of Inhibitory Receptor Programmed Death 1 on Simian Immunodeficiency Virus-Specific CD8 T Cells during Chronic Infection but Not after Vaccination». *Journal of Virology* 81 (11): 5819-28.
- Velu, Vijayakumar, Kehmia Titanji, Baogong Zhu, Sajid Husain, Gordon Freeman, Rafi Ahmed, y Rama Amara. 2009. «Enhancing SIV-specific immunity in vivo by PD-1 blockade». *Nature* 458: 206-10.
- Vigano, S, M Perreau, y A Harari. 2012. «Positive and Negative Regulation of Cellular Immune Responses in Physiologic Conditions and Diseases». *Clinical and Developmental Immunology* 2012.
- Vigano, Selena, Riddhima Banga, Florence Bellanger, Céline Pellaton, Alex Farina, Denis Comte, Alexandre Harari, y Mathieu Perreau. 2014. «CD160-Associated CD8 T-Cell Functional Impairment Is Independent of PD-1 Expression». *PLoS Pathogens* 10 (9).
- Vollbrecht, Thomas, Heike Brackmann, Nadja Henrich, Joerg Roeling, Ulrich Seybold, Johannes Bogner, Frank Goebel, y Rika Draenert. 2010. «Impact of Changes in Antigen Level on CD38/PD-1 Co-Expression on HIV-Specific CD8 T Cells in Chronic, Untreated HIV-1 Infection». *Journal of Medical Virology* 82: 358-70.
- Warner, Greene. 2007. «A history of AIDS: Looking back to see ahead». *European Journal of Immunology* 37: S94-102.
- Wherry, John, y Makoto Kurachi. 2015. «Molecular and cellular insights into T cell exhaustion». *Nature Reviews Immunology* 15: 486-99.
- Wilen, Craig, John Tilton, y Robert Doms. 2012. «HIV: Cell Binding and Entry». *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*.
- Wilson, Jamie D. K., Graham S. Ogg, Rachel L. Allen, Claire Davis, Sunil Shaunak, Jean Downie, Wayne Dyer, et al. 2000. «Direct Visualization of HIV-1-Specific Cytotoxic T Lymphocytes during Primary Infection»: *AIDS* 14 (3): 225-33.
<https://doi.org/10.1097/00002030-200002180-00003>.
- Workman, Creg, Kari Dugger, y Dario Vignali. 2002. «Cutting Edge: Molecular Analysis of the Negative Regulatory Function of Lymphocyte Activation Gene-3». *The Journal of Immunology* 169: 5392-95.
- Workman, Creg, y Dario Vignali. 2005. «Negative Regulation of T Cell Homeostasis by Lymphocyte Activation Gene-3 (CD223)». *The Journal of Immunology* 174 (688-695).
- Wykes, Michelle, y Sharon Lewin. 2017. «Immune checkpoint blockade in infectious diseases». *Nature Reviews Immunology* Advanced online Publication.
- Yamamoto, Takuya, David Price, Joseph Casazza, Guido Ferrari, Martha Nason, Pratip Chattopadhyay, Mario Roederer, et al. 2011. «Surface expression patterns of negative regulatory molecules identify determinants of virus-specific CD8+ T-cell exhaustion in HIV infection». *Blood* 117 (18): 4805-15.
- Yu, Xin, Kristin Harden, Lino Gonzalez, Michelle Francesco, Eugene Chiang, Bryan Irving, Irene Tom, et al. 2009. «The surface protein TIGIT suppresses T cell activation by promoting the generation of mature immunoregulatory dendritic cells». *Nature Immunology* 10 (1): 48-57.

- Zhu, Chen, Ana Anderson, y Vijay Kuchroo. 2011. «TIM-3 and Its Regulatory Role in Immune Responses». En *Negative Co-Receptors*, editado por Rafi Ahmed y Tasuku Honjo. Vol. 350. Current Topics in Microbiology and Immunology. Londres: Springer.
- Ziegler, Steven F., Fred Ramsdell, y Mark R. Alderson. 1994. «The Activation Antigen CD69». *Stem Cells* 12 (5): 456-65. <https://doi.org/10.1002/stem.5530120502>.
- Ziegler, Steven F., Fred Ramsdell, Kathryn A. Hjerrild, Richard J. Armitage, Kenneth H. Grabstein, Kathryn B. Hennen, Terry Farrah, William C. Fanslow, Ethan M. Shevach, y Mark R. Alderson. 1993. «Molecular Characterization of the Early Activation Antigen CD69: A Type II Membrane Glycoprotein Related to a Family of Natural Killer Cell Activation Antigens». *European Journal of Immunology* 23 (7): 1643-48. <https://doi.org/10.1002/eji.1830230737>.