

Tesis Doctoral

# Análisis de potenciales correlatos inmunes de control en la infección por HIV-1 durante la serconversión y el primer año de infección

Ghiglione, Yanina Alexandra

2015-03-13

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Ghiglione, Yanina Alexandra. (2015-03-13). Análisis de potenciales correlatos inmunes de control en la infección por HIV-1 durante la serconversión y el primer año de infección. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Ghiglione, Yanina Alexandra. "Análisis de potenciales correlatos inmunes de control en la infección por HIV-1 durante la serconversión y el primer año de infección". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2015-03-13.

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires



## **Universidad de Buenos Aires**

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Química Biológica

### **Análisis de potenciales correlatos inmunes de control en la infección por HIV-1 durante la serconversión y el primer año de infección**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área de Química Biológica

*Lic. Yanina Alexandra Shiglione*

**Director:** Dr. Horacio Salomón

**Director Asistente:** Dra. Gabriela Turk

**Consejero de Estudios:** Dra. Nélide Candurra

Lugar de Trabajo: Instituto de Investigaciones Biomédicas en Retrovirus y SIDA (INBIRS); Universidad de Buenos Aires/CONICET.

Buenos Aires, 2015

Al Dr. Horacio Salomón, por permitirme formar parte de su grupo de trabajo y realizar esta tesis en el Instituto INBIRS.

A la Dra. Gabriela Turk por ser una gran directora. Gracias Gaby por tu apoyo, por estar siempre que te necesitamos y por sobre todas las cosas por la infinita paciencia que me tuviste los últimos 5 años.

A Julita, por ser una excelente compañera de grupo y por aguantarme todo este tiempo.

A todas las chicas y los chicos del INBIRS por todos los días de trabajo compartidos, cumpleaños y salidas.

Cynthia, mi compañera de aventuras académicas. Gracias por brindarme tu amistad y aguantarme todos estos años.

A mi familia por el apoyo que siempre me brindaron a lo largo de los años en todos los proyectos que he emprendido a lo largo de mi vida.

A José, por tu comprensión, apoyo incondicional y eterna paciencia. Por ser mí sostén y estar siempre que te necesito.

...Gracias!!!

Los resultados de este trabajo de tesis han sido publicados en:

*Early Skewed Distribution of Total and HIV-specific CD8<sup>+</sup> T-cell Memory Phenotypes during Primary HIV Infection is related to Reduced Antiviral Activity and Faster Disease Progression.* **Ghiglione Y**, Falivene J, Ruiz MJ, Laufer N, Socias ME, Cahn P, Giavedoni L, Sued O, Gherardi MM, Salomón H y Turk G. *PLoS One*. 2014 Aug 5;9(8):e104235.

*Early gag immunodominance of the HIV-specific T-cell response during acute/early infection is associated with higher CD8<sup>+</sup> T-cell antiviral activity, and correlates with the preservation of the CD4<sup>+</sup> T-cell compartment.* Turk G, **Ghiglione Y**, Falivene J, Socias ME, Laufer N, Coloccini R, Rodriguez AM, Ruiz MJ, Pando MA, Giavedoni L, Cahn P, Sued O, Salomón H y Gherardi MM. *J Virol*. 2013; 87(13):7445-62.

---

## ANÁLISIS DE POTENCIALES CORRELATOS INMUNES DE CONTROL EN LA INFECCIÓN POR HIV-1 DURANTE LA SEROCONVERSIÓN Y EL PRIMER AÑO DE INFECCIÓN

---

En los últimos años, se ha puesto especial énfasis en el estudio de la respuesta T CD8<sup>+</sup> dado el rol central que esta juega en el control de la replicación del virus de la inmunodeficiencia humana (HIV, *human immunodeficiency virus*). Sin embargo sigue siendo clave la identificación y comprensión de nuevos correlatos inmune de protección. Más aún, la etapa de infección aguda representa un escenario propicio para el estudio de las funciones que mejor se correlacionan con control viral. El objetivo de esta tesis fue analizar la especificidad, funcionalidad y el fenotipo de la respuesta T CD8<sup>+</sup> HIV-específica en una cohorte de individuos recientemente infectados y su asociación con el control de la replicación viral y de la progresión a la enfermedad (evaluado mediante la carga viral, recuento de células T CD4<sup>+</sup> y activación inmune), durante la seroconversión y el primer año de infección. Se obtuvieron muestras de sangre de 51 individuos reclutados dentro de los primeros 6 meses desde la fecha probable de infección (PHI, *Primary HIV infection*); 22 sujetos crónicamente infectados (Crónicos) y 14 sujetos controladores elite (EC, *Elite Controllers*). Se observó que, a pesar que Nef dominó la respuesta anti-HIV durante la infección aguda/temprana, la aparición temprana de una alta proporción de células T anti-Gag se correlacionó con un retraso en la progresión. Las células T CD8<sup>+</sup> HIV-específicas polifuncionales fueron detectadas en tiempos tempranos post-infección pero no se asociaron con control viral. Por el contrario, se observó que los sujetos PHI que presentaban células T CD8<sup>+</sup> con una mayor capacidad de mediar actividad antiviral (VIA, *viral inhibitory activity*), en la muestra basal, presentaron *set points* inmunes más elevados. Además, los niveles de VIA se correlacionaron con la magnitud de la respuesta T CD8<sup>+</sup> anti-Gag. A su vez, las células T CD8<sup>+</sup> Gag-específicas mostraron una mayor capacidad de mediar la lisis de células infectadas (lo cual se evidenció por una mayor capacidad de degranulación) y de producir,

de manera simultánea, INF- $\gamma$  lo cual les conferiría una ventaja para ejercer su actividad antiviral. Por otro lado, se observó que la distribución de las subpoblaciones de memoria de las células T CD8<sup>+</sup>, tanto totales como de las HIV-específicas, se encuentra sesgada en los individuos PHI, pero no alcanza los niveles dramáticos observados en los sujetos Crónicos. El análisis de la expresión de PD-1 en los individuos PHI, tanto en las células T CD8<sup>+</sup> totales como HIV-específicas, reveló no sólo una asociación con progresión a la enfermedad si no también con el perfil de memoria de la población celular T CD8<sup>+</sup>. Notablemente, se obtuvieron correlaciones directas entre los niveles de VIA y la proporción de células T CD8<sup>+</sup> con fenotipo terminal, tanto en la muestra basal como a los 12 meses post-infección. En consecuencia, se estableció una relación entre la preservación de la ruta de diferenciación de las células T CD8<sup>+</sup> y la funcionalidad de las mismas.

Esta tesis representa el primer trabajo donde se realizó una caracterización completa de la respuesta T CD8<sup>+</sup> en una cohorte Argentina de individuos cursando la infección aguda/temprana por HIV. El poder descifrar la relación que existe entre las características que definen a las células T CD8<sup>+</sup> con los niveles de activación inmune, el control viral y la progresión a la enfermedad en los distintos estadios de la infección (como son la infección primaria, crónica o en EC), como ha sido llevado a cabo en esta tesis, es primordial para profundizar en el conocimiento que se tiene de la inmunopatogénesis del virus. Además, esta información es de suma importancia para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas frente al HIV así como en el diseño y posterior testeo de vacunas que promuevan una respuesta beneficiosa.

**PALABRAS CLAVES:** HIV, seroconversión, infección aguda, respuesta inmune celular, linfocitos T CD8<sup>+</sup>, correlatos de protección.

---

**CORRELATES OF IMMUNE CONTROL IN HIV INFECTION DURING  
SEROCONVERSION AND FIRST YEAR POST-INFECTION.**

---

Given the central role that HIV-specific CD8<sup>+</sup> T-cells play in the control of the human immunodeficiency virus (HIV) replication, special emphasis has been focused on this cell population. However, correlates of immune protection remain elusive. Moreover, the acute phase of infection represents a proper scenario to delineate the antiviral cellular functions that best correlate with virus control. The aim of the present study was to analyze specificity, functionality and phenotype of the HIV-specific immune response in a cohort of acute/early HIV-infected individuals and their associations with viral control and disease progression, during the seroconversion and the first year post-infection. Blood samples from 51 subjects recruited within 6 months from infection (primary HIV infection [PHI]); 22 chronically infected subjects (Chronics) and 14 Elite Controllers (EC) were obtained. Results indicated that, although Nef dominated the anti-HIV response during acute/early infection, a higher proportion of early anti-Gag T cells correlated with delayed progression. Polyfunctional HIV-specific CD8<sup>+</sup> T cells were detected at early time points but did not associate with virus control. Conversely, higher CD4<sup>+</sup> T-cell set points were observed in PHI subjects with higher capacity of the CD8<sup>+</sup> T-cells to mediate ex vivo viral inhibitory activity (VIA), at baseline. Importantly, VIA levels correlated with the magnitude of the anti-Gag cellular response. The advantage of Gag-specific cells relied on their enhanced ability to mediate lysis of infected cells (evidenced by a higher capacity to degranulate) and to simultaneously produce IFN- $\gamma$ . Moreover, it was found that normal maturation of total and HIV-specific CD8<sup>+</sup> T-cells into memory subsets is skewed in PHI, but not at the dramatic level observed in Chronics. Analysis of PD-1 expression, on bulk and HIV-specific CD8<sup>+</sup> T-cells, from PHI subjects revealed not only an association with disease progression but also with skewed memory CD8<sup>+</sup> T-cell differentiation. Most notably, significant direct correlations were obtained between the VIA levels and the higher proportions of fully-differentiated HIV-specific CD8<sup>+</sup> T cells, both at baseline and at 12 months post-infection. Thus, a relationship

---

between preservation of CD8<sup>+</sup> T-cell differentiation pathway and cell functionality was established.

This thesis represents the first work where a fully characterization of the CD8<sup>+</sup> T-cell response have been performed in a cohort of acute/early HIV-infected individuals from Argentina. Unscrambling relationships among the CD8<sup>+</sup> T-cell characteristics, immune activation, viral control, and disease progression in multiple settings (primary infection, viremic Chronics and ECs), such as those observed in this work, are increasingly important to advance our understanding of HIV pathogenesis. As well, this information will be instrumental for therapeutic and sterilizing vaccine design in order to boost our ability to elicit beneficial responses.

**KEY WORDS:** HIV, seroconversion, acute infection, cellular immune response, CD8<sup>+</sup> T lymphocytes, correlates of protection.



**ÍNDICE:**

<b>LISTADO DE FIGURAS Y TABLAS .....</b>	<b>viii</b>
<b>ABREVIATURAS.....</b>	<b>xiii</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>I. 1. VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA.....</b>	<b>2</b>
<b>I. 2. EPIDEMIOLOGÍA.....</b>	<b>3</b>
I. 2. 1. SITUACIÓN MUNDIAL.....	3
I. 2. 2. SITUACIÓN EN ARGENTINA.....	4
I. 2. 3. EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR.....	4
<b>I. 3. EL VIRIÓN .....</b>	<b>6</b>
I. 3. 1. MORFOLOGÍA Y GENOMA.....	6
I. 3. 2. CICLO DE REPLICACIÓN .....	8
<b>I. 4. INMUNOPATOGENIA .....</b>	<b>10</b>
<b>I. 5. RESPUESTA CITOTÓXICA T CD8<sup>+</sup> ESPECÍFICA.....</b>	<b>12</b>
<b>II. OBJETIVOS E HIPÓTESIS.....</b>	<b>17</b>
<b>II. 1. OBJETIVO GENERAL .....</b>	<b>18</b>
II. 1. 1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	18
<b>II. 2. HIPÓTESIS DE TRABAJO.....</b>	<b>20</b>
<b>III. MATERIALES &amp; MÉTODOS.....</b>	<b>21</b>
<b>III. 1. POBLACIÓN EN ESTUDIO .....</b>	<b>22</b>
<b>III. 2. PROCESAMIENTO DE MUESTRAS.....</b>	<b>22</b>
<b>III. 3. SUBTIPIFICACIÓN DE HLA.....</b>	<b>23</b>
<b>III. 4. PÉPTIDOS .....</b>	<b>24</b>
<b>III. 5. ENSAYO DE ELISPOT.....</b>	<b>25</b>
<b>III. 6. ENSAYO DE SUPRESIÓN VIRAL (VIA, VIRAL INHIBITORY ACTIVITY).....</b>	<b>26</b>
<b>III. 7. MARCADO DE MOLÉCULAS DE SUPERFICIE E INTRACELULARES .....</b>	<b>29</b>
III. 7. 1. EVALUACIÓN DE LA FUNCIONALIDAD DE LA POBLACIÓN CELULAR T CD8 <sup>+</sup> ESPECÍFICA: CAPACIDAD DE DEGRANULACIÓN (EXPRESIÓN EN MEMBRANA DE CD107A/B) Y SECRECIÓN DE CITOQUINAS (IFN- $\gamma$ , IL-2, TNF- $\alpha$ ).....	30

III. 7. 2. EVALUACIÓN DEL FENOTIPO (EN TÉRMINOS DE EXPRESIÓN DE MARCADORES DE MEMORIA Y AGOTAMIENTO) EN LAS POBLACIONES T CD8 <sup>+</sup> TOTAL Y HIV-ESPECÍFICA ...	31
III. 7. 3. ANÁLISIS POR CITOMETRÍA DE FLUJO .....	31
<b>III. 8. ACTIVACIÓN INMUNE .....</b>	<b>34</b>
<b>III. 9. CUANTIFICACIÓN DE FACTORES SOLUBLES EN PLASMA.....</b>	<b>35</b>
<b>III. 10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....</b>	<b>36</b>
<b>IV. RESULTADOS .....</b>	<b>37</b>
<b>IV. 1. DESCRIPCIÓN DE LA POBLACIÓN EN ESTUDIO.....</b>	<b>38</b>
<b>IV. 2. ANÁLISIS DE LA RESPUESTA CELULAR T CD8<sup>+</sup> HIV-ESPECÍFICA MEDIANTE ELISPOT .....</b>	<b>45</b>
IV. 2. 1. MAGNITUD Y BLANCOS PREFERENCIALES DE LA RESPUESTA HIV-ESPECÍFICA EN LOS INDIVIDUOS RECLUTADOS.....	46
IV. 2. 2. CALIDAD DE LA RESPUESTA HIV-ESPECÍFICA EN LOS INDIVIDUOS RECLUTADOS.....	50
IV. 2. 3. RELACIÓN ENTRE LA INMUNODOMINANCIA RELATIVA ANTI-GAG Y LOS PARÁMETROS CLÍNICOS EN LOS INDIVIDUOS CURSANDO LA INFECCIÓN PRIMARIA .....	52
<b>IV. 3. ANÁLISIS DE LA CAPACIDAD DE LAS CÉLULAS HIV-ESPECÍFICAS DE INHIBIR LA REPLICACIÓN VIRAL <i>IN VITRO</i> DURANTE LA INFECCIÓN PRIMARIA .....</b>	<b>53</b>
IV. 3. 1. CAPACIDAD DE LAS CÉLULAS HIV-ESPECÍFICAS DE INHIBIR LA REPLICACIÓN VIRAL <i>IN VITRO</i> EN LOS GRUPOS DE ESTUDIO .....	54
IV. 3. 2. RELACIÓN ENTRE LA INHIBICIÓN DE LA REPLICACIÓN VIRAL <i>IN VITRO</i> Y LOS PARÁMETROS CLÍNICOS EN LOS INDIVIDUOS CURSANDO LA INFECCIÓN PRIMARIA.....	56
<b>IV. 4. ANÁLISIS DE LA POLIFUNCIONALIDAD DE LAS CÉLULAS T CD8<sup>+</sup> HIV-ESPECÍFICAS DURANTE LA INFECCIÓN PRIMARIA Y SU RELACIÓN CON LOS PARÁMETROS CLÍNICOS.....</b>	<b>57</b>
<b>IV. 5. ANÁLISIS DE LA RELACIÓN ENTRE LA POLIFUNCIONALIDAD DE LA POBLACIÓN T CD8<sup>+</sup> ESPECÍFICA Y SU CAPACIDAD DE SUPRIMIR LA REPLICACIÓN VIRAL DURANTE LA INFECCIÓN PRIMARIA.....</b>	<b>61</b>
IV. 5. 1. RELACIÓN ENTRE LA CAPACIDAD DE INHIBIR LA REPLICACIÓN VIRAL <i>IN VITRO</i> (VIA) Y LA FRECUENCIA DE CÉLULAS BIFUNCIONALES CD107A/B <sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> OBSERVADAS EN LOS INDIVIDUOS CURSANDO LA INFECCIÓN PRIMARIA.....	62
IV. 5. 2. ANÁLISIS DE LA PRODUCCIÓN DE IFN- $\gamma$ Y CD107A/B .....	65
<b>IV. 6. ANÁLISIS DE LOS FACTORES SOLUBLES EN PLASMA Y SU RELACIÓN CON LA INMUNODOMINANCIA DE GAG .....</b>	<b>66</b>
<b>IV. 7. ANÁLISIS DE LA DISTRIBUCIÓN DE LOS FENOTIPOS DE MEMORIA EN LAS CÉLULAS T CD8<sup>+</sup> TOTAL Y HIV-ESPECÍFICAS .....</b>	<b>68</b>
IV. 7. 1. DISTRIBUCIÓN DE LAS SUBPOBLACIONES DE MEMORIA DE LAS CÉLULAS T CD8 <sup>+</sup> .....	68
IV. 7. 2. DISTRIBUCIÓN DE LAS SUBPOBLACIONES DE MEMORIA EN LAS CÉLULAS T CD8 <sup>+</sup> HIV-ESPECÍFICAS .....	70

IV. 7. 3. LA DISTRIBUCIÓN DE LAS CÉLULAS T CD8 <sup>+</sup> DE MEMORIA ESTÁ ASOCIADA CON MARCADORES DE PROGRESIÓN A LA ENFERMEDAD .....	73
<b>IV. 8. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL FACTOR DE MUERTE CELULAR PROGRAMADA 1 (PD-1) DURANTE LA INFECCIÓN PRIMARIA Y SU ASOCIACIÓN CON LA DISTRIBUCIÓN DEL FENOTIPO DE MEMORIA Y PROGRESIÓN A LA ENFERMEDAD....</b>	<b>77</b>
IV. 8. 1. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE PD-1 EN LOS INDIVIDUOS CURSANDO LA INFECCIÓN PRIMARIA .....	77
IV. 8. 2. ASOCIACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN DE PD-1 Y LA DISTRIBUCIÓN DEL FENOTIPO DE MEMORIA EN LOS INDIVIDUOS CURSANDO LA INFECCIÓN PRIMARIA .....	80
<b>IV. 9. ANÁLISIS DE LA RELACIÓN ENTRE LA ACTIVIDAD ANTIVIRAL DE LAS CÉLULAS T CD8<sup>+</sup> Y EL PATRÓN DE MEMORIA Y EXPRESION DE PD-1, DURANTE LA INFECCIÓN PRIMARIA.....</b>	<b>82</b>
<b>V. DISCUSIÓN .....</b>	<b>84</b>
<b>VI. CONCLUSIONES .....</b>	<b>103</b>
<b>VII. REFERENCIAS .....</b>	<b>106</b>

---

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

**Figura 1:** Situación de la pandemia de HIV a nivel mundial.

**Figura 2:** Distribución mundial de subtipos y formas recombinantes.

**Figura 3:** Esquema de la partícula viral madura.

**Figura 4:** Esquema del genoma proviral del HIV.

**Figura 5:** Esquema simplificado del ciclo de replicación del HIV.

**Figura 6:** Curso natural de la infección por HIV.

**Figura 7:** Diferenciación de las células T de memoria

**Capítulo III**

**Figura 8:** Esquema del ensayo de supresión viral.

**Figura 9:** Estrategia de selección de poblaciones linfocitarias por citometría de flujo: análisis de polifuncionalidad.

**Figura 10:** Estrategia de selección de poblaciones linfocitarias por citometría de flujo: análisis del fenotipo de memoria

**Capítulo IV**

**Figura 11:** Parámetros clínicos evaluados en los individuos reclutados por grupo. **A:** resultados de carga viral plasmática. **B:** resultados del recuento de células T CD4<sup>+</sup>.

**Figura 12:** Panel de activación inmune celular evaluado en los individuos reclutados por grupo. **A:** poblaciones linfocitarias T CD8<sup>+</sup>. **B:** poblaciones linfocitarias T CD4<sup>+</sup>.

**Figura 13:** Ejemplo de pocillos obtenidos en el ensayo de ELISPOT. **A:** pocillo negativo. **B:** pocillo positivo.

**Figura 14:** Respuesta celular HIV-específica evaluada por ELISPOT, en los distintos grupos en estudio. **A:** Magnitud de la respuesta frente a Gag, Nef y Env. **B:** contribución relativa de

cada antígeno al total de la respuesta. **C:** contribución de la respuesta anti-Nef y anti-Gag. **D:** porcentaje de la respuesta dirigida contra las subunidades de Gag.

**Figura 15:** Calidad de la respuesta HIV-específica evaluada por ELISPOT, en los distintos grupos de estudio. **A:** Amplitud de la respuesta. **B:** Tamaño promedio de *spot*.

**Figura 16:** Correlación entre el porcentaje de la respuesta anti-Gag y los parámetros clínicos en el grupo PHI. **A:** recuento de células T CD4<sup>+</sup> basal. **B:** *set point* inmune. **C:** log<sub>10</sub> del *set point* viral.

**Figura 17:** Ensayo de inhibición viral *in vitro* (VIA). **A y B:** actividad inhibitoria en los grupos de estudio. **C y D:** actividad inhibitoria en el grupo PHI, según su inmunodominancia anti-Gag o anti-Nef. **E:** correlación con la magnitud de la respuesta anti Gag-específica en el grupo PHI.

**Figura 18:** Correlación entre el ensayo de inhibición viral *in vitro* (VIA) y los parámetros clínicos en el grupo PHI. **A:** activación inmune de la población linfocitaria T CD8<sup>+</sup>. **B:** *set point* inmune en función de la capacidad de mediar VIA.

**Figura 19:** Perfil de polifuncionalidad de la población celular T CD8<sup>+</sup> HIV-específica evaluado en los grupos de estudio.

**Figura 20:** Perfil funcional de la respuesta. **A:** evaluado en los individuos reclutados. **B:** evaluado en el grupo PHI en función del estímulo utilizado.

**Figura 21:** Relación entre la inhibición viral *in vitro* y la polifuncionalidad. **A:** en los grupos de estudio. **B:** esquema representativo de la expresión de IFN- $\gamma$  y CD107A/B. **C:** Correlación entre la expresión de CD107A/B<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> y la magnitud de VIA de los individuos PHI.

**Figura 22:** Análisis de la expresión de **A:** CD107 total. **B:** CD107A/B /IFN- $\gamma$ . **C:** CD107A/B /IL-2.

**Figura 23:** Diagrama de tortas del perfil funcional de los individuos Crónicos, EC y PHI.

**Figura 24:** Intensidad de fluorescencia media relativa (IMFr) evaluado en los grupos de estudio. **A:** IFN- $\gamma$ . **B:** CD107A/B.

**Figura 25:** Correlación entre la inmunodominancia de Gag/Nef y los niveles de citoquinas/quemoquinas en plasma, evaluado en los individuos PHI. **A:** IL-2. **B y C:** MIP-1 $\beta$ .

**Figura 26:** Distribución de las sub-poblaciones de memoria evaluado en los grupos de estudio. **A:** Esquema representativo. **B:** población linfocitaria T CD8<sup>+</sup> total. **C:** población linfocitaria T CD8<sup>+</sup> HIV-específica.

**Figura 27:** Arresto en la diferenciación celular desde memoria efectora ( $T_{ME}$ ) hacia efectoras terminales ( $T_{ET}$ ) de los sujetos enrolados en el estudio. **A:**  $T_{ME}/(T_{ME}+T_{ET})$  por grupo de estudio. **B-D:** Correlación entre las subpoblación celular CD8<sup>+</sup> HIV-específicas  $T_{ET}$  versus  $T_{ME}$ ; **B:** en el grupo PHI. **C:** en los EC. **D:** en el grupo de Crónicos.

**Figura 28:** Correlaciones entre la proporción de la subpoblación celular T CD8<sup>+</sup> y los parámetros clínicos, evaluado en el grupo PHI. **A:** CD8<sup>+</sup>  $T_{Naive}$  versus el recuento de células T CD4<sup>+</sup> basal. **B:** CD8<sup>+</sup> $T_{ME}$  versus el recuento de células T CD4<sup>+</sup> basal. **C:** CD8<sup>+</sup> $T_{ME}$  versus el *set point* inmune.

**Figura 29:** Correlaciones entre la proporción de la subpoblación celular T CD8<sup>+</sup> total y la activación inmune evaluado en el grupo PHI. **A:** CD8<sup>+</sup>  $T_{Naive}$  versus la activación inmune de los linfocitos T CD4<sup>+</sup>. **B:** CD8<sup>+</sup>  $T_{ME}$  versus la activación inmune de los linfocitos T CD8<sup>+</sup>.

**Figura 30:** Correlaciones entre la proporción de la subpoblación celular T CD8<sup>+</sup> HIV-específica y los parámetros inmunológicos evaluado en el grupo PHI. **A:** CD8<sup>+</sup>  $T_{Naive-Like}$  versus el porcentaje de células T CD4<sup>+</sup> basal. **B:** CD8<sup>+</sup>  $T_{ME}$  versus el porcentaje de células T CD4<sup>+</sup> basal. **C:** CD8<sup>+</sup>  $T_{ME}$  versus el *set point* inmune. **D:** la relación  $T_{ME}/(T_{ME}+T_{ET})$  versus el porcentaje de células T CD4<sup>+</sup> basal. **E:** la relación  $T_{ME}/(T_{ME}+T_{ET})$  versus el *set point* inmune.

**Figura 31:** Correlaciones entre la proporción de la subpoblación celular T CD8<sup>+</sup> HIV-específica y los parámetros virológicos evaluado en el grupo PHI. **A:** CD8<sup>+</sup>  $T_{Naive-Like}$  versus la carga viral plasmática basal. **B:** CD8<sup>+</sup>  $T_{Naive-Like}$  versus el *set point* viral. **C:** CD8<sup>+</sup>  $T_{ME}$  versus el *set point* viral.

**Figura 32:** Correlaciones entre la proporción de la subpoblación celular T CD8<sup>+</sup> HIV-específica y la activación inmune evaluado en el grupo PHI. **A:** CD8<sup>+</sup>  $T_{ME}$  versus la activación inmune de los linfocitos T CD8<sup>+</sup>. **B:** la relación  $T_{ME}/(T_{ME}+T_{ET})$  versus la activación inmune de los linfocitos T CD8<sup>+</sup>.

**Figura 33:** Correlaciones entre la relación de las células CD8<sup>+</sup> HIV-específicas  $T_{ME}/(T_{ME}+T_{ET})$  y los niveles plasmáticos de las citoquinas evaluado en el grupo PHI. **A:** IP-10. **B:** IL-1a. **C:** IL-15.

**Figura 34:** Expresión de la molécula PD-1 en los individuos PHI. **A:** porcentaje de PD-1. **B:** porcentaje de PD-1<sup>Low</sup>. **C:** porcentaje de PD-1<sup>High</sup>.

**Figura 35:** Correlaciones entre las subpoblaciones T CD8<sup>+</sup>, en el contexto de la expresión de PD-1, evaluado en los individuos PHI. **A:** porcentaje de células T CD8<sup>+</sup> PD-1<sup>+</sup> totales *versus* el porcentaje de células T CD8<sup>+</sup> PD-1<sup>+</sup> HIV-específicas. **B:** porcentaje de células T CD8<sup>+</sup> PD-1<sup>Low</sup> totales *versus* el porcentaje de células T CD8<sup>+</sup> PD-1<sup>Low</sup> HIV-específicas.

**Figura 36:** Correlaciones entre la expresión de PD-1 y los parámetros clínicos, evaluados en los individuos PHI. **A:** porcentaje de células T CD8<sup>+</sup> PD-1<sup>+</sup> totales *versus* el porcentaje de células T CD4<sup>+</sup>. **B:** porcentaje de células T CD8<sup>+</sup> PD-1<sup>+</sup> HIV-específicas *versus* el porcentaje de células T CD4<sup>+</sup>. **C:** porcentaje de células T CD8<sup>+</sup> PD-1<sup>High</sup> HIV-específicas *versus* la carga viral plasmática.

**Figura 37:** Correlaciones entre la expresión de PD-1 y las subpoblaciones de memoria evaluado en los individuos PHI. Porcentaje de células T CD8<sup>+</sup> PD-1<sup>High</sup> total, **A:** *versus* el porcentaje de células CD8<sup>+</sup> T<sub>ME</sub> totales; **B:** *versus* porcentaje de células CD8<sup>+</sup> T<sub>ET</sub> totales. Porcentaje de células CD8<sup>+</sup> PD-1<sup>High</sup> HIV-específicas, **C:** *versus* porcentaje de células HIV-específicas CD8<sup>+</sup> T<sub>ME</sub>; **D:** *versus* porcentaje de células HIV-específicas CD8<sup>+</sup> T<sub>ET</sub>; **E:** *versus* la relación  $T_{ME}/(T_{ME}+T_{ET})$ .

**Figura 38:** Correlaciones entre la inhibición viral *in vitro* y la distribución de las subpoblaciones de memoria. Capacidad antiviral evaluada en la muestra basal *versus* **A:** el porcentaje de células CD8<sup>+</sup> T<sub>ME</sub> HIV-específicas; **B:** la relación  $CD8^+ T_{ME}/(T_{ME}+T_{ET})$ ; **C:** el porcentaje de células CD8<sup>+</sup> T<sub>ET</sub> HIV-específicas. **D-F:** Capacidad antiviral evaluada al año post-infección.

---

**TABLAS****Capítulo IV**

**Tabla 1:** Características de los individuos HIV<sup>+</sup> reclutados.

**Tabla 2:** Resumen de datos clínicos correspondientes a los individuos HIV<sup>+</sup> reclutados.

**Tabla 3:** Haplotipos HLA de los individuos HIV<sup>+</sup> reclutados.



**ABREVIATURAS**

aa: Aminoácidos

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADNdc: ADN doble cadena

AEC: 3-amino-9-etil-cabazol

APC: Aloficocianina (*Allophycocyanin*)

ARN: Ácido Ribonucleico

ARNm: ARN mensajero

ARNsc+ : ARN simple cadena con polaridad positiva

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

BSA: Seroalbumina bovina (*Bovine serum albumin*)

CA: Cápside, proteína p24

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

CEF: Citomegalovirus, *Epstein Barr* e Influenza

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

CTL: Linfocitos T citotóxicos CD8<sup>+</sup> (*Cytotoxic CD8<sup>+</sup> T Lymphocytes*)

CV: Carga Viral

DMSO: Dimetilsulfóxido

DS: Donantes Seronegativos o Dador sano

EC: Controladores Elite (*Elite Controllers*)

ELISA: Técnica de inmunoabsorción ligado a enzimas (*Enzyme-linked immunosorbent assay*)

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

FDR: Tasa de falso descubrimiento (*Discovery Rate False*)

FITC: Isotiocianato de fluoresceína (*Fluorescein isothiocyanate*)

FSC-A: *Forward scatter area*

FSC-H: *Forward scatter height*

HAART: Tratamiento antirretroviral de alta eficiencia (*Highly Active Antiretroviral Treatment*)

HIV: Virus de la inmunodeficiencia humana (*Human Immunodeficiency Virus*)

HLA: Antígenos Leucocitarios Humanos (*Human Leukocyte Antigen*)

HTLV-III: Virus Linfotrópico Humano Tipo III (*Human T Lymphotropic Virus Type III*)

IMFr: Intensidad Media de Fluorescencia relativa (*relative Mean Fluorescence Intensity*)

IFN: Interferón

IL: Interleuquina

IN: Integrasa

IQ: Rango Intercuartilo (*Interquartile Range*)

Kb: Kilobases

LAV: Virus asociado a linfadenopatía (*Lymphadenopathy Associated Virus*)

LTNP: Individuos no Progresores a Largo Plazo (*Long Term Non Progressors*)

LTR: Repeticiones terminales largas (*Long Terminal Repeats*)

MA: Matriz, proteína p17

MIP: Proteína inflamatoria de macrófagos (*Macrophage Inflammatory Protein*)

MOI: Multiplicidad de Infección

NC: Nucleocápside, proteína p7

NK: Células *Natural Killer*

OMS: Organización Mundial de la Salud

ON: Durante toda la noche (*Overnight*)

ONUSIDA: Organización de la Naciones Unidas para la Lucha contra el SIDA

ORF: Marco de lectura abierto (*Open Reading Frames*)

PBMC: Células mononucleares de sangre periférica (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*)

PBS: Solución tamponada de fosfatos (*Phosphate Buffer Saline*)

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*)

PD-1: Marcador de muerte programada 1 (*Programmed cell death 1*)

PE: Ficoeritrina (*Phycoerythrin*)

- PECy7: Ficoeritrina-cianina 7 (*Phycoerythrin-cyanine 7*)
- PERCP: Proteína pteridinclorofila (*Peridinin chlorophyll Protein*)
- PFA: Paraformaldehído (*Paraformaldehyde*)
- PHA: Fitohemaglutinina (*phytohemagglutinin*)
- PHI: Infección primaria por HIV (*Primary HIV Infection*)
- PMA: Forbol Miristato Acetato
- PR: Proteasa
- PTE: Potenciales epítopes de células T (*Potential T cell epitopes*)
- PVDF: Fluoruro de polivinilideno
- RG: Resto de Gag (péptidos p2 p7 p1 p6)
- rpm: Revoluciones por minuto
- RT: Transcriptasa inversa (*Reverse Transcriptase*)
- SFB: Suero fetal bovino
- SFU: Unidades formadoras de *spots* (*Spot Forming Units*)
- SIDA: Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
- SIV: Virus de la inmunodeficiencia de simios (*Simian Immunodeficiency Virus*)
- SU: Glicoproteína de superficie gp120
- T<sub>ET</sub>: Células T efectoras terminales
- TM: Glicoproteína transmembrana gp41
- T<sub>MC</sub>: Células T de memoria central
- T<sub>ME</sub>: Células T de memoria efectora
- T<sub>Naïve</sub>: Células T *Naïve*
- TNF: Factor de necrosis tumoral (*Tumor Necrosis Factor*)
- VIA: Actividad inhibitoria viral (*Viral inhibitory activity*)
- WB: *Western Blot*

# I. INTRODUCCIÓN

## I. 1. VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA

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

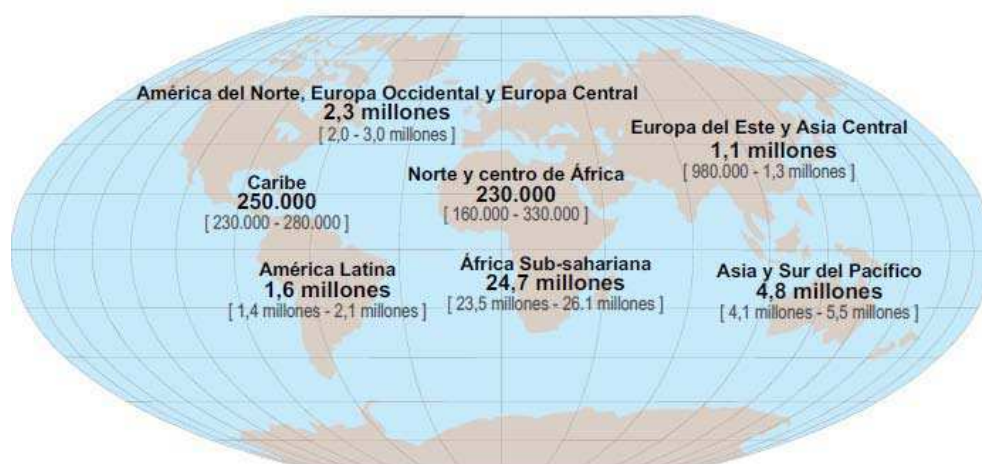
En 1986, *Françoise Clavel*, *Montagnier* y colaboradores [6] describieron un tipo distinto de HIV, prevalente en ciertas regiones de África Occidental, al que denominaron HIV-2 para distinguirlo del virus original. Los individuos infectados con HIV-2 también desarrollan SIDA, aunque con un período de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

Durante los 33 años que han transcurrido desde la descripción de los primeros casos a la actualidad, la problemática HIV/SIDA ha afectado a más de 75 millones de personas y se ha convertido en una de las principales preocupaciones a nivel de Salud Pública mundial.

## I. 2. EPIDEMIOLOGÍA

### I. 2. 1. Situación Mundial

Los últimos datos provenientes de la Organización de la Naciones Unidas para la Lucha contra el SIDA (ONUSIDA) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) [8] indican que, hasta diciembre de 2013, entre 33,2 y 37,2 millones de personas vivían con SIDA en todo el mundo (*Figura 1*). Durante 2013, se produjeron 2,1 millones de nuevas infecciones y el número de muertes asociadas a SIDA alcanzó los 1,5 millones. El 70% de todas las personas afectadas por el HIV/SIDA se concentra en África subsahariana conformando el epicentro de la pandemia.



**Figura 1:** Número estimado de adultos y niños que vivían con HIV en 2013. Total: 35 millones (33,2–37,2 millones) [8].

En cuanto a los modos de transmisión, la vía heterosexual es la principal vía de contagio a nivel mundial aunque en algunas regiones el uso de drogas intravenosas es el principal comportamiento de riesgo (Europa oriental, sudeste y centro de Asia). En el año 2012, la cobertura de tratamiento en mujeres embarazadas viviendo con HIV alcanzó un 62% y el número de nuevas infecciones en niños fue un 35% menor que en el 2009. En 2013, el número estimado de nuevas infecciones por HIV en niños menores de 15 años fue 240.000. En América Latina, se produjeron 94.000 nuevas infecciones durante 2013, llevando el número total de infectados a 1,6 millones (1,4 millones–2,1 millones) (*Figura 1*). La región

se caracteriza principalmente por una epidemia concentrada y de bajo nivel con una prevalencia regional del 0,4%.

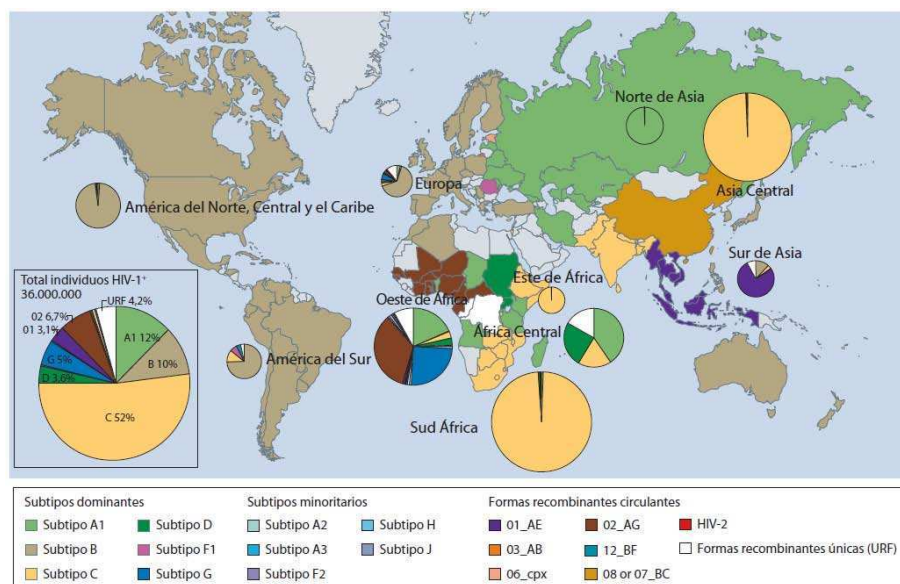
### **I. 2. 2. Situación en Argentina**

Los últimos datos oficiales acerca de la situación epidemiológica en Argentina, provistos por el Programa Nacional de Lucha contra los Retrovirus Humanos, SIDA y Enfermedades de Transmisión Sexual, indican que hasta diciembre de 2013, 110 mil personas vivirían con HIV/SIDA en Argentina, de las cuales un 30% desconocerían su situación serológica [9]. Argentina se caracteriza por ser una región con una epidemia estable y de tipo concentrada con una prevalencia de HIV en la población general (estimada a través de la serología en las mujeres embarazadas) menor al 0,3%, aunque existen algunos grupos en los que esta prevalencia es igual o mayor al 5%. La razón de infectados de acuerdo al sexo es de 2,1 hombres por cada mujer. El 19% de los nuevos diagnósticos ocurren en menores de 24 años y el 20% tienen más de 45 años. La proporción de diagnósticos tardíos alcanza al 23,2% en las mujeres y al 30,7% en los varones. En los últimos cinco años, las tasas específicas por sexo y edad más altas entre los varones se observan en los grupos de 35 a 44 años, seguidos por los de 25 a 34 años, mientras que en las mujeres se invierte el orden de esos dos grupos. En el año 2013 se diagnosticaron y registraron alrededor de 6000 casos de infección por HIV, se produjeron 100 infecciones por transmisión vertical y fallecieron 1400 personas por SIDA.

### **I. 2. 3. Epidemiología Molecular**

A partir de estudios filogenéticos, el HIV se ha dividido en tipos, grupos, subtipos y formas recombinantes inter-subtipos. Actualmente, se acepta que la presencia de los virus HIV-1 y HIV-2 en la población humana es consecuencia de dos eventos de transmisión zoonóticos independientes. A su vez, el HIV-1 se ha subdividido en cuatro grupos: el grupo M (*main*) el grupo O (*outlier*), el N (*new*) y el P [10]. El grupo M (responsable del mayor número de infecciones) se ha diversificado, a su vez, en al menos 9 subtipos y 61 formas

recombinantes circulantes (CRF, *Circulating Recombinant Forms*) [11, 12]. La gran diversidad molecular se puede atribuir a la alta tasa de replicación viral, a la frecuente tasa de introducción de mutaciones y a la recombinación [13]. Los subtipos presentan entre sí algunas diferencias en su distribución geográfica [14] (*Figura 2*).



**Figura 2:** Esquema general de la distribución mundial de subtipos y formas recombinantes más prevalentes de cada región [14].

En Europa predomina el subtipo B. En África se encuentran todos los subtipos del grupo M y se han informado casos pertenecientes al grupo O, N y P. América del sur está caracterizada por la circulación de subtipo B en la región noroeste (al igual de lo que se observa en América central y América del norte) mientras que la situación en el Cono sur es un poco más compleja. En Brasil se encuentran variantes pertenecientes a los subtipos B, C y F y CRF-BF [15, 16]. En nuestro país, los estudios de caracterización del HIV-1 comenzaron a desarrollarse a principios de la década del 90, [17, 18] pero la mayor contribución fue hecha en el año 2001, cuando *Carr y col.* informaron sobre una nueva CRF en pacientes de Argentina y Uruguay, denominada CRF12\_BF [19]. Algunos estudios recientes demuestran una alta prevalencia de los recombinantes BF en la población argentina infectada por HIV [20-23].

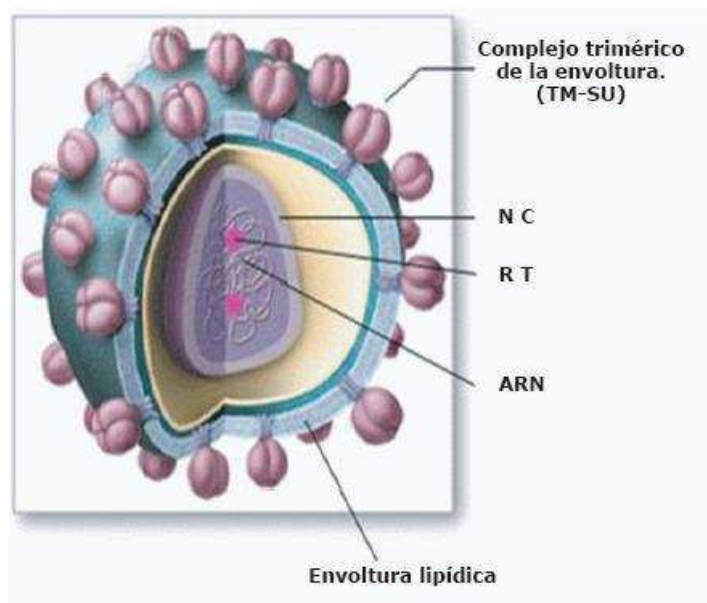


### I. 3. EL VIRIÓN

#### I. 3. 1. Morfología y genoma

##### I.3.1.1. Morfología

La partícula viral madura presenta las características estructurales típicas de los retrovirus. El virión es una partícula esférica, envuelta, de aproximadamente 100 a 120 nm de diámetro (*Figura 3*). La cápside consta de 60 caras triangulares formadas por la proteína estructural p17 (MA, matriz). Dentro de la misma se encuentra la nucleocápside (NC), constituida por la proteína p24 (CA, cápside), que contiene el genoma viral. Asociadas al mismo se encuentran las proteínas p7 y la transcriptasa inversa (RT, *Reverse Transcriptase*). Otras proteínas estructurales incluyen a la proteasa (PR) y la integrasa (IN), las cuales junto a la RT son codificadas por el gen *pol*, así como también a las proteínas accesorias Nef, Vif y Vpr.



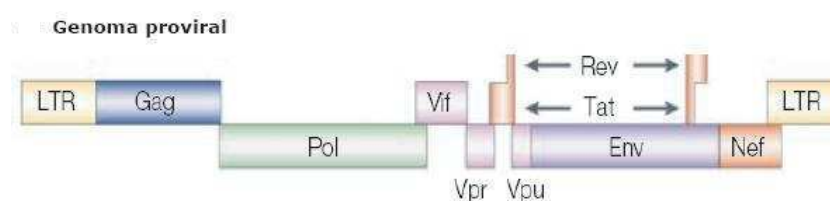
**Figura 3:** Esquema de la partícula viral madura, donde se indican algunas de las proteínas estructurales. TM: proteína transmembrana (gp41), SU: proteína de superficie (gp120), NC: proteína de la nucleocápside, RT: transcriptasa reversa [24].

Las glicoproteínas gp41 (TM, transmembrana) y gp120 (SU, superficie) se hallan asociadas a la envoltura lipídica, de origen celular. La primera es una proteína transmembrana

mientras que la segunda se encuentra asociada a la primera en la cara externa de la envoltura viral [25].

### I.3.1.2. Genoma

El genoma del HIV-1 consta de dos moléculas casi idénticas de ácido ribonucleico simple cadena con polaridad positiva (ARNsc<sup>+</sup>), cada una de 9,2 kilobases (Kb). El mismo codifica 3 genes comunes a todos los retrovirus (*gag*, *pol* y *env*) junto a otros 6 genes que codifican para proteínas regulatorias (*tat* y *rev*) y accesorias (*nef*, *vif*, *vpr* y *vpu*). Mediante el solapamiento entre algunos de los genes, el virus emplea los 3 posibles marcos de lectura para codificar las distintas proteínas, aprovechando al máximo las posibilidades del genoma. La región *gag* codifica las proteínas estructurales internas del virión a través de dos precursores, Pr55<sub>Gag</sub> y Pr160<sub>Gag-Pol</sub>. Los mismos son post-traduccionalmente procesados mediante clivaje proteolítico produciendo las proteínas maduras MA, CA, NC, p1, p2 y p6. La región *pol* codifica las enzimas RT (que posee las actividades ADN-polimerasa-ARN dependiente, ADN-polimerasa-ADN dependiente y ARNasa H), la IN y la PR. La región *env* codifica las glicoproteínas TM y SU, las cuales forman el complejo que interacciona específicamente con el receptor celular [24]. Una vez integrado al genoma celular, el ADN proviral se encuentra flanqueado por repeticiones terminales largas (LTR, *Long Terminal Repeats*) generadas durante el proceso de transcripción inversa. Los LTR están compuestos por las regiones U3, R y U5 y son los responsables de regular, al menos en parte, la expresión de los genes virales. Dentro del genoma se hallan también intrones. El mecanismo de *splicing* es utilizado como estrategia para regular, de manera temporal, la expresión génica. En la figura 4 se muestra la organización del genoma proviral.

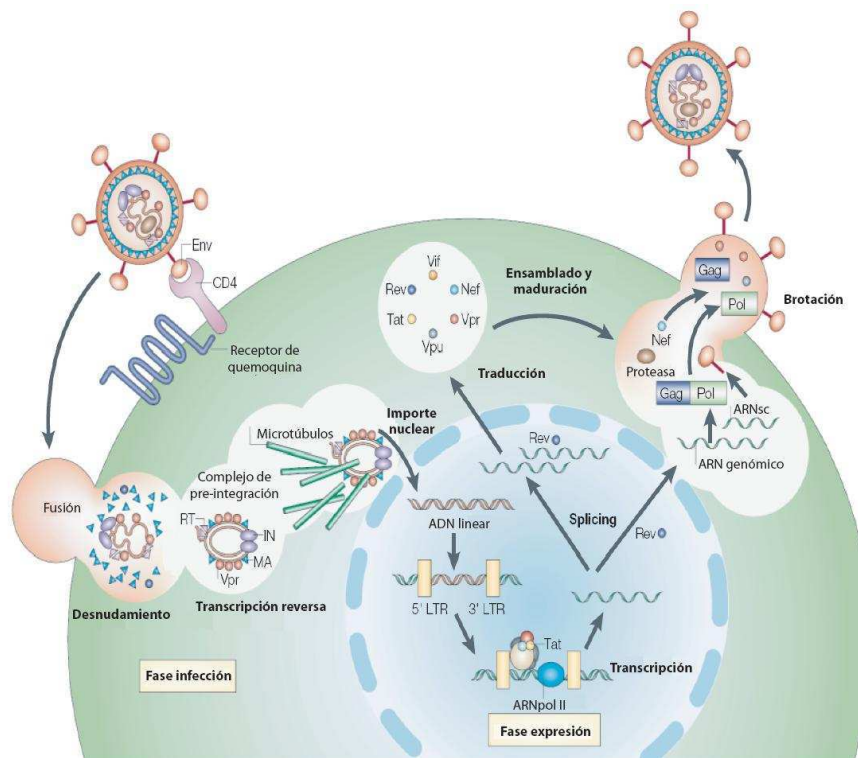


**Figura 4:** Genoma proviral del HIV (9,2 Kb). Contiene marcos de lectura abiertos (ORFs, *open reading frames*) para 16 proteínas que son sintetizadas a partir de al menos 10 transcritos [26].

## I. 3. 2. Ciclo de Replicación

### I.3.2.1. Adsorción y entrada

La entrada del virus a la célula blanco esta mediada por la interacción de dos glicoproteínas virales con dos moléculas en la membrana celular. El receptor es la molécula CD4 que interacciona con la glicoproteína SU, y el correceptor pertenece a la familia de los receptores de quemoquinas, los cuales interaccionan con la glicoproteína TM [27]. Los correceptores más importantes para el HIV-1 son el CCR5 y CXCR4 [28-30], los cuales determinan el tropismo viral (variantes R5-trópicas y X4-trópicas). Luego de la adsorción de la partícula viral se produce la fusión entre la envoltura viral y la membrana de la célula blanco [31]. Posteriormente se produce la liberación de la NC al citoplasma celular y el desnudamiento (*Figura 5*).



**Figura 5:** Esquema simplificado del ciclo de replicación del HIV-1. Se resaltan los eventos más sobresalientes, modificado de *Peterlin et. al.* [26].

### **I.3.2.2. Retrotranscripción**

Luego de la liberación de la NC viral al citoplasma y el desnudamiento, tiene lugar la transcripción inversa del genoma viral (*Figura 5*). Este proceso está catalizado por la enzima viral RT, la cual convierte al genoma viral en una molécula de ADN doble cadena (ADNdc). La RT no posee actividad de lectura de prueba (o *proof-reading*). Esto conduce a la producción de variantes denominadas cuasiespecies y a la gran diversidad inter-aislamientos que se observa para el HIV [24].

### **I.3.2.3. Entrada al núcleo e integración**

Finalizada la transcripción inversa, el ADN es traslocado al núcleo como parte de un complejo de pre-integración ribonucleoprotéico que incluye, además del ADNdc, a las proteínas virales IN, RT, MA y Vpr [32] (*Figura 5*). Al igual que otros lentivirus, HIV tiene la capacidad de entrar al núcleo de células que no se encuentran en proceso de división celular, a través de los poros nucleares, en lugar de esperar a la disgregación de la membrana nuclear durante la mitosis. El mecanismo de entrada al núcleo es muy complejo y aún no está del todo estudiado [33]. Una vez que el complejo está localizado en el núcleo, la enzima viral IN cataliza la reacción de integración [25].

### **I.3.2.4. Transcripción y regulación post-transcripcional**

Durante el proceso de transcripción, los transcritos virales adquieren la estructura denominada *Cap* (compuesto por un residuo 7-metilguanosina unido al trifosfato del extremo 5'), son poliadenilados en el extremo 3' y son prácticamente indistinguibles de otros ARN mensajeros (ARNm) celulares. Se generan 3 clases de ARNm a partir de transcritos de HIV (9Kb, 4Kb y 2Kb). La regulación esta mediada por la proteína Rev, mediante su interacción con el elemento RRE presente en los transcritos. A través de esta unión dirige el pasaje de los transcritos desde el núcleo hacia el citoplasma para su traducción [27] (*Figura 5*).

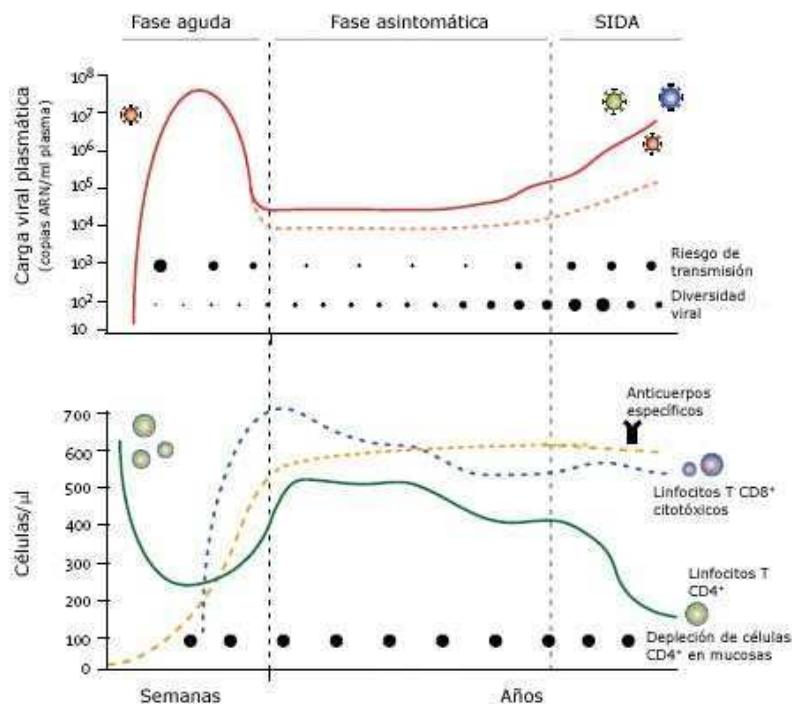
### **I.3.2.5. Ensamblado, maduración y brotación**

El objetivo final del proceso de replicación viral es generar progenie. Para ello, el ARN genómico (transcripto de 9Kb) debe ser encapsidado y transportado a regiones especializadas donde se produce la brotación. Durante el proceso de brotación, la PR viral cliva a los precursores Pr55<sub>gag</sub> y PR160<sub>gag-pol</sub> en sus unidades elementales (*Figura 5*). En la etapa de maduración, la partícula viral cambia su morfología, adoptando la típica estructura esférica y con su cápside cónica ubicada en el centro de la misma (*Figura 3*).

## **I. 4. INMUNOPATOGENIA**

Históricamente, el proceso que conduce al SIDA se consideró como un proceso paulatino de degradación del sistema inmune. Sin embargo, hoy se conoce que la alta tasa de replicación viral que se observa en las etapas agudas de la infección dispara el proceso patogénico que culmina, años más tarde, en la progresión a SIDA. La transmisión a través de mucosas (vaginal o rectal) comienza con la infección de un número pequeño de linfocitos T de memoria efectores CD4<sup>+</sup>CCR5<sup>+</sup> [34], macrófagos y células dendríticas ubicadas en la lámina propia [35]. En la gran mayoría de los casos, las variantes virales responsables de una nueva infección son variantes con tropismo R5. Las células dendríticas residentes no sólo son sensibles a la infección sino que también facilitan la diseminación viral [36]. La primera amplificación viral es modesta y ocurre en órganos linfáticos regionales (por ejemplo nódulos linfáticos drenantes). A partir de allí, los linfocitos T infectados y viriones libres son volcados al torrente sanguíneo, permitiendo la colonización de otros órganos (tracto gastrointestinal, bazo, médula ósea) y la infección masiva de células susceptibles [37]. Esto resulta en un pico de viremia ( $10^6$  a  $10^7$  copias de ARN viral/ml de plasma) que, a veces, puede coincidir temporalmente con la aparición de síntomas clínicos denominados, en conjunto, Síndrome Retroviral Agudo y que incluyen fiebre, linfadenopatías, sudoración nocturna y artralgia, entre otros [38] (*Figura 6*). El descenso del pico de viremia y la reversión de los síntomas agudos son atribuidos a la acción de linfocitos T citotóxicos CD8<sup>+</sup> (CTLs, *cytotoxic T lymphocytes*) y, en menor medida, al agotamiento de células blanco. Esto

es seguido por el establecimiento del *set point* viral el cual varía de persona en persona y es un potente predictor de la progresión a la enfermedad [39].



**Figura 6:** Curso natural de la infección por HIV-1. La etapa aguda se caracteriza por alta carga viral (línea roja), descenso en el recuento de células T CD4<sup>+</sup> y ausencia de anticuerpos específicos. Luego de la infección aguda, la carga viral se estabiliza en distintos niveles en diferentes pacientes (*set point*, línea roja punteada). La diversidad viral aumenta a lo largo del tiempo mientras que el riesgo de transmisión es máximo durante la etapa aguda y hacia las etapas finales de la infección. El descenso del pico de viremia está asociado a la aparición de linfocitos T CD8<sup>+</sup> específicos. Los anticuerpos específicos aparecen luego. La depleción de células T CD4<sup>+</sup> que ocurre a nivel de mucosas no se recupera a lo largo del tiempo [40].

La aparición de anticuerpos específicos en el suero de los pacientes es posterior al control de la replicación viral (*Figura 6*) por lo que se cree que no desempeñarían un papel fundamental en la misma. Los anticuerpos ampliamente neutralizantes (capaces de neutralizar diversos subtipos de HIV), son producidos por aproximadamente un 20% de los pacientes [41]. A tiempos tempranos post-infección, la población viral es homogénea pero luego se diversifica generando una innumerable cantidad de cuasiespecies y dando origen a variantes de escape a la neutralización y a la acción de los CTLs así como también variantes resistentes a drogas antirretrovirales. El desarrollo de estas mutantes de escape es la causa de que los anticuerpos neutralizantes no provean un beneficio para el paciente [42].

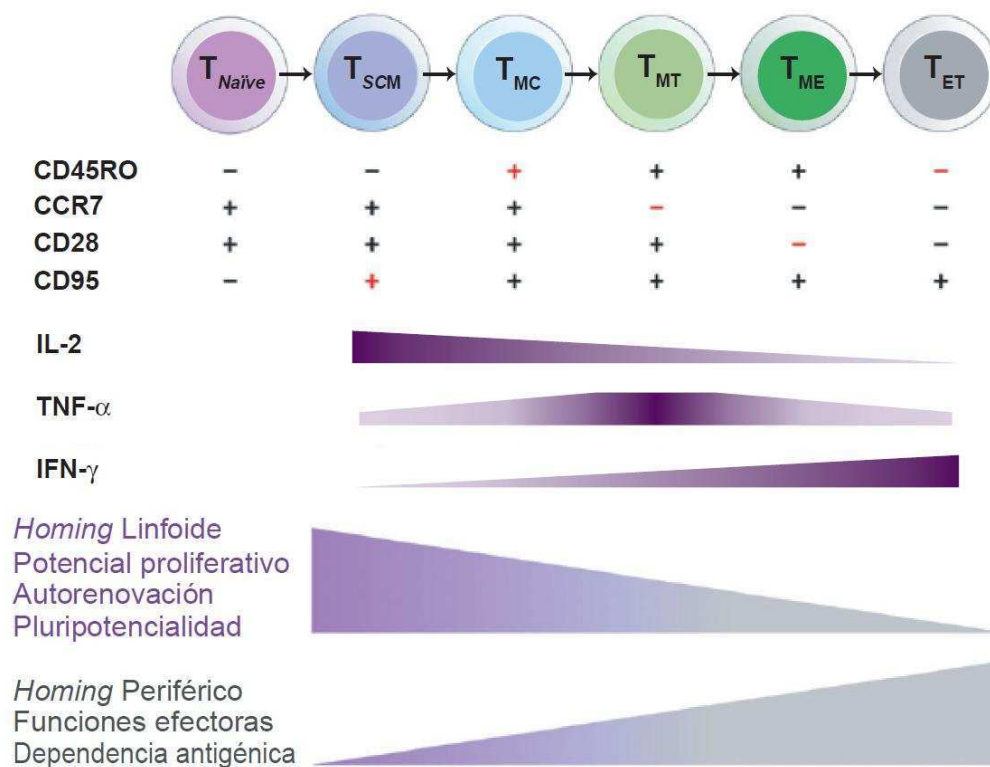
Lo que distingue a la infección por HIV es la depleción progresiva de las células T CD4<sup>+</sup> [43] tanto por eliminación directa debido a la infección como por la formación de sincisios con células *bystander*, activación inmune, proliferación y senescencia. Durante la infección temprana se produce una reducción transitoria de las células T CD4<sup>+</sup> circulantes, seguida por una recuperación que alcanza valores cercanos a los normales, que luego disminuyen lentamente hasta llegar el advenimiento de la enfermedad (*Figura 6*). El efecto más importante en la homeostasis de las células T ocurre de manera temprana en el tracto gastrointestinal, donde ocurre una depleción masiva de células T CD4<sup>+</sup> activadas. A lo largo del tiempo, esta población no se recupera ni siquiera en el marco del tratamiento antirretroviral de alta eficiencia (HAART, *Highly Active Antiretroviral Treatment*) [44], lo que se contrapone a lo observado para células T CD4<sup>+</sup> circulantes en sangre periférica. Finalmente, la gran depleción de células linfoides en el tracto gastrointestinal, junto con la apoptosis de enterocitos y el aumento de la permeabilidad en el tracto gastrointestinal, conlleva a un aumento de la concentración en plasma de productos microbianos, como son los lipopolisacáridos [45]; lo que contribuiría en gran medida a la activación inmune generalizada, típica de los individuos infectados. Los marcadores de activación inmune durante la infección por HIV predicen, de una mejor manera, la progresión a la enfermedad que la carga viral (CV) plasmática. Esta activación inmune generalizada y crónica está caracterizada por un incremento en la tasa de activación de células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> y células *natural killer* (NK) que se encontraban en estado de reposo; un incremento en la muerte de células T y NK, activación de células B policlonales con un aumento en los niveles de inmunoglobulinas y una producción elevada de citoquinas proinflamatorias [46].

### **I. 5. RESPUESTA CITOTÓXICA T CD8<sup>+</sup> ESPECÍFICA**

Durante la infección aguda de HIV, la respuesta por parte de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> se correlaciona con el declive inicial en la replicación del virus (*Ver capítulo I. 4.*). Pero a pesar de esta disminución en la viremia, la gran mayoría de los individuos infectados no son capaces de controlar la replicación viral, por debajo de los niveles de detección, en ausencia

de la terapia HAART. Está bien establecido que aquellos individuos infectados que mantienen altos recuentos de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y se encuentran clínicamente sanos por largos períodos de tiempo (denominados no progresores a largo plazo [LTNP, *long-term nonprogressors*]) [47, 48] son aquellos que presentan una respuesta T CD8<sup>+</sup> robusta de manera temprana, comparado con aquellos sujetos que progresan a la enfermedad; mostrando claras asociaciones entre la respuesta celular T CD8<sup>+</sup> y el control viral. Dentro del grupo de LTNP se diferencian a aquellos individuos que controlan la replicación viral hasta alcanzar niveles bajos (controladores virémicos, [*virus controllers*]) o indetectables (controladores elite, [EC, *elite controllers*])[49, 50]. Por otro lado, los primeros reportes provenientes de macacos infectados con el virus de la inmunodeficiencia simiana (SIV, *simian immunodeficiency virus*), donde se eliminaron de manera temprana las células T CD8<sup>+</sup>, mostraron que en ausencia de esta población celular la replicación viral aumentaba hasta unas diez veces, en comparación a los niveles que se observaban en presencia de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> [51, 52], demostrando que esta población celular juega un rol crítico a la hora de controlar la replicación viral *in vivo*. Por lo tanto, una vez que la infección ya se ha establecido, la respuesta T CD8<sup>+</sup> es crítica para el control de la replicación tanto del HIV como del SIV; sin embargo las células T CD8<sup>+</sup> no son entidades individuales con una única función, sino que en conjunto comprenden una población celular, que en el contexto de la infección por HIV, presentan una complicada ruta de diferenciación y poseen una gran capacidad de ejercer múltiples funciones [53] (*Figura 7*), de las cuales un gran número de ellas pueden afectar la replicación del virus. En este sentido, la caracterización de esta población celular es de suma importancia para la definición de los posibles correlatos inmunes de protección, es decir las características deseables que una vacuna debería tener con el fin de poder generar una respuesta que contenga la exposición al virus.





**Figura 7:** Diferenciación de las células T de memoria. La expresión positiva o negativa de CD45RO, CCR7, CD28 y CD95 identifican a 6 subpoblaciones de células T. Los marcadores que cambian según ocurre la diferenciación desde una subpoblación a la siguiente están indicados en rojo. A medida que ocurre la diferenciación celular desde  $T_{SCM}$  hasta  $T_{ET}$ , las subpoblaciones pierden o adquieren funciones específicas de manera progresiva.  $T_{Naive}$ : células *naïve*;  $T_{SCM}$ : células *stem cell* de memoria;  $T_{MC}$ : células de memoria central;  $T_{MT}$ : células de memoria transicional;  $T_{ME}$ : células de memoria efectora;  $T_{ET}$ : células efectoras terminales. Modificado de *Mahnke et. al.* [53].

La intensidad de la respuesta inmune varía según que proteína viral es reconocida como blanco. La respuesta T CD8<sup>+</sup> está dirigida directamente contra algunos pocos epítopes con patrones inmunodominantes [54]. Reportes recientes muestran que aquellos individuos capaces de reconocer ciertos epítopes presentan *set points* virales más bajos. Más aún, la conservación de esta respuesta temprana ha sido asociada con una progresión lenta a la enfermedad y con un recuento de células T CD4<sup>+</sup> estable [54]. Los individuos EC presentan una respuesta T CD8<sup>+</sup> dirigida ampliamente contra Gag y con una gran capacidad de mediar actividad antiviral [55, 56]. Luego del pico de viremia, estos individuos reducen y mantienen los niveles de CV plasmática por debajo de los límites de detección.

Las funciones antivirales de las células T CD8<sup>+</sup> no se caracterizan por una única función celular, sino que cada célula es capaz de producir un amplio espectro de moléculas

efectoras. La polifuncionalidad celular se describe como la habilidad de una célula de producir por lo menos tres marcadores; entre los cuales se encuentran CD107A/B, la proteína inflamatoria de macrófagos 1 $\beta$  (MIP-1 $\beta$ , *Macrophage Inflammatory Protein*), interferón  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), interleuquina 2 (IL-2) y el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ , *tumor necrosis factor alpha*) como los más típicos. La polifuncionalidad de la respuesta ha sido asociada con la capacidad de mediar control viral [47, 57, 58]. Un reporte reciente, muestra que los individuos que poseen altos porcentajes de células polifuncionales presentan altos niveles de perforinas y un mayor recuento de células T CD4<sup>+</sup> [59], sin embargo, aún no ha sido elucidado si alguna de estas moléculas secretadas por los linfocitos T CD8<sup>+</sup> es enteramente responsable de mediar la inhibición viral o si actúan de manera conjunta, o junto a factores no analizados todavía.

Algunos reportes recientes sugieren que, además de la especificidad y la calidad de la respuesta, el fenotipo sería también determinante de la habilidad de las células de mediar control. Los linfocitos T CD8<sup>+</sup> atraviesan un largo camino de diferenciación que comienza con una célula en estado *naïve*, pasando por células de memoria y culmina con células efectoras terminales (*Figura 7*). Las células T de memoria o efectoras poseen la capacidad de montar una respuesta secundaria de forma rápida en respuesta a la infección, mientras que las células *naïve* al no haber estado en contacto con el antígeno previamente no son funcionalmente activas de manera inmediata. Recientemente se han postulado ciertas asociaciones entre el estadio de diferenciación de las células T CD8<sup>+</sup> HIV-específicas y el control viral [60, 61], donde aquellos individuos con mayor capacidad de inhibir la replicación viral, presentan altas frecuencias de células en estadios terminales [62], con una mayor capacidad de proliferación, lo cual contribuiría a un elevado efecto antiviral.

Dado que aún no se ha desarrollado una vacuna esterilizante o una cura terapéutica para la infección por HIV, es de suma importancia la comprensión de los correlatos inmunes de protección que puedan proteger de la enfermedad en un posible caso de infección. Mientras que una vacuna esterilizante sigue siendo la elección óptima, mejorar la calidad de la

respuesta inmune una vez establecida la infección, podría tener un tremendo impacto en la resolución de la pandemia. La reducción del virus, circulante y en reservorios, puede mejorar la condición de los individuos infectados así como también disminuir significativamente la diseminación de la infección, al reducir el riesgo de transmisión. Por lo tanto, sigue siendo fundamental el estudio del rol que juegan las células T CD8<sup>+</sup> en el control de la replicación viral, estableciendo relaciones claras entre las funciones de la población celular y el control viral.

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


## **II. OBJETIVOS E HIPÓTESIS**


Se encuentra clínicamente bien establecido que, desde el momento que una persona adquiere la infección por HIV-1, existen distintas formas en que cada sujeto puede progresar. Esto permite estratificar a los individuos en distintos grupos, definiendo así a los Progresores Rápidos, Progresores Típicos y LTNP (los cuales incluyen a los Controladores Virémicos y a los EC). Los grupos de LTNP son particularmente interesantes ya que constituyen grupos que naturalmente contienen la replicación viral desde tiempos tempranos post-infección (antes del año) y mantienen este estatus a lo largo de muchos años. Teniendo en cuenta los antecedentes en el área, la propuesta de este trabajo plantea ESTUDIAR LOS DISTINTOS ASPECTOS DE LA RESPUESTA INMUNE QUE PERMITIRÁN CLARIFICAR LOS MECANISMOS INMUNOLÓGICOS TEMPRANOS RESPONSABLES DEL CONTROL DE LA REPLICACIÓN VIRAL DURANTE LA SEROCONVERSIÓN Y DEL ESTABLECIMIENTO DEL *SET-POINT* VIRAL, ASÍ COMO TAMBIÉN LOS BLANCOS ANTIGÉNICOS DE HIV RESPONSABLES DE DICHO CONTROL. Esto también permitirá aportar nuevos conocimientos relacionados a la inmunopatogénesis en la infección por HIV así como también un valioso aporte para el futuro desarrollo de vacunas tanto preventivas como terapéuticas.

## **II. 1. OBJETIVO GENERAL**





ESTUDIAR LA ESPECIFICIDAD, FUNCIONALIDAD Y EL FENOTIPO DE LA RESPUESTA INMUNE (GENERAL Y HIV-ESPECÍFICA) EN UNA COHORTE DE INDIVIDUOS RECIENTEMENTE INFECTADOS POR HIV-1 Y LA ASOCIACIÓN DE ESTOS PARÁMETROS CON LOS DIFERENTES CURSOS DE LA SEROCONVERSIÓN Y PRIMER AÑO DE INFECCIÓN.

### **II. 1. 1. Objetivos específicos**

-  Analizar la especificidad, funcionalidad y el fenotipo de la respuesta inmune celular (TCD8<sup>+</sup>) específica frente a HIV en muestras de sangre periférica.

- Identificar los blancos antigénicos frente a los que se ha generado una respuesta celular HIV-específica. Determinar la magnitud, la amplitud y la calidad de la misma.
  - Analizar la polifuncionalidad de la respuesta celular HIV-específica en cuanto a su capacidad de producción de diferentes citoquinas y quimioquinas y función de citotoxicidad (degranulación).
  - Determinar las propiedades antivirales de la población celular TCD8<sup>+</sup> HIV-específica. Evaluar la capacidad de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> de inhibir la replicación viral *in vitro*.
  - Caracterizar el perfil inmunofenotípico de la población celular T CD8<sup>+</sup> (total y HIV-específica) mediante la determinación de la distribución de las subpoblaciones de memoria y marcadores de agotamiento celular.
-  Estudiar la correlación entre los parámetros de la respuesta inmune planteados y parámetros clínicos, tanto virológicos como inmunológicos, marcadores de progresión y factores genéticos.
- Determinar los parámetros clínicos: carga viral plasmática, recuento de poblaciones linfocitarias y activación inmune celular.
  - Determinar los parámetros genéticos: haplotipo de HLA.
  - Calcular el *set point* viral y el *set point* inmune. Estratificar a la población en estudio según el curso de la seroconversión e infección primaria.
  - Determinar la relación entre la especificidad, funcionalidad y el fenotipo de la respuesta inmune celular HIV-específica con los marcadores de progresión.

## II. 2. HIPÓTESIS DE TRABAJO

-  La especificidad de la respuesta T CD8<sup>+</sup> en individuos PHI está mayormente dirigida contra la proteína Nef.
-  Las células T CD8<sup>+</sup> HIV-específicas polifuncionales y capaces de mediar actividad antiviral se detectan a tiempos tempranos post-infección.
-  El perfil de diferenciación de memoria y agotamiento celular de la población celular T CD8<sup>+</sup> (total y HIV-específica) se encuentra alterado a tiempos tempranos, comparado con individuos sanos.
-  Una mayor especificidad anti-Gag junto con una mayor frecuencia de células T CD8<sup>+</sup> polifuncionales con mayor actividad antiviral y un fenotipo conservado; a tiempos tempranos post-infección; se relacionan con una tasa de progresión lenta a la enfermedad.

### **III. MATERIALES & MÉTODOS**



### III. 1. POBLACIÓN EN ESTUDIO

Se reclutaron un total de 97 participantes para este estudio: 10 donantes seronegativos (DS) para la infección por HIV-1 y 87 sujetos HIV<sup>+</sup>, de los cuales 51 se encontraban cursando la etapa aguda/temprana de la infección por HIV-1 (PHI, infección primaria por HIV, *Primary HIV Infection*), 22 individuos cursaban la etapa crónica de la infección (Crónicos) y 14 EC. Los individuos cursando la etapa aguda/temprana de la infección por HIV-1 fueron reclutados por el Grupo Argentino de Seroconversión siguiendo el siguiente criterio de inclusión [63]: i) serología negativa seguida por una serología positiva para HIV, confirmada por Western Blot (WB), dentro de los 6 meses ii) serología positiva, WB indeterminado y niveles detectables de ARN viral en plasma ó iii) síntomas de infección aguda con serología negativa o indeterminada y posterior confirmación de infección. El grupo de individuos Crónicos se definió como sujetos con infección por HIV-1 establecida por más de 3 años, *naïve* de HAART y CV plasmática detectable mayor a  $4\log_{10}$  copias ARN/ml plasma (de aquí en más copias/ml). El grupo de EC se definió como individuos con infección por HIV-1 establecida por más de 5 años capaces de controlar la viremia en ausencia de intervención terapéutica con CV indetectable (<50 copias/ml), *naïve* de HAART, recuento de células T CD4<sup>+</sup> mayor a 450 células/ $\mu$ l y sin historia de infecciones oportunistas o enfermedades marcadoras.

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

### III. 2. PROCESAMIENTO DE MUESTRAS

De cada individuo participante en este estudio se tomó una muestra de sangre periférica (80 ml) en tubos conteniendo EDTA y se centrifugó a 2500 revoluciones por minuto (rpm) durante 10 minutos. El plasma se separó y se guardó a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento. Las

células mononucleares de sangre periférica (PBMCs, *Peripheral Blood Mononuclear Cells*) se obtuvieron mediante centrifugación en gradiente de densidad *Ficoll-Hypaque* (GE *Healthcare*) y se criopreservaron en nitrógeno líquido, en una solución de suero fetal bovino (SFB, *Gibco BRL*) suplementada con 10% de dimetilsulfóxido (DMSO, *Sigma-Aldrich*), tomando todos los recaudos necesarios para conservar su viabilidad. Además, se separaron de cada individuo  $2 \times 10^6$  PBMCs que se conservaron en seco para la subsiguiente extracción de ácido nucleico. Para cada individuo incluido en el estudio, se determinó la CV plasmática mediante el método de ADN ramificado (*branched-DNA*, *Versant*, *HIV-1 RNA 3.0 assay viral load system*, *Siemens Healthcare*; límite de detección 50 copias de ARN de HIV-1/ml de plasma) y el recuento de las poblaciones linfocitarias ( $CD3^+/CD4^+$  y  $CD3^+/CD8^+$ ) por citometría de flujo (sistema doble plataforma, *BD FACSCanto*, *BD Biosciences*). En las muestras basales pertenecientes al grupo PHI se determinó el estado serológico. En el caso de los individuos PHI, además de la muestra basal (muestra al momento de la inclusión), se tomaron muestras de sangre periférica a los 3, 6, 9 y 12 meses posteriores. Para el resto de los grupos (Crónicos, DS y EC), se tomó una única muestra al momento del reclutamiento.

### III. 3. SUBTIPIFICACIÓN DE HLA

La detección del antígeno leucocitario humano clase I (HLA, *Human leukocyte antigen*) se llevó a cabo utilizando un método casero que consiste en una amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR, *polymerase chain reaction*), seguido de secuenciación nucleotídica, y posterior análisis de las secuencias. El exón 2 y el exón 3 del HLA-A se amplificaron en un único amplicón. El exón 2 y el exón 3 del HLA-B se amplificaron por separado. La amplificación del exón 3 se llevó a cabo mediante una PCR *hemi-nested*, utilizando dos cebadores inversos diferentes. De manera similar el exón 2 y 3 del alelo C se amplificaron por separado utilizando la misma estrategia pero con dos cebadores directos (Ver referencia [64] para mayores detalles). Los amplicones fueron secuenciados de manera directa utilizando el kit de secuenciación *BigDye Terminator* (*Amersham*) en un secuenciador automático (*sequencer Applied Biosystems DNA Sequencer 3100*). Las

secuencias nucleotídicas se analizaron y se ajustaron de manera manual utilizando el software *Sequencher 4.10.1 software* (Gene Codes Co.). La interpretación de las secuencias se llevó a cabo con el software SBT (tipificación por secuenciación, *sequencing based typing*) del NCBI (Centro Nacional para la Información Biotecnológica; *National Center for Biotechnology Information*) disponible online en (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gv/mhc/sbt.cgi?cmdmain>).

### III. 4. PÉPTIDOS

En los ensayos que se describirán a continuación se utilizaron como estímulos péptidos correspondientes a las proteínas Gag, Env y Nef de HIV-1. Los mismos se obtuvieron a través del programa de provisión de reactivos (*AIDS Reference and Reagent Program*) de los Institutos Nacionales de Salud de EEUU (NIH, *National Institutes of Health*). Los paneles de péptidos que se utilizaron (HIV-1 PTE [*potential T cell epitopes*] Gag/Env/Nef *Peptides*) presentan 15 aminoácidos (aa) de longitud e incluyen a todos los potenciales epítopes de células T descritos para diferentes variantes de HIV-1 circulantes a nivel mundial, permitiendo maximizar la detección de respuestas positivas [65]. En este trabajo se agruparon los péptidos en 9 mezclas o *pools*: uno correspondiente a la proteína Nef (127 péptidos); tres *pools* que comprenden a la proteína Gag (correspondientes a las subunidades p17 = 97 péptidos; p24 = 128 péptidos y p2p7p1p6 [denominado de ahora en adelante Resto de Gag (RG)] = 95 péptidos), y cinco *pools* correspondientes a la proteína Env (Gp120A1 = 73 péptidos, aa 1 al 154; Gp120A2 = 73 péptidos, aa 157 al 284; Gp120B = 105 péptidos, aa 287 al 511; Gp41A = 114 péptidos, aa 513 al 689; y Gp41B = 115 péptidos, aa 689 al 842). También, se utilizó el *pool* de péptidos virales CEF (Citomegalovirus, Epstein Barr e Influenza), el cual es una mezcla de péptidos derivados de los mencionados virus [66] que se utilizó como control positivo. Todos los péptidos llegaron al laboratorio liofilizados, fueron cuidadosamente resuspendidos en DMSO en una concentración final de 40 µg/µl, alicuotados y guardados a -20°C hasta su utilización.

### III. 5. ENSAYO DE ELISPOT

Para realizar un primer *screening* de células HIV-específicas, se evaluó la presencia de células T secretoras de IFN- $\gamma$ , mediante el ensayo de puntos por inmunoabsorción unida a enzimas (ELISPOT, *Enzyme-Linked ImmunoSpot*). El mismo fue puesto a punto en el laboratorio por nuestro grupo [67]. Para ello, se cubrieron placas de 96 pocillos con fondo de fluoruro de polivinilideno (PVDF, *polyvinylidene difluoride*; *MultriScreen IP plates*, *Millipore*, EE.UU.) durante 16 horas a 4°C con una solución 5  $\mu\text{g/ml}$  de anticuerpo monoclonal anti-IFN- $\gamma$  humano (BD *Biosciences*, EE.UU.), en solución tamponada de fosfatos (PBS, *Phosphate Buffer Saline*). Los PBMCs de cada individuo fueron descongelados y lavados dos veces (5 minutos 1500 rpm) en medio RPMI 1640 (*Gibco BRL*) suplementado con 10% de SFB, 2 mM L-glutamina (*Gibco BRL*), 100 U/ml penicilina (*Gibco BRL*), 100  $\mu\text{g/ml}$  estreptomina (*Gibco BRL*), 10 mM HEPES (*Gibco BRL*) (en adelante, medio RPMI completo) con el agregado de 50U/ml de DNAsa I (*Benzonase*, *Sigma-Aldrich*). Las células se resuspendieron en RPMI completo sin DNAsa a una densidad de  $10^6$  células/ml y se incubaron a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub>, durante toda la noche (ON, *overnight*). La viabilidad celular se chequeó mediante el método de exclusión de las células muertas por tinción con azul tripán (*trypan blue*) tanto luego del descongelado como de la incubación ON. Solamente las muestras con un 95% de viabilidad celular fueron utilizadas para el ensayo.

A la mañana siguiente, las placas recubiertas fueron lavadas 4 veces con PBS y se bloquearon durante 2 horas a 37°C con 200  $\mu\text{l/pocillo}$  de medio RPMI completo. Finalizado el bloqueo, se removió el medio de las placas y se dispensaron los PBMCs a una densidad de  $10^5$  células/pocillo. Los *pools* de péptidos se diluyeron en medio RPMI completo y se añadieron en cada pocillo, alcanzando una concentración final de 2  $\mu\text{g/ml}$ . Cada condición se ensayó al menos por duplicado. Para cada sujeto testeado se incluyó un control negativo (RPMI completo, sin péptidos, suplementado con 0,05% DMSO) y dos controles positivos: un control de estimulación policlonal (PMA/Ionomicina) consistente en 5 ng/ml de acetato

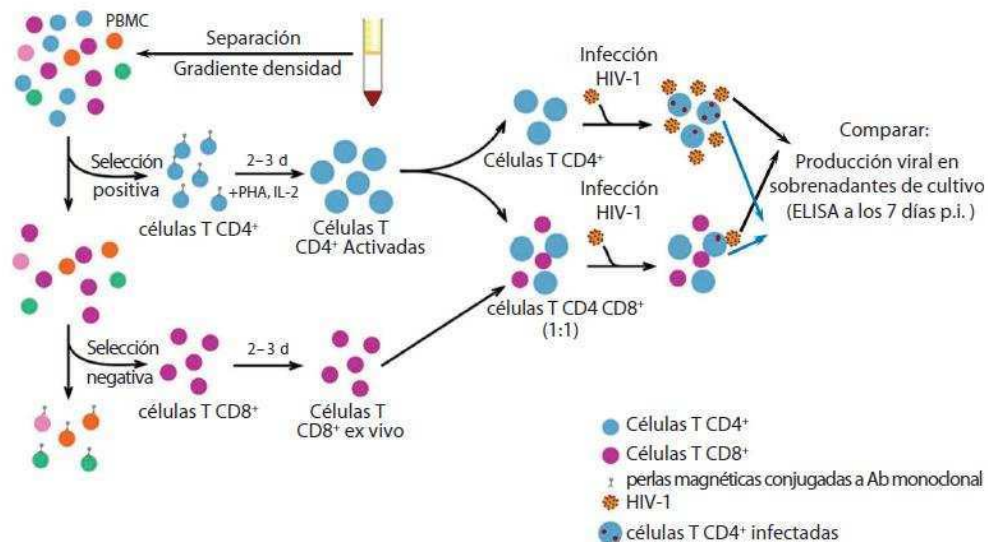
forbol miristato (PMA, *phorbol myristate acetate*, Sigma-Aldrich) más 500 ng/ml Ionomicina (Sigma-Aldrich) y un control de estimulación específica consistente en el *pool* de péptidos CEF (concentración final 2 µg/ml). Las placas se incubaron ON a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% CO<sub>2</sub>. Luego, se lavaron 4 veces con PBS suplementado con 0,05% Tween 20 (de ahora en más PBS-Tween, Promega, EE.UU.) y se agregaron 100 µl/pocillo del anticuerpo monoclonal anti-IFN-γ humano biotinilado (BD Biosciences) previamente diluido (2 µg/ml) en PBS suplementado con 10% SFB y filtrado a través de un filtro de PVDF de 0,22 µm (Millipore). Después de 2 horas de incubación a temperatura ambiente, las placas se lavaron 4 veces con PBS-Tween y se agregaron 100 µl/pocillo del complejo estreptavidina-peroxidasa (SAV-HRP, BD Biosciences) diluido en PBS. Las placas se incubaron 1 hora a temperatura ambiente, se lavaron 4 veces con PBS-Tween seguido de 2 lavados más con PBS sólo.

Para el revelado de la reacción se utilizó el reactivo AEC (3-amino-9-etil-cabazol, BD Biosciences) siguiendo las instrucciones del proveedor. Una vez secas, las placas se analizaron en el lector de placas de ELISPOT *ImmunoSpot* (Cellular Technology Ltd., EE.UU.) y se procedió al contado de los *spots* utilizando el *software Immunospot*. El tamaño, forma y apariencia de los *spots* observados en los pocillos del control positivo (CEF) se utilizaron como referencia de aceptación de aquellos observados en los pocillos experimentales. Los resultados se expresaron como unidades formadoras de *spots* (SFU, *spot forming units*)/10<sup>6</sup> PBMCs, luego de haberse restado el valor de *background* (es decir, el obtenido para el control negativo). El umbral de positividad para la respuesta se estableció como al menos 50 SFU/10<sup>6</sup> PBMCs o como 3 veces el promedio de los controles negativos si esto último fuera mayor a 50 SFU/10<sup>6</sup> PBMCs. Además del número de *spots*, se registró el tamaño promedio de los *spots* frente a un determinado estímulo.

### III. 6. ENSAYO DE SUPRESIÓN VIRAL (VIA, VIRAL INHIBITORY ACTIVITY)

Con el objetivo de evaluar la capacidad de las células T CD8<sup>+</sup> de suprimir la replicación viral en células primarias T CD4<sup>+</sup> autólogas, nuestro grupo ha puesto a punto la metodología

basada en el trabajo de *Saenz-Cirion* y colaboradores [68], con algunas modificaciones menores (*Figura 8*): Luego de la incubación a 37°C post-descongelación, se procedió a la separación de las células CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> a partir de los PBMCs mediante el uso de un *kit* de separación magnética (*BD Biosciences*) por selección positiva.



**Figura 8:** Esquema del ensayo de supresión viral. Modificado de *Saenz-Cirion et. al.* [68].

En primer lugar, se lavaron las células T con una solución de PBS suplementado con 0,5% de albumina sérica bovina (BSA, *bovine serum albumin*), 2mM EDTA y 0,09% azida (de ahora en más solución S). Luego, se procedió a la separación de las células CD4<sup>+</sup> mediante la utilización de un anticuerpo monoclonal anti-CD4 (*BD Biosciences*) que se encuentra conjugado a nanopartículas magnéticas. Para ello, se dispensaron las células en tubos plásticos de 3ml apropiados para la separación magnética. Se mezclaron 50µl de nanopartículas por cada 10<sup>7</sup> PBMCs y se los incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Finalizada la incubación, se diluyó la muestra con solución S y se incubó durante 10 minutos depositando el tubo en el imán magnético para de esta manera poder aislar las células que se hayan pegado a las nanopartículas. Luego sin retirar el tubo del imán, se aspiró el sobrenadante en su totalidad (el cual se reservó para la posterior separación de las células CD8<sup>+</sup>), se retiró el tubo del imán y se resuspendieron las células en solución S, se colocó nuevamente el tubo en el imán y se realizó el procedimiento dos veces más a modo

de lavado. La fracción depletada de células CD4<sup>+</sup> fue nuevamente sometida a separación magnética para recuperar las células CD8<sup>+</sup>. Para ello, se procedió de la misma manera mencionada para las células CD4<sup>+</sup> pero utilizando un anticuerpo monoclonal anti-CD8 (*BD Biosciences*) que también se encuentra conjugado a nanopartículas magnéticas. La primera fracción recuperada, donde se encuentran las células CD4<sup>+</sup>, se resuspendió a una densidad de 10<sup>6</sup> células/ml en medio RPMI completo suplementado con 1µg/ml de fitohemaglutinina (PHA, *phytohemagglutinin*, *Sigma-Aldrich*) y se cultivaron durante 3 días a 37°C en una atmosfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub>. Las células CD8<sup>+</sup> recuperadas fueron cultivadas en medio RPMI completo durante 3 días, en las mismas condiciones. Pasados los 3 días, ambas fracciones celulares fueron lavadas, contadas y re-plaqueadas en una placa de 96 pocillos con fondo en U en una relación 1:1. La placa se centrifugó y se retiró el sobrenadante para proceder con la infección del co-cultivo con dos cepas virales de laboratorio previamente tituladas: la cepa HIV/LAI (cepa con tropismo X4) y la cepa HIV/BAL (cepa con tropismo R5). La infección se realizó a una MOI 0,001 y en un volumen final de 100µl. Para una mejor eficiencia de infección, se sometió a las placas a una espinoculación. Para ello, las placas fueron centrifugadas a 1200 g durante una hora a 22°C. Luego, se procedió con la adsorción viral durante una hora más a 37°C en atmosfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub>. Finalizada la adsorción, se realizaron dos lavados y se cultivaron las células en medio RPMI completo suplementado con 10U/ml de IL-2 (*BD Biosciences*) durante 7 días a 37°C en una atmosfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub>. Al tercer día post-infección, se reemplazó la mitad del sobrenadante de los co-cultivos por medio fresco. Al día siete post-infección, se recolectaron los sobrenadantes y se evaluó la replicación viral mediante la cuantificación de antígeno p24 en sobrenadante por la técnica de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA, *enzyme-linked immunosorbent assay* [*Vironostika kit* de antígeno p24 para HIV-1; *bioMérieux*]). Para cada sujeto se incluyó un control negativo (células CD4<sup>+</sup> sin infectar) y un control de 100% infección (células CD4<sup>+</sup> infectadas sin el agregado de células efectoras CD8<sup>+</sup>). Todas las condiciones se ensayaron por triplicado. La inhibición de la replicación viral se calculó con la siguiente fórmula:

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

Se expresa como el logaritmo en base 10 del porcentaje de antígeno p24 que se pierde cuando las células CD8<sup>+</sup> están presentes en el cultivo.

### III. 7. MARCADO DE MOLÉCULAS DE SUPERFICIE E INTRACELULARES

El fenotipo y la funcionalidad de las poblaciones celulares T reactivas identificadas por ELISPOT fueron caracterizadas mediante el marcado de moléculas de superficie e intracelulares, por citometría de flujo. Los PBMCs fueron descongelados, lavados, resuspendidos a una densidad de  $4 \times 10^6$  células/ml en medio RPMI completo e incubados a 37°C ON (como fue descrito en el *capítulo III. 5.*). A la mañana siguiente, las células se lavaron y se dispensaron en placas de 96 pocillos con fondo en U a una densidad de  $5 \times 10^5$  células/pocillo. Cada condición se ensayó al menos por duplicado. En caso de contar con suficiente cantidad de células, se incluyeron más réplicas. A fin de proceder con la estimulación de las células, en cada pocillo se agregaron anticuerpos co-estimulatorios (anti-CD28 y anti-CD49d, 1 µg/ml; *BD Biosciences*), monensina (Golgistop, 0,7 µl/ml; *BD Biosciences*), brefeldina A (10 µg/ml; *Sigma-Aldrich*) y el *pool* de péptidos correspondiente (5 µg/ml). Para cada individuo evaluado, se incluyó un control negativo (medio RPMI completo más DMSO y los anticuerpos coestimulatorios) y dos controles positivos (PMA, 10 ng/ml más ionomicina 500 ng/ml y el *pool* de péptidos CEF 2µl/ml final). En una de las réplicas, se agregó una mezcla de anticuerpos anti-CD107A y anti-CD107B, ambos conjugados con el fluoróforo isotiocianato de fluoresceína (CD107A/B-FITC, *BD Biosciences*). Luego, se incubó la placa durante 6 horas a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub>. Dependiendo el ensayo a realizar se prosiguió de la siguiente manera (*Ver capítulo III.7.1. y/o III.7.2.*):



### **III. 7. 1. Evaluación de la funcionalidad de la población celular T CD8<sup>+</sup> específica: capacidad de degranulación (expresión en membrana de CD107A/B) y secreción de citoquinas (IFN- $\gamma$ , IL-2, TNF- $\alpha$ )**

Luego de las 6 horas de estimulación a 37°C, las células se transfirieron a placas de 96 pocillos con fondo en V y se procedió al marcado de las moléculas de superficie CD3 y CD8. Para esto, se utilizaron anticuerpos directamente conjugados a fluoróforos. En el caso de la molécula CD3 se utilizó la proteína pteridinclorofila (PerCP, *peridinin chlorophyll protein*) y para la molécula CD8 alofocianina (APC, *allophycocyanin*) (BD Biosciences). Además se recurrió al marcador de viabilidad *LIVE/DEAD Fixable NEAR-IR* (Invitrogen) el cual marca las células muertas y facilita su exclusión al momento del análisis. El marcado se realizó durante 30 minutos en oscuridad y a 4°C. Luego, las células se lavaron dos veces con RPMI completo, se fijaron y permeabilizaron utilizando las soluciones comerciales *Cytofix/Cytoperm* (BD Biosciences) siguiendo las instrucciones del fabricante. Finalizada la fijación y permeabilización, las células se lavaron 2 veces utilizando la solución *comercial Permwash* (BD Biosciences) y se procedió al marcado de las proteínas intracelulares (30 minutos, 4°C, en oscuridad). Para ello, a la réplica que ya poseía la mezcla anti-CD107A/B, se le agregó los anticuerpos conjugados anti-IL-2-ficoeritrina (PE, *phycoerythrin*) y anti-IFN- $\gamma$ -ficoeritrina-cianina7 (PECy7, *phycoerythrin-cyanine7*) (BD Biosciences), mientras que los anticuerpos anti-IL-2-PE, anti-TNF- $\alpha$ -FITC y anti-IFN- $\gamma$ -PECy7 (BD Biosciences) fueron agregados a la otra réplica. Luego del marcado, las células se lavaron 2 veces con la solución *Permwash*, se fijaron con paraformaldehído 0,5% (PFA, *paraformaldehyde*) y se guardaron a 4°C (por no más de 24 horas) hasta su análisis en un citómetro de flujo BD FACSCanto (BD Biosciences), utilizando el programa BD FACSDiva, versión 6.1.3 (BD Biosciences) para el análisis de los datos (Ver capítulo III. 7. 3. y Figura 9).

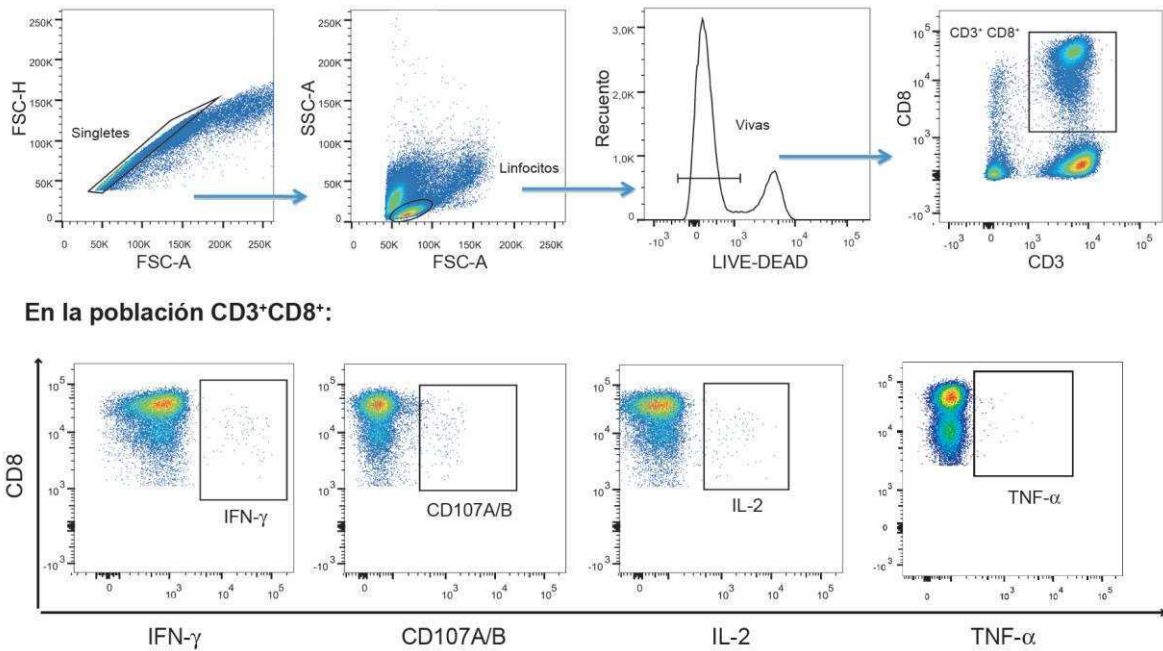
### **III. 7. 2. Evaluación del fenotipo (en términos de expresión de marcadores de memoria y agotamiento) en las poblaciones T CD8<sup>+</sup> total y HIV-específica**

Luego de las 6 horas de estimulación a 37°C, las células se transfirieron a placas de 96 pocillos con fondo en V y se procedió en primera instancia al marcado en superficie del receptor de quimiocinas tipo 7 (CD197/CCR7, *C-C chemokine receptor type 7*) conjugado a PE (*BD Biosciences*) durante 30 minutos a 37°C. Luego de la incubación, las células fueron lavadas una vez con RPMI completo y se prosiguió con la tinción con el marcador de viabilidad *LIVE/DEAD Fixable NEAR-IR*, durante 30 minutos a 4°C, para poder excluir las células muertas del análisis; junto con la marcación de superficie de las moléculas CD3, CD8 y CD45RO conjugadas a -PECy7, -APC y -PeCy5.5 (*BD Biosciences*) respectivamente. Para el análisis de la expresión del marcador de muerte programada 1 (PD-1, *Programmed Cell Death 1*), los PBMCs fueron marcados con un panel separado de anticuerpos que incluyó un anticuerpo anti-PD-1-PE, además de anticuerpos anti-CD3-PECy7, anti-CD8-APC y el marcador de viabilidad *LIVE-DEAD*. Luego de la incubación, las células se lavaron dos veces con RPMI completo, se fijaron y se permeabilizaron utilizando las soluciones *Cytofix/Cytoperm* siguiendo las instrucciones del fabricante. Luego, se procedió con el marcado intracelular de las moléculas IFN- $\gamma$ , IL-2 y TNF- $\alpha$ , todos ellos conjugados a FITC (*BD, Biosciences*) durante 30 minutos a 4°C, en oscuridad. Finalizada la marcación, las células se lavaron dos veces con *la solución Permwash*, se fijaron con 0,5% PFA y se guardaron a 4°C (por no más de 24 horas) hasta su análisis en un citómetro de flujo BD FACSCanto, utilizando el programa BD FACSDiva para el análisis de los datos (*Ver capítulo III. 7. 3. y Figura 9*).

### **III. 7. 3. Análisis por citometría de flujo**

Las células marcadas fueron adquiridas y analizadas por citometría de flujo (*BD FACSCanto 2-laser, 6-colores; BD FACSDiva software versión 6.1.3*). Para cada experimento, se llevaron a cabo los controles de compensación y controles de isotipo correspondientes a cada sujeto evaluado. Para el análisis de funcionalidad (*Ver capítulo III. 7. 1.*), se realizó en

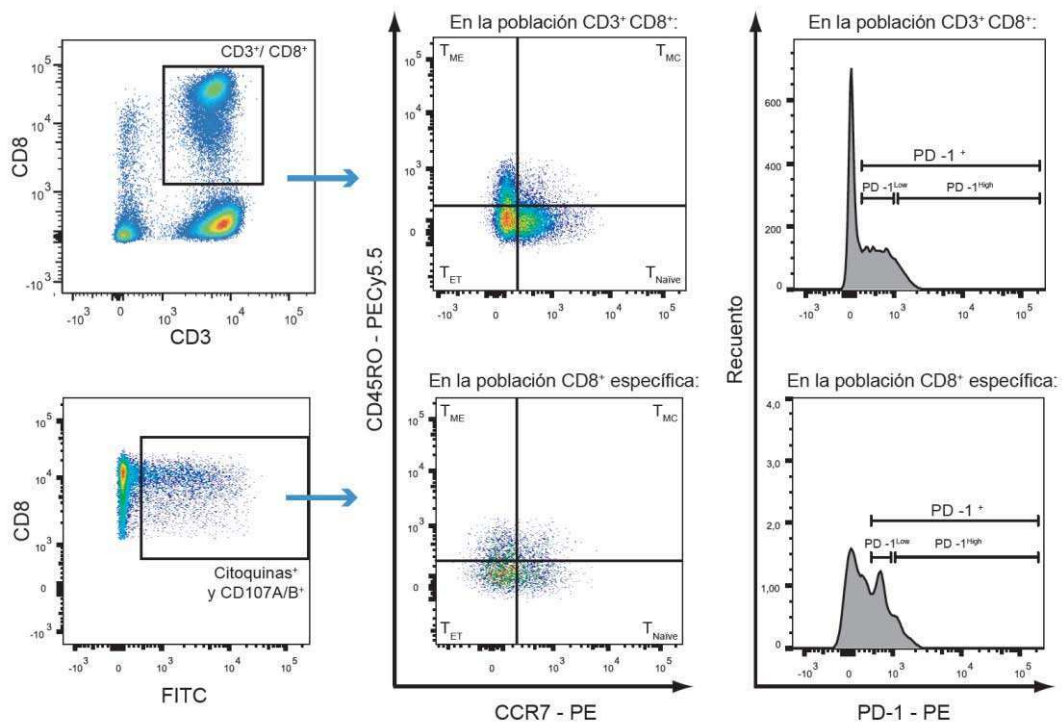
primer lugar un gráfico en función del área y la altura de la dispersión de la luz frontal (FSC-A, *forward scatter area* y FSC-H, *forward scatter height*) para remover dobletes. Luego, la selección inicial de eventos se realizó sobre la población de linfocitos en función de los valores de dispersión frontal y refracción del láser (*forward scatter* y *side-scatter light*), donde se adquirieron un mínimo de 80.000 eventos, seguido por la exclusión de células muertas en base a la fluorescencia del LIVE/DEAD (las muestras que no cumplían el mínimo de eventos adquiridos en esta población no se incluyeron en los análisis posteriores). Luego, se seleccionaron aquellos eventos CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> en un citograma CD3 *versus* CD8. Sobre esta población, se estudió la expresión de citoquinas (IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ) y la degranulación (CD107A/B) (*Figura 9*). Cada función se estudió por separado y en conjunto; esto último se llevó a cabo utilizando las herramientas disponibles en el software de análisis FACSDiva el cual permite realizar la intersección de dos poblaciones (identificando así células bifuncionales: IFN- $\gamma$ /IL-2; IFN- $\gamma$ /TNF- $\alpha$ ; TNF- $\alpha$ /IL-2; IFN- $\gamma$ /CD107A/B e IL-2/CD107A/B) o tres poblaciones (células trifuncionales: IFN- $\gamma$ /TNF- $\alpha$ /IL-2 e IFN- $\gamma$ /IL-2/CD107A/B). Una vez determinados los porcentajes de eventos para cada función, el valor de los eventos triple positivos se sustrajo a aquellos eventos dobles positivos y los eventos doble y triple positivos fueron restados del total de eventos positivos para cada función así determinando el porcentaje de células monofuncionales. Las muestras que mostraron un *background* inespecífico (valor en el control negativo) mayor al 0,5% para cualquiera de las funciones estudiadas, fueron re-analizadas a partir de una nueva alícuota de PBMCs. Para el análisis de ciertas funciones se calculó la intensidad media de fluorescencia relativa (IMFr) como la relación entre la IMF correspondiente a la población T CD8<sup>+</sup> específica sobre el total de la población de células T CD8<sup>+</sup>, para cada función estudiada. La figura 9 esquematiza la estrategia utilizada para la selección y análisis de las poblaciones.



**Figura 9:** Estrategia utilizada para la selección y análisis por citometría de flujo de la población linfocitaria T CD8<sup>+</sup> HIV-específica secretora de citoquinas (IFN- $\gamma$ , IL-2 y TNF- $\alpha$ ) y/o con capacidad de degranulación (CD107A/B).

Por otro lado, se evaluó la expresión de los marcadores CCR7 y CD45RO (marcadores de fenotipo de memoria) y de la molécula PD-1 (marcador de agotamiento) (*Ver capítulo III. 7. 2.*), tanto en la población total de células T CD8<sup>+</sup> como en la población HIV-específica. Para el primer caso, se seleccionó la población de células CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> como fue descrito anteriormente. Luego, se determinaron las subpoblaciones de memoria mediante un citograma CCR7 versus CD45RO (*Figura 10*). Mediante la expresión diferencial de estos dos marcadores se describen cuatro subpoblaciones de linfocitos T CD8<sup>+</sup>: células *Naïve* (T<sub>Naïve</sub>, CCR7<sup>+</sup>/CD45RO<sup>-</sup>); células de memoria central (T<sub>MC</sub>, CCR7<sup>+</sup>/CD45RO<sup>+</sup>); células de memoria efectora (T<sub>ME</sub>, CCR7<sup>-</sup>/CD45RO<sup>+</sup>) y células efectoras terminales (T<sub>ET</sub>, CCR7<sup>-</sup>/CD45RO<sup>-</sup>). En el caso de PD-1, el análisis se realizó mediante un histograma luego de la selección de la población CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>. Por último, para identificar las células T CD8<sup>+</sup> HIV-específicas (células productoras de citoquinas o que degranulan en respuesta a la estimulación con el antígeno) se realizó un citograma en base a la fluorescencia de las mismas en FITC. Cabe destacar que, tanto las citoquinas como CD107A/B, se marcaron con el mismo fluorocromo para optimizar la detección de las células T CD8<sup>+</sup> HIV-específicas, independientemente de su

función. Se consideró una respuesta positiva cuando la población FITC<sup>+</sup> (citoquinas<sup>+</sup> y CD107A/B<sup>+</sup>) en los pocillos estimulados con péptidos fue al menos el doble que el *background*; mayor a un 0,05% luego de restado el *background* y contaba con al menos 50 eventos. Este criterio se estableció para minimizar la posibilidad de error debido a un bajo número de eventos cuando se subdividió las células en las subpoblaciones de memoria. Para ciertos análisis de PD-1, se dividieron los eventos PD-1<sup>+</sup> en función de la IMF que expresa esta molécula, definiendo de esta manera dos poblaciones denominadas PD-1<sup>Low</sup> y PD-1<sup>High</sup>. Además se calculó IMF<sub>r</sub> como la relación entre la IMF correspondiente a la población T CD8<sup>+</sup> PD-1<sup>+</sup> específica sobre el total de la población de células T CD8<sup>+</sup> PD-1<sup>+</sup>. La figura 10 esquematiza la estrategia utilizada para la selección y análisis descriptos.



**Figura 10:** Estrategia utilizada para la selección y análisis por citometría de flujo de las subpoblaciones T CD8<sup>+</sup> en base a su fenotipo de memoria y expresión de PD-1.

### III. 8. ACTIVACIÓN INMUNE

Para caracterizar el nivel de activación inmune celular se analizaron los marcadores CD38 y HLA-DR [69] por citometría de flujo. Para ello, de cada individuo se tomó una alícuota de PBMCs sin estimular y se realizó la marcación de superficie de las siguientes moléculas:

CD3-PECy7, CD4-PERCP, CD8-PE, HLA-DR-FITC y CD38-APC (BD *Biosciences*), durante 30 minutos a 4°C, en oscuridad. Luego de la incubación, las células se lavaron dos veces con RPMI completo, se fijaron con 0,5% PFA y se guardaron a 4°C hasta su análisis en un citómetro de flujo BD FACSCanto, utilizando el programa BD FACSDiva para el análisis de los datos. Se llevaron a cabo los controles de compensación y controles de isotipo correspondientes. Luego de la adquisición de las muestras se procedió al análisis, donde se cuantificó el nivel de activación como el porcentaje de células T CD8 (o CD4) que expresan el marcador CD38, HLA-DR o ambos marcadores en simultáneo.

### III. 9. CUANTIFICACIÓN DE FACTORES SOLUBLES EN PLASMA

La determinación de la concentración plasmática de 39 citoquinas y quemoquinas se llevó a cabo mediante la técnica de *Luminex (MILLIPLEX MAP Human Cytokine/Chemokine; Millipore)*. Dicha técnica permite la determinación simultánea de todos los factores a partir de un pequeño volumen de muestra. Las 39 moléculas evaluadas para este estudio fueron: factor de crecimiento epidérmico (EGF, *epidermal growth factor*), eotaxina, factor de crecimiento de fibroblastos (FGF-2, *fibroblast growth factor*), ligando de Flt-3, fractaquina, factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF, *granulocyte colony-stimulating factor*), factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF, *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*), ligando de quemoquina 1-3 (CXCL1-3 o GRO, *chemokine ligand 1*), IFN- $\alpha$ 2, IFN- $\gamma$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1 $\alpha$ , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12(p40), IL-12(p70), IL-13, IL-15, IL-17, proteína 10 inducida por IFN- $\gamma$  (CXCL10 o IP-10, *interferon gamma-induced protein 10*), proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1, *monocyte chemoattractant protein 1*), MCP-3, quimioquina derivada de macrófago (CCL22 o MDC, *macrophage-derived chemokine*), proteína inflamatoria de macrófagos 1- $\alpha$  (MIP-1 $\alpha$ , *macrophage inflammatory protein 1a*), MIP-1 $\beta$ , sCD40L, sIL-2R $\alpha$ , factor de crecimiento transformante alfa (TGF- $\alpha$ , *transforming growth factor alpha*), TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF, *Vascular Endothelial Growth*

*Factor*). Las muestras fueron procesadas y analizadas como ha sido descrito previamente por *Giavedoni et. al.* [70].

### III. 10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el grupo PHI se calculó el *set point* viral y el *set point* inmune como la media geométrica de las determinaciones de CV plasmática y recuento de células T CD4<sup>+</sup>, respectivamente, obtenidas entre los 6 y 12 meses posteriores a la fecha probable de infección. No se calculó el valor de *set point* para aquellos individuos que iniciaron tratamiento dentro de los 12 meses post-infección o presentaban determinaciones con valores inestables dentro de este período (variaciones mayores a 0,5 log<sub>10</sub> para el caso de la CV). A partir de un estudio piloto y mediante el método de *Harris, Horvitz, Mood*, se estimó el N muestral necesario para proveer una potencia del 80% con un nivel de significancia del 5%. El análisis estadístico de los datos fue llevado a cabo utilizando el programa *GraphPad Prism 5* (*GraphPad Software*, EE.UU.). Todos los datos, excepto el logaritmo decimal de la CV (log<sub>10</sub> CV), se analizaron mediante métodos no paramétricos. Las pruebas de *Wilcoxon* y *Mann-Whitney* se utilizaron para comparar diferencias intra- e inter-grupos, respectivamente. Las correlaciones estudiadas fueron analizadas mediante la prueba de *Spearman's*. Todas las pruebas fueron consideradas estadísticamente significativas cuando el valor de *p* obtenido fue menor de 0,05. Para las correlaciones estudiadas entre los niveles de citoquinas en plasma y los parámetros inmunes, los valores de *p* fueron ajustados por comparaciones múltiples mediante el cálculo de la tasa de descubrimiento falso (FDR, *false discovery rate*), de acuerdo al método de *Benjamini & Hochberg*, utilizando el *software R Project* versión 2.10.0. Este método de ajuste evalúa la proporción esperada de falsos positivos entre las pruebas que fueron significativas. La prueba fue considerada estadísticamente significativa cuando el valor de *p* ajustado (*p*\*) resultó menor a 0,1.

## **IV. RESULTADOS**



#### IV. 1. DESCRIPCIÓN DE LA POBLACIÓN EN ESTUDIO

Para cumplimentar el objetivo general de este trabajo se reclutaron tres grupos de individuos seropositivos para la infección por HIV con el fin de poder dilucidar los mecanismos inmunes tempranos asociados al control y a la progresión a la enfermedad. Cincuenta y un individuos fueron reclutados durante la seroconversión y/o dentro de los primeros seis meses luego de la probable fecha de infección (grupo PHI), 22 individuos en fase crónica de la infección (Crónicos) y 14 individuos EC. Además se incorporaron 10 DS como grupo control (*Tabla 1*). Todos los grupos fueron reclutados acorde a los criterios definidos en Materiales y Métodos. La muestra basal de la mayor parte de los individuos perteneciente al grupo PHI se obtuvo durante los estadios de *Fiebig* V y VI, los cuales representan sub-estadios dentro de la fase aguda/temprana de la infección (*Tabla 1*) [71].

**Tabla 1: Características de los individuos HIV<sup>+</sup> reclutados**

Individuo	Género	Estadio de la infección	Días Post-Infección	Carga Viral Plasmática <sup>a,c</sup>			CD4 <sup>d</sup>		HAART
				Copias ARN/ml	Log <sub>10</sub>	Set point <sup>d</sup> (Log <sub>10</sub> )	Recuento (células/μl)	Set point <sup>d</sup> (células/μl)	
<b>Infección Primaria (PHI)</b>									
NP01	F	VI	60	17.420	4,2	4,1	685	402	NO
NP02	F	VI	60	116.129	5,1	4,8	671	477	NO
NP03	F	V	75	9.532	4,0	4,0	590	587	NO
NP04	F	V	30	>500.000	>5,7	4,3	603	490	NO
NP05	F	VI	60	258.015	5,4	4,5	803	670	NO
NP06	F	V	30	3.265	3,5	ND	440	ND	NO
NP07	M	VI	120	13.962	4,1	4,6	577	544	NO
NP08	M	V	60	104	2,0	2,8	602	638,5	NO
NP09	M	V	30	19.522	4,3	4,2	525	442	NO
NP10	M	VI	60	37.169	4,6	4,6	505	411	NO
NP11	M	V	90	1.093	3,0	4,2	1.012	417	NO
NP12	M	VI	60	8.613	3,9	4,4	778	758	NO
NP13	M	VI	150	256.051	5,4	4,8	797	943	NO
NP14	M	VI	150	46.211	4,7	4,8	633	573	NO
NP15	M	V	30	32.918	4,5	4,5	748	568	NO
NP16	M	V	45	455.417	5,7	5,2	698	685	NO
NP17	M	V	90	2.707	3,4	3,9	902	600	NO
NP18	M	VI	120	32.473	4,5	4,7	500	652	NO
NP19	M	V	170	5.142	3,7	3,1	499	581	NO
NP20	M	V	60	12.736	4,1	5,1	490	454	NO
NP21	M	VI	120	61.045	4,8	4	595	508	NO
NP22	M	V	30	21.986	4,3	4	609	658	NO
NP23	F	VI	60	12.361	4,1	4	732	764	NO
NP24	F	VI	120	9.018	4,0	4	587	410	NO
NP25	M	VI	180	50	1,7	ND	786	788	NO
NP26	M	VI	60	508.085	5,7	5	851	585	NO
NP27	M	VI	90	67.660	4,8	ND	387	ND	NO
NP28	F	VI	90	64.454	4,8	5	391	492	NO
P01	F	VI	150	199.754	5,3	ND	252	ND	SI
P02	F	IV	30	>500.000	>5,7	ND	379	ND	SI
P03	F	VI	90	3.662	3,6	3,9	302	281	NO
P04	F	VI	30	102.297	5,0	ND	222	ND	SI
P05	M	VI	30	35.378	4,5	ND	317	ND	SI
P06	M	VI	150	34.221	4,5	ND	399	ND	SI
P07	M	VI	60	242.199	5,4	ND	161	ND	SI

**Tabla 1: Características de los individuos HIV<sup>+</sup> reclutados**

Individuo	Género	Estadio de la infección	Días Post-Infección	Carga Viral Plasmática <sup>a,c</sup>			CD4 <sup>a</sup>		HAART
				Copias ARN/ml	Log <sub>10</sub>	Set point <sup>d</sup> (Log <sub>10</sub> )	Recuento (células/μl)	Set point <sup>d</sup> (células/μl)	
P08	M	V	90	7.643	3,9	ND	328	ND	SI
P09	M	VI	30	4182153	6,6	ND	104	ND	SI
P10	M	V	50	98.684	5,0	4,9	256	256	NO
P11	M	IV	60	>500.000	>5,7	ND	259	ND	SI
P12	M	V	30	>500.000	>5,7	ND	341	ND	SI
P13	M	VI	90	743	2,9	ND	619	ND	NO
P14	F	V	30	500.000	5,7	5	374	342	NO
P15	M	V	60	1.315	3,1	4	504	424	NO
P16	M	V	50	145.002	5,2	ND	308	ND	NO
P17	M	III	30	500.000	5,7	ND	117	ND	NO
P18	M	VI	60	500.000	5,7	5	333	297	NO
P19	M	VI	80	500.000	5,7	ND	475	ND	SI
P20	M	VI	120	283.825	5,5	ND	282	ND	SI
NI1	F	V	90	1.810	3,3	ND	499	ND	NO
NI2	M	VI	90	318.838	5,5	5	655	563	NO
NI3	M	V	60	16.926	4,2	ND	801	ND	NO
<b>Crónicos</b>									
C01	F	Crónicos	-	22.475	4,4	-	143	-	NO
C02	F	Crónicos	-	14.784	4,2	-	139	-	NO
C03	F	Crónicos	-	36.399	4,6	-	555	-	NO
C04	M	Crónicos	-	4.718	3,7	-	441	-	NO
C05	M	Crónicos	-	2.889	3,5	-	606	-	NO
C06	M	Crónicos	-	34.395	4,5	-	4	-	NO
C07	M	Crónicos	-	291.184	5,5	-	13	-	NO
C08	M	Crónicos	-	179.591	5,3	-	16	-	NO
C09	F	Crónicos	-	253.164	5,4	-	5	-	NO
C10	M	Crónicos	-	11.026	4,0	-	585	-	NO
C11	M	Crónicos	-	18.580	4,3	-	511	-	NO
C12	M	Crónicos	-	12.800	4,1	-	704	-	NO
C13*	F	Crónicos	-	1.286	3,1	-	1.071	-	NO
C14	M	Crónicos	-	22.060	4,3	-	293	-	NO
C15*	M	Crónicos	-	555	2,7	-	555	-	NO
C16	M	Crónicos	-	43.436	4,6	-	479	-	NO
C17*	M	Crónicos	-	1.288	3,1	-	431	-	NO
C18*	F	Crónicos	-	1.817	3,3	-	689	-	NO
C19	M	Crónicos	-	45.199	4,7	-	282	-	NO
C20	F	Crónicos	-	3.093	3,5	-	227	-	NO
C21	F	Crónicos	-	85.947	4,9	-	25	-	NO
C22	M	Crónicos	-	37.774	4,6	-	736	-	NO
<b>Elite Controllers (EC)</b>									
EC01	F	Crónicos	-	<50	<1,7	-	817	-	NO
EC02	M	Crónicos	-	<50	<1,7	-	549	-	NO
EC03	F	Crónicos	-	<50	<1,7	-	1.261	-	NO
EC04	F	Crónicos	-	<50	<1,7	-	562	-	NO
EC05	F	Crónicos	-	<50	<1,7	-	602	-	NO
EC06	F	Crónicos	-	<50	<1,7	-	888	-	NO
EC07	M	Crónicos	-	<50	<1,7	-	456	-	NO
EC08	M	Crónicos	-	<50	<1,7	-	595	-	NO
EC09	F	Crónicos	-	<50	<1,7	-	612	-	NO
EC10	F	Crónicos	-	<50	<1,7	-	570	-	NO
EC11	F	Crónicos	-	<50	<1,7	-	888	-	NO
EC12	M	Crónicos	-	<50	<1,7	-	566	-	NO
EC13	F	Crónicos	-	<50	<1,7	-	912	-	NO
EC14	F	Crónicos	-	<50	<1,7	-	544	-	NO

<sup>a</sup> En el grupo PHI, los datos corresponden a la muestra basal. Para los individuos Crónicos y *Elite Controllers*, los valores corresponden a la muestra que se obtuvo el día del reclutamiento.

<sup>b</sup> En el grupo PHI se muestra el estadio de *Fiebig* [71]. Los días post-infección corresponden a la muestra basal del grupo PHI.

<sup>c</sup> Límite de detección del ensayo (Rango: 50 a 500.000 copias de ARN/ml plasma (1,7 a 5,7 log<sub>10</sub>, respectivamente).

<sup>d</sup> No se calculó el *set point* en aquellos individuos que comenzaron HAART durante el primer año post-infección o que presentaron valores inestables dentro de este período, según se definió en la sección Materiales y Métodos (*Ver capítulo III. 10.*).

F: Femenino, M: Masculino, NP: No Progresor (PHI>350), P: Progresor (PHI<350), ND: Dato no disponible. NI: Estatus no identificado.

\* Denota los individuos denominados "Controladores virémicos".

Como se observa en la Tabla 2, la mediana de la CV plasmática basal para el grupo PHI fue 41.690 copias ARN viral/ml de plasma (rango intercuartil [IQ, *interquartile range*] 25-75%= 9.404 a 292.578 copias/ml). Como se esperaba, fue significativamente mayor que la CV plasmática observada en el grupo de Crónicos (mediana: 20.320 copias/ml [IQ25-75= 3.042-43.877],  $p= 0,036$ ) y en el grupo EC (mediana: < 50 copias/ml,  $p<0,0001$ ) (*Figura 11A*). En cuanto al recuento de células T CD4<sup>+</sup> la mediana en la muestra basal del grupo PHI fue 502 células/μl (IQ25-75= 332-675). Esta no difirió significativamente de la mediana del grupo de Crónicos (436 células/μl [IQ25-75= 111-590]). Por el contrario, el grupo de EC presentó un recuento de células T CD4<sup>+</sup> (599 células/μl; IQ25-75= 559-888) significativamente mayor, tanto respecto al grupo PHI ( $p=0,0122$ ) (*Figura 11B*), como al grupo de Crónicos ( $p=0,0025$ ).

**Tabla 2: Resumen de datos clínicos correspondientes a los individuos HIV<sup>+</sup> reclutados**

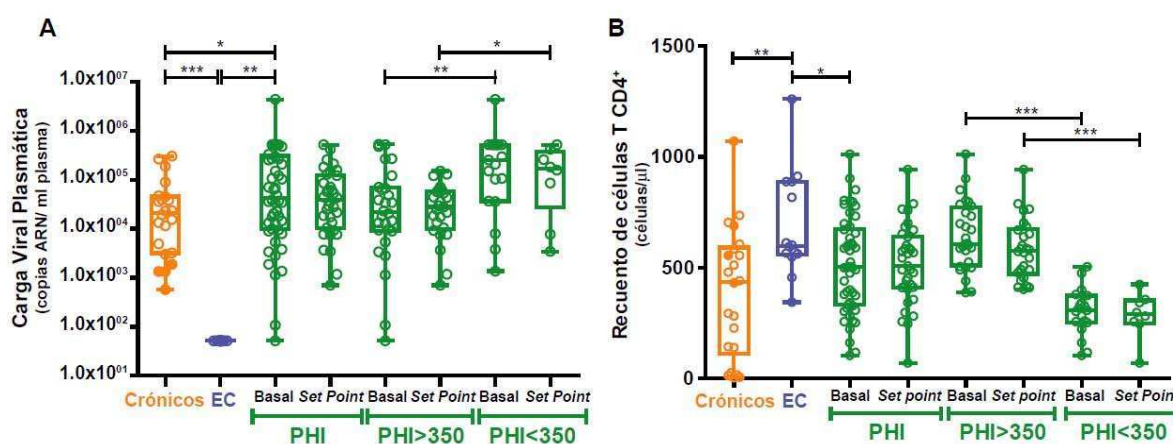
Grupo (N)	Carga Viral plasmática <sup>a,b</sup>		Set point viral <sup>c</sup> media (log <sub>10</sub> ± DS)	Recuento de CD4 <sup>+</sup> mediana N° células/μl (IQ25-75)	Set point Inmune <sup>c</sup> mediana N° células/μl (IQ25-75)
	Mediana copias ARN/ml plasma (IQ25-75)	Media (log <sub>10</sub> ±DS)			
<b>PHI</b>					
<b>Total (n=51)</b>	41.690 (9.404-292.578)	4,6 ± 1,0	4,5 ± 0,7	502 (332-675)	508 (410-639)
PHI>350 (n=28)	20.754 (8.714-66.859)	4,3 ± 1,0	4,3 ± 0,6	606 (510-771)	577 (471-661)
PHI<350 (n=20)	242.199 (35.378-500.000)	5,1 ± 0,9	4,9 ± 0,8	308 (252-374)	289 (249-353)
<b>Crónicos (n=22)</b>	20.320 (3.042-43.877)	4,2 ± 0,8		436 (111-590)	
Crónicos excluyendo Controladores virémicos (n=18)	28.435 (12.357-55.386)	4,5 ± 0,6		288 (23-563)	
<b>EC (n=14)</b>	<50	<1,7		599 (559-888)	

<sup>a</sup> Limite de detección del ensayo (Rango: 50 a 500.000 copias de ARN/ml plasma (1,7 a 5,7 log<sub>10</sub> respectivamente).  
<sup>b</sup> En el grupo PHI, los datos corresponden a la muestra basal. Para los individuos crónicos y Elite Controllers, los valores corresponden a la muestra que se obtuvo el día del reclutamiento.  
<sup>c</sup> No se calculó el *set point* en aquellos individuos que comenzaron HAART durante el primer año post-infección o que presentaron valores inestables dentro de este período, según se definió en la sección Materiales y Métodos (*Ver capítulo III. 10.*).  
 DS: Desvío estándar, IQ25-75: Intercuartilo 25-75%.

Cabe destacar que el grupo de sujetos Crónicos reclutados en este estudio es muy heterogéneo e incluye 4 individuos (C13, C15, C17 y C18) que podrían ser clasificados como lo que ciertos autores denominan “controladores virémicos”: individuos capaces de controlar espontáneamente la CV plasmática a valores por debajo de 2.000 copias/ml (*Tabla 1, Figura 11*). Luego de remover estos sujetos del análisis, la mediana de la CV plasmática para el

grupo de Crónicos fue 28.435 copias/ml (IQ25-75= 12.357-55.386), y la mediana del recuento de células T CD4<sup>+</sup> fue 288 células/μl (IQ25-75= 23-563) (Tabla 2).

Para aquellos individuos dentro del grupo PHI que permanecieron sin tratamiento durante el primer año post-infección, se calculó el *set point* viral (media log<sub>10</sub>±SD: 4,5 ±0,7) y el *set point* inmune (mediana 508 células/μl [IQ25-75= 410-639]) (Tabla 2 y Figura 11). En línea con lo reportado previamente en la bibliografía, estos parámetros no difirieron significativamente de la CV plasmática y del recuento de células T CD4<sup>+</sup> observado en los Crónicos.



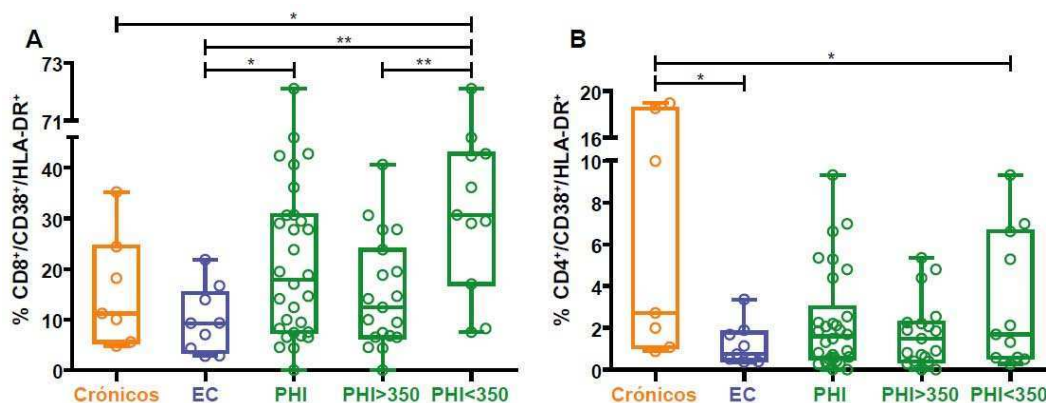
**Figura 11:** Carga Viral plasmática (A) y recuento de células T CD4<sup>+</sup> (B) de los individuos reclutados por grupo. Para el grupo PHI los valores corresponden a la muestra basal y al *set point*. Además, se muestran los subgrupos PHI>350 y PHI<350. En el grupo de crónicos se muestran cuatro puntos coloreados correspondientes a los individuos clasificados como “controladores virémicos” (Ver Tabla 1 y texto). Las líneas horizontales muestran los valores de mediana. Los asteriscos denotan distintos valores de p: \*, p<0,05; \*\*, p<0,01 y \*\*\*, p<0,001, los cuales se calcularon utilizando la prueba de *Mann-Whitney*.

A su vez, el grupo PHI se subdividió en dos subgrupos (PHI<350 y PHI>350), de acuerdo a si su recuento de células T CD4<sup>+</sup> cayó por debajo de 350 células/μl durante el primer año post-infección o no. Esto nos permite diferenciar individuos con una rápida progresión (progresores rápidos) a la enfermedad en la infección primaria (PHI<350) e individuos con una progresión típica (PHI>350) y así investigar las asociaciones de estos patrones de progresión con los parámetros inmunes analizados en este trabajo. El punto de corte elegido (350 células/μl) se basó en las guías nacionales e internacionales de inicio de tratamiento vigentes en el año 2010, cuando la mayoría de los individuos fueron reclutados [63] y la recomendación era el inicio de HAART con recuentos celulares por debajo de dicho

valor. Los subgrupos  $\text{PHI} > 350$  y  $\text{PHI} < 350$  difirieron significativamente tanto en la CV plasmática ( $p=0,0039$ ) como en el recuento de células T  $\text{CD4}^+$  ( $p < 0,0001$ ) correspondientes a la muestra basal, así como también en el *set point* viral y el *set point* inmune ( $p=0,0246$  y  $p < 0,0001$ , respectivamente) (*Tabla 2 y Figura 11*).

Además, en un subgrupo de cada uno de los grupos de individuos  $\text{HIV}^+$  ( $\text{PHI}$ : 30/51, Crónicos: 7/22 y EC: 9/14 individuos), se evaluó la activación inmune celular ya que se encuentra bien establecido que este parámetro es un buen predictor de progresión a la enfermedad [72]. Para ello se determinó, mediante citometría de flujo, el porcentaje de células T  $\text{CD4}^+$  y  $\text{CD8}^+$  que expresan los marcadores de activación CD38 y HLA-DR. Se observaron altos niveles de linfocitos T  $\text{CD8}^+$  que expresan ambos marcadores de activación en las muestras de los individuos  $\text{PHI}$  (mediana: 17,9% [IQ25-75= 7,5-30,6]), seguido por el grupo de Crónicos (mediana: 11,2% [IQ25-75= 5,6-24,4]) y EC (mediana: 9,3% [IQ25-75= 3,6-15,3]) (*Figura 12A*). La alta activación inmune observada en los individuos  $\text{PHI}$  difirió significativamente con respecto a los EC ( $p=0,0316$ ). Cuando se dividió a los individuos  $\text{PHI}$  en los subgrupos  $\text{PHI} > 350$  y  $\text{PHI} < 350$  se evidenció que los individuos con una progresión más rápida,  $\text{PHI} < 350$ , presentaban niveles de activación significativamente mayores respecto de su contraparte  $\text{PHI} > 350$  ( $p=0,0039$ ).

En cuanto a la activación inmune de las poblaciones linfocitarias  $\text{CD4}$ , se observó que la proporción de células activadas fue menor que en el caso de la población T  $\text{CD8}^+$ . Los individuos Crónicos (mediana: 2,7% [IQ25-75= 1,1-18,5]) resultaron ser la población con mayor activación, seguido por los individuos  $\text{PHI}$  (mediana: 1,6% [IQ25-75= 0,6-3,0]) y finalmente los EC (mediana: 0,7% [IQ25-75= 0,5-1,8]) (*Figura 12B*). El grupo de individuos Crónicos difirió significativamente de los EC ( $p=0,0229$ ). Además presentaron un mayor porcentaje de activación con respecto al grupo  $\text{PHI}$  pero sin alcanzar esta diferencia a ser estadísticamente significativa ( $p=0,0502$ ).



**Figura 12:** Panel de activación inmune celular en los linfocitos T CD8<sup>+</sup> (A) y los linfocitos T CD4<sup>+</sup> (B) de los individuos reclutados por grupo. Para el grupo PHI los valores corresponden a la muestra basal. Además, se muestra los subgrupos PHI>350 y PHI<350. Las líneas horizontales muestran los valores de mediana. Los asteriscos denotan distintos valores de p: \*, p<0,05 y \*\*, p<0,01, los cuales se calcularon utilizando la prueba de Mann-Whitney.

Por último, y dado el rol fundamental de las moléculas HLA-I en la respuesta inmune celular específica antiviral, se evaluó el haplotipo HLA en un subgrupos de individuos pertenecientes a los tres grupos de estudio (PHI: 46/51, Crónicos: 16/22 y EC: 10/14 individuos) (Tabla 3). En primer lugar se observó que la distribución de los alelos de HLA de todos los sujetos enrolados, en conjunto, refleja la distribución de frecuencias descripta previamente para la población urbana de Argentina ([www.allelefrecuencias.net](http://www.allelefrecuencias.net)).

**Tabla 3: Haplotipos HLA de los individuos HIV<sup>+</sup> reclutados**

Individuo	HLA-A		HLA-B		HLA-C	
Infección Primaria (PHI)						
NP01	2	68	15	40	3	8
NP02	23	23	8	40	3	7
NP03	32	32	15	35	4	7
NP04	2	68	14	51	1	8
NP05	1	26	1517	35,3	4	7
NP06	ND	ND	ND	ND	ND	ND
NP07	2	23	38	58	7	12
NP08	31	68	44	51	5	14
NP09	2	2	57	40CXJJ	3	7
NP10	3	3	18	18	7	7
NP11	ND	ND	ND	ND	ND	ND
NP12	2	36	7	42	7	7
NP13	2	11/24/31*	7	35	4	7
NP14	11	68	35	48	4	8
NP15	29	29	40	44	3	3
NP16	11	32	44	58	4	5
NP17	1	3	35	37	4	6
NP18	2	32	35	41	4	7
NP19	ND	ND	ND	ND	ND	ND
NP20	2	2	7	35	5	16
NP21	2	32	7,3	4901	7	7
NP22	31	31	8	48	4	7
NP23	31	31	44	51	4	15
NP24	2	26	14	50	3	8
NP25	31	33/11*	8	40	3	7
NP26	29	29	14	44	8	16

**Tabla 3: Haplotipos HLA de los individuos HIV<sup>+</sup> reclutados**

Individuo	HLA-A		HLA-B		HLA-C	
NP27	26	33	38	44	4	12
NP28	29	29	14	55	3	8
P01	24	68	14	53	4	8
P02	2	2	40	44	3	3
P03	2	33	14	15	2	8
P04	2	2	15	51	3	7
P05	ND	ND	ND	ND	ND	ND
P06	2	68	14	35	4	8
P07	29	33	14	44	8	16
P08	ND	ND	ND	ND	ND	ND
P09	2	11	35	40	3	4
P10	2	11	18	35	4	7
P11	2	3	7	49	7	7
P12	2	2	41FVE	7	7	17
P13	1	68	49	49	ND	ND
P14	2	30	18	18	ND	ND
P15	3	31	35,2	35,2	4	4
P16	24	29	44CXHZ	18	7	12
P17	24	26	8	55	3	7
P18	24	68	14	53	4	8
P19	11	24	7	39	7	7
P20	2	68	39	41	7	7
NI1	33	33	8	14	7	8
NI2	32	32	44	49	7	18
NI3	2	23	44	57	4	6
<b>Crónicos</b>						
C01	2	2/25*	35	55	3	4
C02	26	26	44	57	5	7
C03	2	3	44	51	4	7
C04	ND	ND	ND	ND	ND	ND
C05	ND	ND	ND	ND	ND	ND
C06	ND	ND	ND	ND	ND	ND
C07	ND	ND	ND	ND	ND	ND
C08	ND	ND	ND	ND	ND	ND
C09	31	31	39	47	7	15
C10	2	2	44	58	7	5/8*
C11	1	3	7	37	7	7
C12	2	36	7	42	7	7
C13 <sup>a</sup>	2	3	35	44	4	5
C14	2	2	7	35	5	16
C15 <sup>a</sup>	3	3	18	18	7	7
C16	31	31	15	39	3	7
C17 <sup>a</sup>	ND	ND	ND	ND	ND	ND
C18 <sup>a</sup>	11	11	35	40	3	3
C19	11	11	18	35	3	5
C20	2	33	15	39	3	7
C21	11	24	35	51/78*	4	15
C22	11	11	ND	ND	4	15
<b>Elite Controllers (EC)</b>						
EC01	33	66	14	42	8	17
EC02	1	1	27	57	4	6
EC03	2	2	26	44	2	4
EC04	25	32	44	58	7	5/8*
EC05	3	31	7	39	7	7
EC06	ND	ND	ND	ND	ND	ND
EC07	11	11	55/56*	58	3	12
EC08	33	68	40CXJJ	52	ND	ND
EC09	1	2	57	40CXJJ	ND	ND
EC10	ND	ND	ND	ND	ND	ND
EC11	ND	ND	ND	ND	ND	ND
EC12	*	*	35	38	3	4
EC13	2	2	13	51	12	16
EC14	ND	ND	ND	ND	ND	ND

\* No se pudo determinar con el protocolo utilizado.

<sup>a</sup> Denota los individuos denominados "Controladores vírémicos".

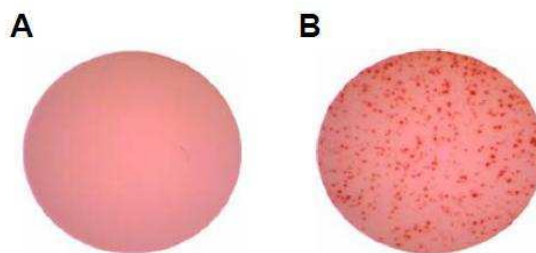
NP: No Progresor (PHI>350), P: Progresor (PHI<350), ND: Dato no disponible. NI: Estatus no identificado.

Con el objetivo de descartar un posible enriquecimiento de algún alelo en particular asociado con progresión rápida (A01, A68, B35) o lenta (B27, B51, B57) a la enfermedad [73] en algún grupo en particular, la frecuencia de los mismos se estudió en cada grupo. No se hallaron diferencias significativas en la frecuencia de los alelos A01, A68, o B35 entre grupos, incluso en el grupo de EC, donde estos alelos se encontraron en 4 de los 14 individuos evaluados. Por otro lado, los "alelos protectivos" B27, B51 o B57 estaban presentes en un individuo perteneciente al grupo PHI<350, cuatro individuos del grupo PHI>350, tres individuos crónicos, y sólo en cuatro EC. Por lo tanto, las diferentes tasas de progresión a la enfermedad entre los grupos en estudio no pudieron ser explicadas simplemente por las diferencias en el *background* genético, por lo menos a nivel de los locus de HLA.

#### **IV. 2. ANÁLISIS DE LA RESPUESTA CELULAR T CD8<sup>+</sup> HIV-ESPECÍFICA MEDIANTE ELISPOT**

Como primer objetivo del presente trabajo, se planteó realizar una caracterización de la respuesta inmune celular HIV-específica durante la infección primaria. Para ello, se decidió evaluar, en primer lugar, la respuesta T específica mediante la identificación de células específicas secretoras de IFN- $\gamma$  por la técnica de ELISPOT en el grupo PHI, utilizando las muestras basales. Para detectar la respuesta específica se utilizaron como estímulo los *pools* de péptidos de las proteínas virales Nef, Gag y Env. Además, se estudió la respuesta específica en el grupo de individuos Crónicos y en los EC. En la figura 13 se muestra a modo de ejemplo una respuesta negativa y una positiva para el ensayo de ELISPOT. A partir de estos resultados, se procedió a determinar cómo los blancos preferenciales inmunodominantes, la magnitud y la calidad (en términos de amplitud y capacidad de respuesta luego de la estimulación) de la misma, impactan en las distintas tasas de progresión a la enfermedad.





**Figura 13:** Ejemplo de un pocillo negativo (A) y uno positivo (B) obtenidos en el ensayo de ELISPOT.

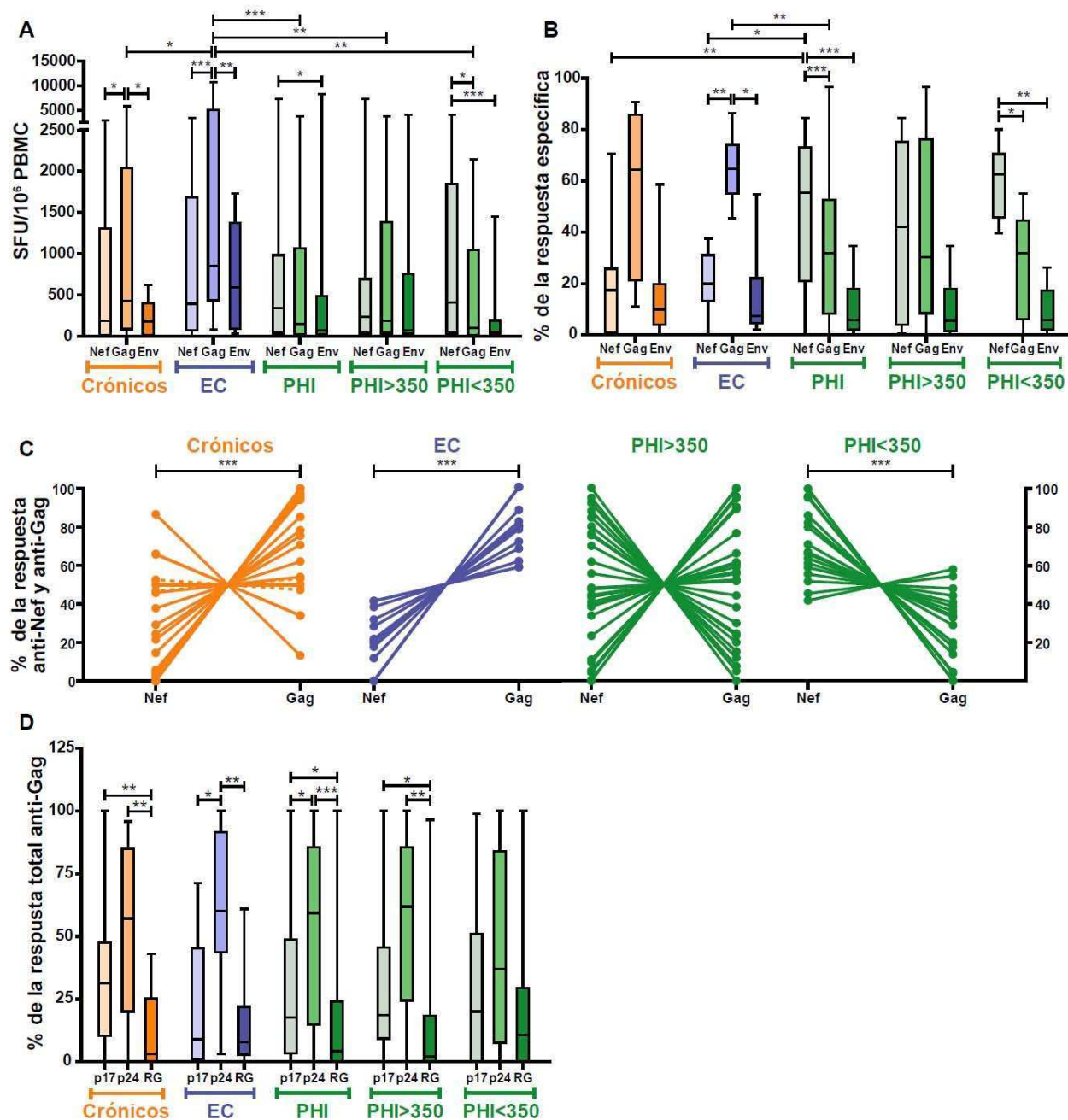
#### **IV. 2. 1. Magnitud y blancos preferenciales de la respuesta HIV-específica en los individuos reclutados**

En primer lugar se observó que la mediana de la magnitud de la respuesta inmune HIV-específica (expresada como SFU/10<sup>6</sup> PBMCs) fue mayor en los EC, para los tres antígenos evaluados, comparado con el grupo de Crónicos y los individuos PHI. Esta diferencia fue particularmente notable en el caso de Gag: la mediana de la magnitud de la respuesta anti-Gag en los EC fue 2 veces mayor que la de los Crónicos y 6 veces mayor a los PHI (853 SFU/10<sup>6</sup> PBMCs [IQ25-75= 435-4995], 430 SFU/10<sup>6</sup> PBMCs [IQ25-75= 88-2040] y 146 SFU/10<sup>6</sup> PBMCs [IQ25-75= 20-1067] para los EC, Crónicos y PHI, respectivamente [EC *versus* Crónicos,  $p= 0,0044$ ; EC *versus* PHI,  $p=0,0007$ ]; *Figura 14A*). El análisis intragrupo mostró, que en los EC, la magnitud de la respuesta anti-Gag fue significativamente mayor (aproximadamente 2 veces) que las respuestas anti-Nef (mediana, 395 SFU/10<sup>6</sup> PBMCs [IQ25-75= 70-1685];  $p=0,0002$ ) y anti-Env (mediana, 590 SFU/10<sup>6</sup> PBMCs [IQ25-75= 91-1375];  $p=0,0039$ ), mientras que la magnitud de la respuesta anti-Nef en el grupo PHI (mediana 340 SFU/10<sup>6</sup> PBMCs [IQ25-75= 40-983]) fue significativamente mayor que la magnitud de la respuesta anti-Env (mediana, 73 SFU/10<sup>6</sup> PBMCs [IQ25-75= 20-489];  $p=0,0358$ ) pero no se observó diferencia con la respuesta anti-Gag ( $p>0,05$ ) (*Figura 14A*). Por último, en el grupo de Crónicos, la magnitud de la respuesta anti-Gag fue levemente mayor con respecto a la magnitud anti-Nef (mediana 185 SFU/10<sup>6</sup> PBMCs [IQ25-75= 11-1310];  $p=0,0264$ ) y anti-Env (mediana 184 SFU/10<sup>6</sup> PBMCs [IQ25-75= 16-399];  $p=0,0498$ ).

La contribución relativa de cada antígeno a la respuesta total, es decir la proporción de células HIV-específicas para cada proteína relativizada al total de la respuesta anti-HIV, es un factor importante a tener en cuenta cuando se evalúa la asociación de la respuesta HIV-específica con el control viral [74]. Por lo tanto, se analizó la proporción de células específicas para cada antígeno en relación al total de la respuesta HIV-específica (suma de la respuesta T frente a cada antígeno individual) (*Figura 14B*). Nuevamente, la contribución de los distintos blancos antigénicos difirió entre los grupos de estudio: el grupo PHI mostró una mayor proporción, estadísticamente significativa, de células Nef-específicas (mediana 55%, [IQ25-75= 21-73]) comparado con el grupo de Crónicos (mediana 17%, [IQ25-75= 0,8-26];  $p=0,005$ ) y con los EC (mediana 20%, [IQ25-75= 13-31];  $p=0,007$ ) y una menor proporción de células Gag-específicas (PHI 32% [IQ25-75= 8-53] versus EC 64% [IQ25-75= 55-74] [ $p=0,004$ ]; PHI versus Crónicos 64% [IQ25-75= 21-86] [ $p>0,05$ ]). En esta misma línea, el análisis intragrupo reveló que la respuesta anti-Gag en los EC claramente predominó sobre las células Nef-específicas y Env-específicas (7,4%, [IQ25-75= 4,6-22,1]) (Gag *versus* Nef  $p=0,005$ ; Gag *versus* Env,  $p=0,007$ ), mientras que en el grupo PHI predominaron las células Nef-específicas sobre las Gag-específicas ( $p<0,001$ ) y Env-específicas (6%, [IQ25-75= 2-18];  $p<0,001$ ). El grupo de Crónicos mostró el mismo patrón de inmunodominancia (Gag>Nef>Env) que los EC, sin embargo la dispersión en la respuesta entre los Crónicos fue mayor, lo que refleja la heterogeneidad de este grupo.

Cuando se realizó el mismo análisis entre los subgrupos PHI>350 y PHI<350, se observaron claras diferencias entre ellos: mientras que en el grupo PHI>350 no se pudo observar una diferencia estadísticamente significativa entre la magnitud de las respuestas anti-Nef y anti-Gag o en la proporción del total de la respuesta, en el grupo PHI<350 las células anti-Nef claramente dominaron la respuesta anti-HIV (mediana de la magnitud, 410 SFU/10<sup>6</sup> PBMCs [IQ25-75= 40-1850]; mediana de la proporción del total de la respuesta, 62% [IQ25-75= 46-70]) sobre las respuestas anti-Gag y anti-Env, ya sea en términos de magnitud (100 SFU/10<sup>6</sup> PBMCs [IQ25-75= 13-1050] [ $p=0,0382$ ] y 48 SFU/10<sup>6</sup> PBMCs [IQ25-75= 13-194]

[p=0,001], respectivamente) como de proporción (32% [IQ25-75= 6-45] [p=0,01] y 7% [IQ25-75= 2-17] [p=0,003], respectivamente) (Figura. 14A y 14B).



**Figura 14:** Análisis de la respuesta HIV específica por ELISPOT, en los distintos grupos. (A) Magnitud de la respuesta total anti-Gag, anti-Nef y anti-Env expresado como unidades formadoras de spots por millón de células (SFU/10<sup>6</sup> PBMCs). (B) Contribución relativa de cada antígeno al total de la respuesta específica expresado como el porcentaje sobre la suma de respuestas específicas. (C) Contribución de la respuesta anti-Nef y anti-Gag (relativos a la suma de la magnitud obtenida para ambos antígenos). En el grupo de Crónicos se muestran, en líneas punteadas, cuatro individuos clasificados como "controladores virémicos" (Ver Tabla 1). (D) Respuesta celular dirigida contra las distintas subunidades de Gag (p24, p17 y RG), expresadas como el porcentaje del total de la respuesta anti-Gag. Todos los datos provenientes de los sujetos PHI corresponden a la muestra basal. Además, se muestran los subgrupos PHI>350 y PHI<350. Las líneas horizontales muestran los valores de mediana. Los asteriscos denotan distintos valores de p: \*, p<0,05; \*\*, p<0,01 y \*\*\*, p<0,001, los cuales se calcularon utilizando la prueba de Mann-Whitney.

Dado el importante rol que parecerían tener las respuestas anti-Nef y anti-Gag delineando las diferentes tasas de progresión entre los grupos, se decidió analizar la contribución de la respuesta anti-Nef y anti-Gag (relativizado a la suma de la magnitud obtenida para ambos antígenos) en cada uno de los individuos incluidos en los diferentes grupos de estudio (*Figura 14C*). Se observó que la respuesta anti-Gag fue claramente dominante sobre la respuesta anti-Nef en todos los EC ( $p < 0,0001$ ). Por el contrario, la respuesta anti-Nef dominó la respuesta anti-HIV en el grupo de progresores rápidos ( $PHI < 350$ ,  $p < 0,0001$ ), grupo antagónico a los EC en cuanto a su progresión a la enfermedad. En el grupo de Crónicos se observó una situación más heterogénea pero con una dominancia de la respuesta anti-Gag ( $p = 0,0002$ ), la cual incluía a aquellos individuos denominados previamente como "controladores virémicos" (C13, C15, C17 y C18). Por último, en el grupo  $PHI > 350$  se observó una situación intermedia: Gag dominaba la respuesta sobre Nef en un subgrupo de individuos, mientras que el resto de los individuos mostraban ya sea una inmunodominancia de Nef o una situación balanceada entre ambos antígenos.

Luego, se realizó un análisis más detallado de las subunidades de la proteína Gag, como blanco antigénico. En todos los grupos, el patrón de inmunodominancia (teniendo en cuenta las medianas de cada grupo) fue el siguiente:  $p24 > p17 > RG$  (*Figura 14D*). En el grupo de EC, la respuesta anti-Gag estuvo preferentemente dirigida contra la proteína p24 (mediana: 60,1% [IQ25-75= 43,7-91,6]) en una proporción significativamente mayor sobre p17 y RG (mediana: 8,9% [IQ25-75= 0,8-45,2] y 7,9% [IQ25-75= 2,8-21,9];  $p = 0,0211$  y  $p = 0,0046$ , respectivamente). En el grupo de Crónicos, la proporción de la respuesta anti-p24 (mediana: 57,1% [IQ25-75= 20,0-84,8]), así como también la proporción anti-p17 (mediana: 31,3% [IQ25-75= 10,4-47,5]), fue significativamente mayor que la respuesta anti-RG (mediana: 3,1% [IQ25-75= 0,0-25,0];  $p = 0,0015$  y  $p = 0,0058$ , respectivamente). El grupo PHI presentó un jerarquía similar al grupo de Crónicos, con una respuesta anti-p24 (mediana: 59,4% [IQ25-75= 14,7-85,6]) predominante sobre p17 y RG (mediana: 17,6% [IQ25-75= 3,3-48,8] y 4,1% [IQ25-75= 0,0-23,9];  $p = 0,0202$  y  $p = 0,0001$ , respectivamente). Además, la respuesta anti-p17 fue levemente mayor que la respuesta

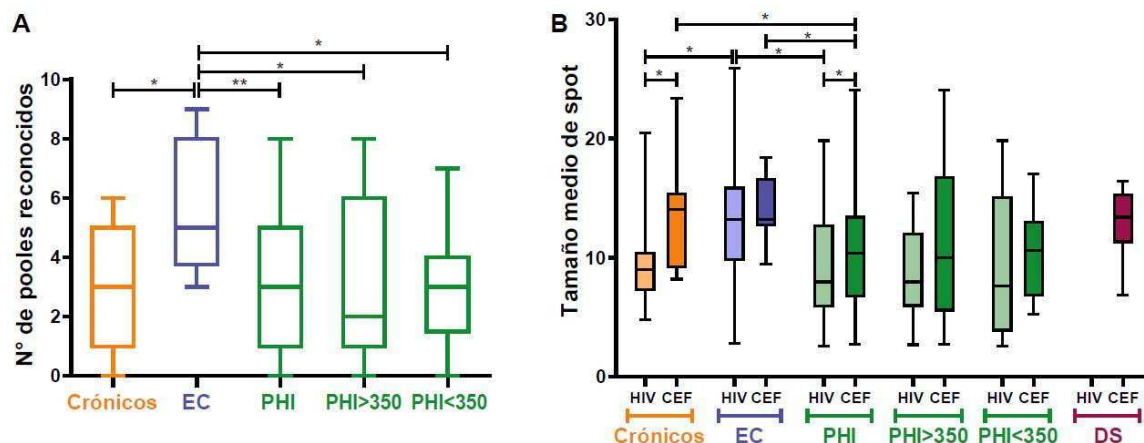
anti-RG ( $p=0,0187$ ). Cuando se dividió al grupo PHI en los subgrupos PHI > 350 y PHI < 350, se observó que ambos grupos mantenían el patrón de inmunodominancia observado anteriormente. En el grupo PHI > 350 la proporción de la respuesta anti-p24 (mediana: 61,9% [IQ25-75= 24,4-85,6]) así como también la proporción de la respuesta anti-p17 (mediana: 18,5% [IQ25-75= 9,2-45,5]) fueron significativamente mayores con respecto a la respuesta anti-RG (2,1% [IQ25-75= 0,0-18,2];  $p=0,0012$  y  $p=0,0199$ , respectivamente). En el grupo PHI < 350 se observó esta misma tendencia pero no alcanzó la significancia.

#### **IV. 2. 2. Calidad de la respuesta HIV-específica en los individuos reclutados**

La calidad de la respuesta HIV-específica se evaluó, en una primera aproximación, analizando la amplitud de la respuesta y la intensidad de producción de IFN- $\gamma$ . La amplitud de la respuesta para cada individuo se calculó como el número de *pooles* de péptidos que fueron reconocidos en el ensayo (sobre un total de 9 *pooles* utilizados para evaluar la respuesta HIV-específica) (*Figura 15A*). Este análisis mostró que los EC fueron capaces de reconocer un mayor número de *pooles* de péptidos comparado con los Crónicos y los PHI ( $p=0,033$  y  $p=0,0084$ , respectivamente). Además, los EC fueron capaces de reconocer un número mayor de *pooles* de péptidos Gag-específicos ( $n=3$  *pooles*) comparado con los Crónicos y los individuos PHI. Entre los subgrupos PHI > 350 y PHI < 350 no se observaron diferencias estadísticamente significativas.

Luego, se analizó el tamaño promedio de los *spots* obtenidos en el ensayo en función de los distintos estímulos utilizados. Cabe aclarar que el tamaño promedio de los *spots* se correlaciona directamente con la cantidad de IFN- $\gamma$  producido por cada célula T específica de manera individual (lo que, a su vez, se correlaciona con la avidéz funcional de las células [75]) (*Figura 15B*). En este caso, también se incluyó en el análisis la respuesta anti-CEF. Esta respuesta es particularmente relevante ya que representa la respuesta dirigida contra patógenos que causan infecciones agudas autolimitadas (Influenza) o infecciones crónicas controladas (CMV y *Epstein-Barr*). En primer lugar, no se observaron diferencias intra-individuos respecto del tamaño promedio de los *spots* para los distintos *pooles* de péptidos

específicos para HIV (Nef, Gag y Env). Por lo tanto, a los fines de este análisis, el tamaño medio de los spots para todos los antígenos de HIV fue promediado, teniendo en cuenta solamente los *pooles* de péptidos para los que se obtuvo una respuesta positiva en el ensayo de ELISPOT.



**Figura 15:** Análisis de la calidad de la respuesta específica por ELISPOT, en los distintos grupos de estudio. (A) Amplitud de la respuesta expresada como el número de *pooles* de péptidos reconocidos del total de 9 *pooles* ensayados. (B) Tamaño promedio de *spot* obtenido para CEF y HIV. Todos los datos provenientes de los sujetos PHI corresponden a la muestra basal. Además, se muestran los subgrupos PHI>350 y PHI<350, respectivamente. Las líneas horizontales muestran los valores de mediana. Los asteriscos denotan distintos valores de p: \*, p<0,05 y \*\*, p<0,01; los cuales se calcularon utilizando la prueba de *Mann-Whitney*.

En cuanto a los *spots* obtenidos en el control CEF, los individuos PHI mostraron el menor tamaño de los mismos, siendo estadísticamente diferente de los EC y de los Crónicos (los *spots* CEF-específicos de los EC fueron 1,3 veces más grandes que los del grupo PHI [ $p=0,0184$ ]; mientras que los *spots* de los Crónicos fueron 1,4 veces más grandes que los de los PHI [ $p=0,038$ ]). Por otro lado, los *spots* de mayor tamaño se observaron en el grupo de individuos Crónicos, incluso fueron ligeramente mayores que los observados en los DS ( $p>0,05$ ), seguidos por los EC. Al analizar los subgrupos PHI>350 y PHI<350 no se observaron diferencias entre ellos, por lo que se puede inferir que ambos grupos contribuyen de la misma manera al tamaño del *spots* correspondientes a CEF en el grupo PHI total. En el caso de los *spots* HIV-específicos, los EC mostraron *spots* significativamente mayores que el grupo de Crónicos y que los PHI (los *spots* HIV-específicos de los EC fueron 1,5 veces más grandes que los del grupo de Crónicos [ $p=0,0347$ ] y 1,6 veces más grande que el grupo PHI [ $p=0,0271$ ]). Dentro del grupo PHI, no se observaron diferencias entre

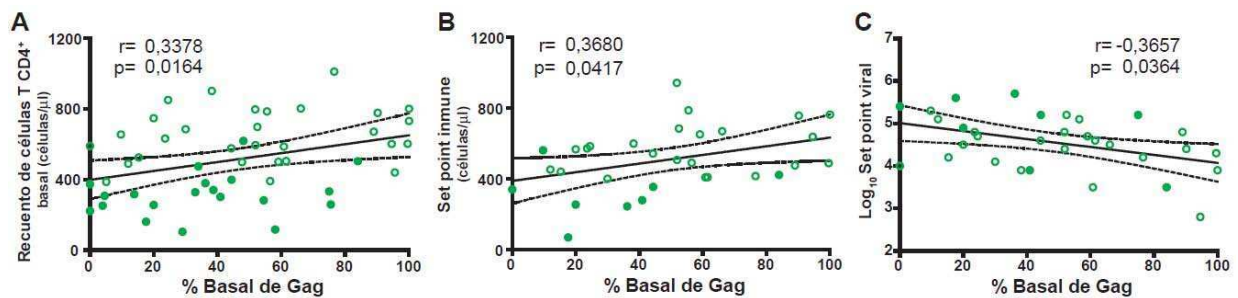
PHI > 350 y PHI < 350, mostrando ambos subgrupos similares tamaños promedio de *spot* HIV-específico. Aún más interesante resultó el análisis de contraste entre CEF y HIV en cada uno de los grupos en estudio: los *spots* de HIV fueron significativamente menores que los *spots* de CEF, excepto en el grupo de EC donde no se observa diferencia (Crónicos  $p=0,0134$  y PHI en su conjunto  $p=0,0173$ ). En cuanto, a los subgrupos PHI > 350 y PHI < 350 se observó la misma tendencia.

En conjunto estos resultados indican que los EC tienen mayor amplitud y mejor calidad de la respuesta celular específica.

#### **IV. 2. 3. Relación entre la inmunodominancia relativa anti-Gag y los parámetros clínicos en los individuos cursando la infección primaria**

Pudimos observar previamente que los EC y el grupo PHI < 350 (grupos opuestos en términos de progresión a la enfermedad) mostraban un patrón de inmunodominancia exactamente opuesto en cuanto a las proteínas Gag y Nef (*Figura 14C*). En base a estas observaciones, se decidió evaluar en el grupo PHI, la relación entre la inmunodominancia observada para Gag y su relación con la tasa de progresión a la enfermedad en las etapas tempranas de la infección. Para testear esta hipótesis, se realizaron análisis de correlaciones entre el porcentaje de respuesta anti-Gag y los datos clínicos de los sujetos enrolados en este estudio. Se observó que la inmunodominancia relativa basal en el grupo PHI (% de la respuesta anti-Gag basal) se correlacionó significativamente con el recuento de células T CD4<sup>+</sup> basal (*Spearman's*  $r=0,3378$ ,  $p=0,0164$ ; *Figura 16A*). Aún más interesante fue la correlación observada entre el % de la respuesta anti-Gag basal y el *set point* inmune (*Spearman's*  $r=0,3680$ ,  $p=0,0417$ ; *Figura 16B*) así como también la correlación inversa entre el % de la respuesta anti-Gag basal y el  $\log_{10}$  del *set point* viral (*Spearman's*  $r=-0,3657$ ,  $p=0,0364$ ; *Figura 16C*). Estas correlaciones entre el porcentaje de Gag basal y los niveles de CV plasmática y el recuento de células T CD4<sup>+</sup> alcanzados luego de la etapa aguda, indicarían que la inmunodominancia de Gag basal es un factor importante en el

delineamiento de la progresión de la enfermedad en términos de pérdida de células T CD4<sup>+</sup> y control de la replicación viral.



**Figura 16:** Correlación entre la inmunodominancia relativa de la respuesta anti-Gag y los parámetros clínicos en el grupo PHI. Recuento de células T CD4<sup>+</sup> basal (A), *set point* inmune (B) o Log<sub>10</sub> del *set point* viral (C) versus el porcentaje basal de la respuesta anti-Gag. Los puntos verdes y blancos denotan los subgrupos PHI < 350 y PHI > 350 respectivamente. Todos los valores r y p corresponden a la prueba de *Spearman's*.

En conjunto, todos los datos analizados hasta aquí demuestran que a pesar de que Nef domina la respuesta anti-HIV en la infección primaria, una alta proporción de células T que aparecen de manera temprana tienen como blanco a Gag, en particular al antígeno p24. Particularmente, la inmunodominancia de Gag, junto a un mayor tamaño de *spot*, se asoció con un retraso de la progresión durante el primer año post-infección. También, se observaron estos mismos factores en los EC, indicando que estas características de las células T jugarían un importante rol protector. En particular, la inmunodominancia temprana de Gag se correlacionó con un menor *set point* viral y un mayor recuento de células T CD4<sup>+</sup>, tanto en la muestra basal como en el *set point*, mostrando de esta manera que representa un factor inmune fundamental involucrado en retrasar la progresión.

#### IV. 3. ANÁLISIS DE LA CAPACIDAD DE LAS CÉLULAS HIV-ESPECÍFICAS DE INHIBIR LA REPLICACIÓN VIRAL *IN VITRO* DURANTE LA INFECCIÓN PRIMARIA

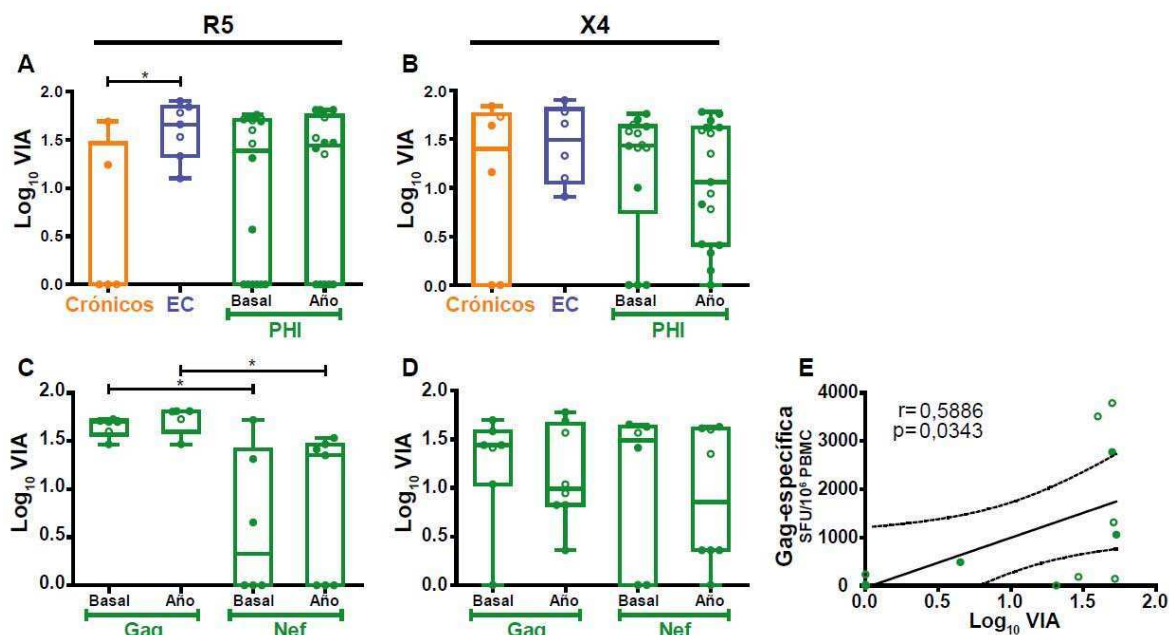
Para continuar con la caracterización de la respuesta celular HIV-específica en nuestra población de estudio, decidimos evaluar la capacidad de las células T CD8<sup>+</sup> HIV-específicas, que surgen durante la infección primaria, de suprimir la replicación viral *in vitro*, utilizando para ello cepas virales de laboratorio con tropismo X4 y R5. El objetivo fue establecer las posibles relaciones entre esta actividad antiviral (VIA, *viral inhibitory activity*) y las



proteínas virales que son blanco de la respuesta inmune durante la etapa temprana de la infección y compararla con aquella evaluada en los sujetos Crónicos y EC. Para ello, a partir de PBMCs obtenidos de 7 Crónicos (incluidos los controladores virémicos C13, C17 y C18), 7 EC y 19 PHI (10 de ellos PHI > 350 y 9 PHI < 350); se aislaron las poblaciones celulares T CD4<sup>+</sup> y T CD8<sup>+</sup>. La población celular T CD4<sup>+</sup> se aisló, activó e infectó y luego se cultivó tanto sola como en combinación con la población de linfocitos T CD8<sup>+</sup> autóloga, en una relación 1:1. La replicación viral se evaluó al día 7 post-infección mediante la determinación de antígeno p24 en sobrenadante de cultivo, por ELISA. En el caso del grupo PHI, se evaluó el VIA en las muestras basales y en las muestras obtenidas un año post-infección.

#### **IV. 3. 1. Capacidad de las células HIV-específicas de inhibir la replicación viral *in vitro* en los grupos de estudio**

En línea con algunos reportes previos [76-80], las células T CD8<sup>+</sup> de los EC mostraron una mayor capacidad para mediar VIA comparado con los individuos Crónicos, cuando el ensayo se realizó con la cepa viral R5 ( $p=0,0497$ , *Figura 17A*). Cabe resaltar, que los EC fueron capaces de inhibir de la misma manera tanto los virus R5 como los X4 (*Figura 17A y B*), indicando que estos individuos poseen una mayor amplitud en su capacidad antiviral. Además, debe tenerse en consideración que el uso de cepas de laboratorio heterólogas, puede conducir a una subestimación del VIA, y debido a esto podrían estar siendo enmascaradas ciertas diferencias entre grupos, [76]. En el grupo PHI, la mayoría de los sujetos (70%) fueron capaces de mediar VIA (mediana 32% de reducción de p24, correspondiente a 1.5 log<sub>10</sub> de capacidad de mediar VIA) frente al virus R5 en la muestra basal, indicando que las células T CD8<sup>+</sup> HIV-específicas con capacidad de mediar VIA, surgen de manera temprana durante la infección. Un análisis longitudinal realizado a través de la evaluación del VIA en las muestras obtenidas a los 12 meses post-infección mostró que esta actividad persiste en el tiempo incluso más allá del establecimiento del *set point* (*Figura 17A y B*).



**Figura 17:** Ensayo de inhibición viral *in vitro* (VIA) mediado por las células T CD8<sup>+</sup> HIV-específicas. VIA se expresa como el log<sub>10</sub> de la proporción de antígeno p24 perdido cuando las células T CD8<sup>+</sup> se encontraban presentes en el cultivo, comparado con el cultivo de las células T CD4<sup>+</sup> infectadas solas. Actividad inhibitoria encontrada en el grupo de Crónicos, EC y grupo PHI, frente a la cepa de laboratorio HIV R5 (A) o X4 (B). Actividad inhibitoria en el grupo PHI, re agrupados según su inmunodominancia anti-Gag o anti-Nef (total de la respuesta > 50%) observado en las muestras basales, frente a la cepa de laboratorio HIV R5 (C) o X4 (D). (E) Correlación entre la magnitud de la respuesta anti Gag-específica en la muestra basal y el VIA basal en el grupo PHI. En todos los gráficos: las líneas horizontales dentro de las cajas muestran el valor de la mediana. En el grupo de Crónicos se muestran cuatro puntos coloreados correspondientes a los controladores virémicos (Ver *Tabla 1*). En el grupo PHI, los puntos verdes y blancos denotan los subgrupos PHI < 350 y PHI > 350, respectivamente. Los análisis intergrupo e intragrupo se realizaron con los test *Mann-Whitney* y *Wilcoxon* respectivamente. Los asteriscos denotan distintos valores de p: \*, p < 0,05. En el análisis de correlación el valor de r y p corresponde a la prueba de *Spearman's*.

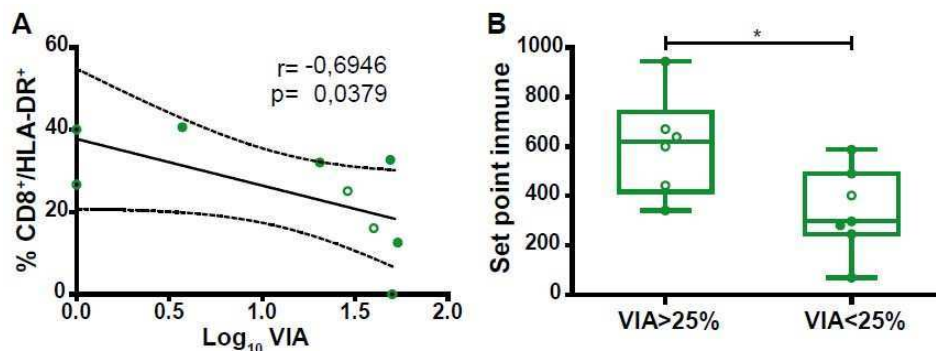
Cuando se analizaron los subgrupos PHI > 350 y PHI < 350, no se encontraron diferencias significativas en la capacidad de mediar VIA tanto en la muestra basal como al año post-infección. Dado el resultado obtenido en el ensayo de ELISPOT, donde la inmunodominancia de Gag durante la infección primaria se asoció con una preservación en el recuento de células T CD4<sup>+</sup> durante el primer año de infección, se decidió dividir a los individuos PHI de acuerdo a cuál era su blanco antigénico preferencial en dos subgrupos: aquellos cuya respuesta estuvo preferentemente (>50%) dirigida contra Gag (Gag respondedores) o contra Nef (Nef respondedores). Este análisis reveló que las células T CD8<sup>+</sup> de los sujetos PHI en los cuales las células Gag-específicas dominaban la respuesta temprana, mostraron una mayor capacidad de mediar VIA frente al virus R5 comparado con los Nef respondedores, tanto en la muestra basal (p=0,043) como en las muestras de 12 meses post-infección (p=0,011) (*Figura 17C*). Este resultado concuerda con lo observado en otros

estudios donde se muestra de forma consistente que los EC (grupo que muestra una clara inmunodominancia de Gag) poseen concomitantemente una mayor capacidad de mediar VIA en comparación a otros grupos HIV<sup>+</sup>. En este mismo sentido, se halló una correlación estadísticamente significativa, en el grupo PHI, entre la capacidad de mediar VIA en la muestra basal y la magnitud de la respuesta Gag-específica basal (SFU/10<sup>6</sup> PBMC) (*Spearman's*  $r=0,5886$ ;  $p=0,0343$ ; *Figura 17E*). En conjunto, estos resultados sugieren que la habilidad que poseen las células T CD8<sup>+</sup> HIV-específicas (que surgen de forma temprana durante la infección) de suprimir la replicación viral en las células T CD4<sup>+</sup> autólogas, podría estar relacionada, entre otros factores, a la inmunodominancia relativa de Gag (sobre el total de la respuesta T CD8<sup>+</sup> HIV-específica) así como también del número absoluto (magnitud) de las células T CD8<sup>+</sup> Gag-específicas. También, se observó que los EC y los PHI Gag-respondedores, mediaron VIA frente a ambos virus, X4 y R5, de manera más frecuente, mientras que los Crónicos y los Nef-respondedores reconocieron uno u otro virus o ninguno, sugiriendo que los primeros grupos mencionados poseen una actividad más abarcativa.

#### **IV. 3. 2. Relación entre la inhibición de la replicación viral *in vitro* y los parámetros clínicos en los individuos cursando la infección primaria**

Dada esta asociación tan consistente entre una mayor capacidad de mediar VIA y el estatus de los EC observado en este trabajo (y en otros reportes [76-80]), se decidió estudiar la existencia de alguna asociación entre la capacidad que presentan las células T CD8<sup>+</sup> de mediar VIA y los parámetros clínicos en el grupo PHI. En primer lugar, se observó una correlación negativa entre la magnitud del VIA en la muestra basal y la activación inmune de las células T CD8<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> ( $p=0,0379$ ; *Figura 18A*). Por otro lado, no se encontró ninguna asociación entre la magnitud del VIA y la CV plasmática basal, el *set point* viral o el recuento de células T CD4<sup>+</sup> basal. Sin embargo, se observó que aquellos sujetos que poseían una capacidad sustancial de mediar VIA (>25%) en la muestra basal, presentaban valores de *set point* inmune más altos ( $p=0,02$ ; *Figura 18B*), sugiriendo que la asociación

de la inmunodominancia de Gag con el retraso en la progresión en términos de la preservación del recuento de células T CD4<sup>+</sup> descrita más arriba (mayor inmunodominancia de Gag asociado con mayor *set point* inmune) (Figura 16) podría estar relacionada con una mayor capacidad por parte de las células Gag-específicas de mediar VIA.



**Figura 18:** Correlación entre el ensayo de inhibición viral *in vitro* (VIA) mediado por las células T CD8<sup>+</sup> HIV-específicas y los parámetros clínicos en el grupo PHI. VIA se expresa como el log<sub>10</sub> de la proporción de antígeno p24 perdido cuando las células T CD8<sup>+</sup> se encontraban presentes en el cultivo, comparado con el cultivo de las células T CD4<sup>+</sup> infectadas solas. (A) Correlación entre el log<sub>10</sub> VIA basal y la activación inmune de los CD8; (B) Sujetos PHI con capacidad de mediar VIA (>25%) también presentan mayores *set points* inmunes. Las líneas horizontales dentro de las cajas muestran el valor de la mediana. Los puntos verdes y blancos denotan los subgrupos PHI < 350 y PHI > 350, respectivamente. Los asteriscos denotan distintos valores de p: \*, p < 0,05 calculados mediante el test *Mann-Whitney*. En el análisis de correlación el valor de r y p corresponde a la prueba de *Spearman's*.

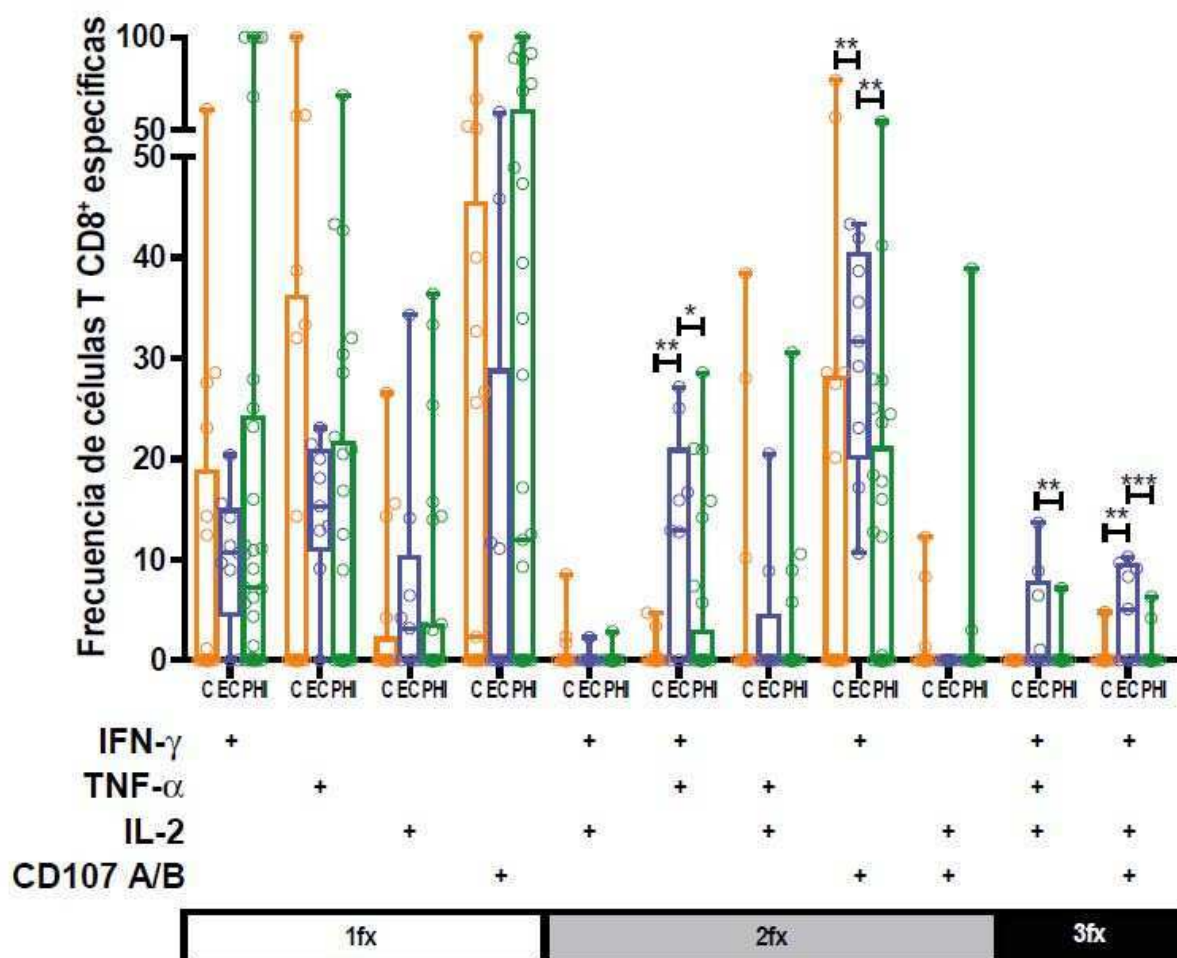
#### IV. 4. ANÁLISIS DE LA POLIFUNCIONALIDAD DE LAS CÉLULAS T CD8<sup>+</sup> HIV-ESPECÍFICAS DURANTE LA INFECCIÓN PRIMARIA Y SU RELACIÓN CON LOS PARÁMETROS CLÍNICOS

Con el objetivo de seguir profundizando la caracterización de las células T CD8<sup>+</sup> HIV-específicas que surgen de forma temprana en la infección y la subsiguiente asociación con la progresión a la enfermedad, se decidió analizar la funcionalidad de estas células en términos de su habilidad de degranular (que se evidencia por la expresión transitoria en membrana de las moléculas CD107A/B) y de secretar IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  y/o IL-2, luego de la estimulación. Para ello, la información obtenida en los ensayos de ELISPOT se utilizó como punto de partida para definir qué *pools* de péptidos utilizar como estímulo. Entonces, para cada individuo al que se le analizó la polifuncionalidad, sólo se utilizaron como estímulo aquellos *pools* de péptidos para los que se encontró una respuesta positiva en el ensayo de

ELISPOT. La estrategia utilizada para identificar las poblaciones linfocitarias y células HIV-específicas se encuentra detallada en la figura 9 (*Ver M&M*). La proporción de células que expresan cada función por separado o en combinación fueron analizadas no sólo en los individuos PHI (11 sujetos PHI > 350 y 8 sujetos PHI < 350) sino también en subgrupos de Crónicos (n=7) y EC (n=7), para poder realizar el análisis entre grupos y distinguir de esta manera una posible asociación con progresión a la enfermedad. La metodología empleada permite evaluar células productoras de cada una de las funciones de manera individual (células monofuncionales) así como también células que expresan una combinación de dos funciones (bifuncionales) y tres funciones (trifuncionales).

Como había sido reportado con anterioridad por nuestro grupo de trabajo [67], se detectó, en estadios muy tempranos de la infección, la expresión de todas las funciones (ya sea de forma individual o en distintas combinaciones) por parte de las células T CD8<sup>+</sup> HIV-específicas. En las muestras basales de los individuos PHI, el porcentaje (media ± DS) de células T CD8<sup>+</sup> HIV-específicas que expresan cada función de forma individual fue 0,2±0,3 para IFN-γ, 1,1±5,2 para TNF-α, 0,1±0,1 para IL-2, y 0,2±0,4 para CD107A/B. En la figura 19 se muestra la contribución relativa al total de la respuesta T CD8<sup>+</sup> HIV-específica producida por cada función o combinación de ellas. No se observaron diferencias significativas en ninguna de las cuatro funciones, evaluadas de forma individual (células monofuncionales), entre los individuos PHI, EC o Crónicos. Al analizar la frecuencia de células T CD8<sup>+</sup> bifuncionales se observó una diferencia estadísticamente significativa en la expresión simultánea de IFN-γ y TNF-α y en la expresión de CD107A/B e IFN-γ. El 66% de los EC presentaban células T CD8<sup>+</sup> bifuncionales IFN-γ<sup>+</sup>/TNF-α<sup>+</sup> (mediana 12,9% [IQ25-75= 0,0-20,8] del total de las células T CD8<sup>+</sup> HIV-específicas) y difirieron significativamente de los individuos Crónicos (0,0% [IQ25-75= 0,0-0,0]; p=0,0046) y de los sujetos PHI (0,0% [IQ25-75= 0,0-2,9]; p=0,0186). Además, todos los EC presentaron un porcentaje mayor de células T CD8<sup>+</sup> bifuncionales CD107A/B<sup>+</sup>/IFN-γ<sup>+</sup> (mediana: 31,7% [IQ25-75= 20,1-40,3]), que también difirió significativamente de los Crónicos (0,0% [IQ25-75= 0,0-28,0]; p=0,0084) y de los sujetos PHI (0,0% [IQ25-75= 0,0-21,0]; p=0,0016), indicando que

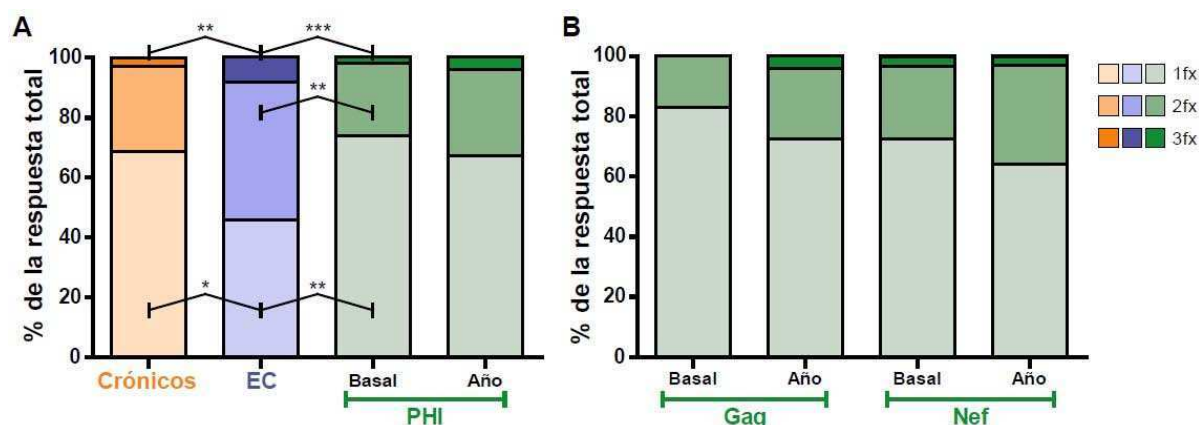
estas subpoblaciones de células T CD8<sup>+</sup> HIV-específicas podrían tener un papel relevante en el control del virus.



**Figura 19:** Contribución relativa de cada función o combinación de funciones al total de la respuesta T CD8<sup>+</sup> HIV-específica para los individuos Crónicos, EC y PHI. Cada punto representa la proporción de células T CD8<sup>+</sup> positivas para una determinada función (por ejemplo IFN- $\gamma$ ) o combinación de funciones (por ejemplo IFN- $\gamma$ /TNF- $\alpha$ ) en los tres grupos de estudio. El signo “+” indica la función evaluada. Los datos provenientes de los sujetos PHI corresponden a la muestra basal. Las líneas horizontales dentro de las cajas muestran el valor de la mediana. Los asteriscos denotan distintos valores de p: \*, p<0,05; \*\*, p<0,01 y \*\*\*, p<0,001; los cuales se calcularon utilizando la prueba de *Mann-Whitney*. 1fx: células monofuncionales; 2fx: células bifuncionales; 3fx: células trifuncionales.

En cuanto a la expresión de células trifuncionales, nuevamente el grupo de EC presentó una mayor proporción de células T CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>/TNF- $\alpha$ <sup>+</sup>/IL-2<sup>+</sup> (mediana 0,0% [IQ25-75= 0,0-7,7]) comparado con el grupo de Crónicos (0,0% [IQ25-75= 0,0-0,0]; p=0,0152) y el grupo PHI (0,0% [IQ25-75= 0,0-0,0]; p=0,0024). La misma tendencia se observó al analizar la expresión de las células trifuncionales T CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>/CD107A/B<sup>+</sup>/IL-2<sup>+</sup> donde los EC mostraron una mayor proporción de esta población celular (mediana 5,1% [IQ25-75=

0,0-9,4]) comparado con el grupo de Crónicos (0,0% [IQ25-75= 0,0-0,0];  $p=0,0046$ ) y el grupo PHI (0,0% [IQ25-75= 0,0-0,0];  $p=0,0007$ ). Luego, se estudió la polifuncionalidad de las células independientemente de si expresaban una, dos o tres funciones. Como se esperaba, la proporción de células polifuncionales fue considerablemente mayor en los EC comparado con el grupo de Crónicos y el grupo PHI (Figura 20A). En particular, los EC presentaron una proporción significativamente mayor de células trifuncionales (media  $8,1\% \pm 7,7\%$ ) y bifuncionales (media  $45,9\% \pm 14,3\%$ ) y por el contrario mostraron una proporción significativamente menor de células monofuncionales (media  $46,0\% \pm 19,0\%$ ) comparado con el grupo PHI (media 3fx:  $1,9\% \pm 6,8\%$  [ $p=0,0004$ ]; media 2fx:  $24,1\% \pm 26,0$  [ $p=0,0078$ ] y media 1fx:  $74,0 \pm 28,0\%$  [ $p=0,007$ ], respectivamente) así como también con el grupo de Crónicos (media 3fx:  $2,8\% \pm 9,1\%$  [ $p=0,0059$ ]; media 2fx:  $28,7\% \pm 27,2\%$  [ $p=0,06$ ] y media 1fx:  $68,6\% \pm 27,6\%$  [ $p=0,0339$ ], respectivamente).



**Figura 20:** (A) Resumen del perfil funcional de los individuos Crónicos, EC y PHI (muestra basal y al año en este último grupo). (B) Perfil funcional correspondiente al grupo PHI (muestra basal y al año) dividido según el péptido utilizado como estímulo (Gag o Nef). En ambos gráficos, las distintas subpoblaciones celulares fueron agrupadas por número de funciones, por lo tanto cada barra representa la media de la proporción de células T CD8<sup>+</sup> HIV-específica que expresan una (1fx), dos (2fx) o tres (3fx) funciones, independientemente de alguna función en particular. Los asteriscos denotan distintos valores de  $p$ : \*,  $p<0,05$ ; \*\*,  $p<0,01$  y \*\*\*,  $p<0,001$ ; los cuales se calcularon utilizando la prueba de *Mann-Whitney*.

Como se mencionó anteriormente, las células bifuncionales y trifuncionales fueron medidas de forma muy temprana en el grupo PHI, que en conjunto contabilizaban un 26,0% de las células T CD8<sup>+</sup> HIV-específicas de estos individuos. Por otra parte, la proporción de estas células parecieron incrementarse ligeramente con el transcurso de la infección hasta los 12 meses post-infección (32,6%), aunque la diferencia entre la muestra basal y la muestra al

año no difirieron significativamente (*Figura 20A*). Dentro del grupo PHI, no se observaron diferencias en ninguna función en particular o combinación de las mismas cuando los sujetos se dividieron en PHI<350 y PHI>350. De manera similar, no se observaron diferencias entre estos dos subgrupos en la proporción de células monofuncionales así como tampoco en las bifuncionales o en las trifuncionales. Además, no se observaron correlaciones significativas para ninguna de las funciones de manera individual o en combinación tanto con la CV plasmática o el recuento de células T CD4<sup>+</sup> basal así como tampoco con el *set point* viral o inmune.

Luego, se decidió comparar, en el grupo PHI, el perfil funcional de las células en función de la especificidad que presentaban. Para ello, se analizó la proporción de células T CD8<sup>+</sup> Gag-específicas y Nef-específicas que expresan una, dos o tres funciones en la muestra basal y en la muestra al año (*Figura 20B*). No se observaron diferencias entre ambos antígenos, indicando que la polifuncionalidad no se encuentra relacionada a la especificidad. Más aún, ambas respuestas, tanto Gag-específica como Nef-específica, mostraron un incremento en la polifuncionalidad en función del tiempo, pero este no llegó a ser estadísticamente significativo.

En conjunto estos resultados sugieren que a pesar de la presencia temprana de células T CD8<sup>+</sup> polifuncionales (previamente asociadas al control viral en EC), estas no pudieron ser asociadas con una mejor o peor resolución de la infección aguda. Además, los beneficios de las células T CD8<sup>+</sup> Gag-específicas no estarían relacionados con la polifuncionalidad en los términos analizados en este trabajo.

#### **IV. 5. ANÁLISIS DE LA RELACIÓN ENTRE LA POLIFUNCIONALIDAD DE LA POBLACIÓN T CD8<sup>+</sup> ESPECÍFICA Y SU CAPACIDAD DE SUPRIMIR LA REPLICACIÓN VIRAL DURANTE LA INFECCIÓN PRIMARIA**

Como se mencionó anteriormente, de todas las funciones efectoras de las células T CD8<sup>+</sup> estudiadas por citometría de flujo, la expresión conjunta de CD107A/B e IFN- $\gamma$  fue una de



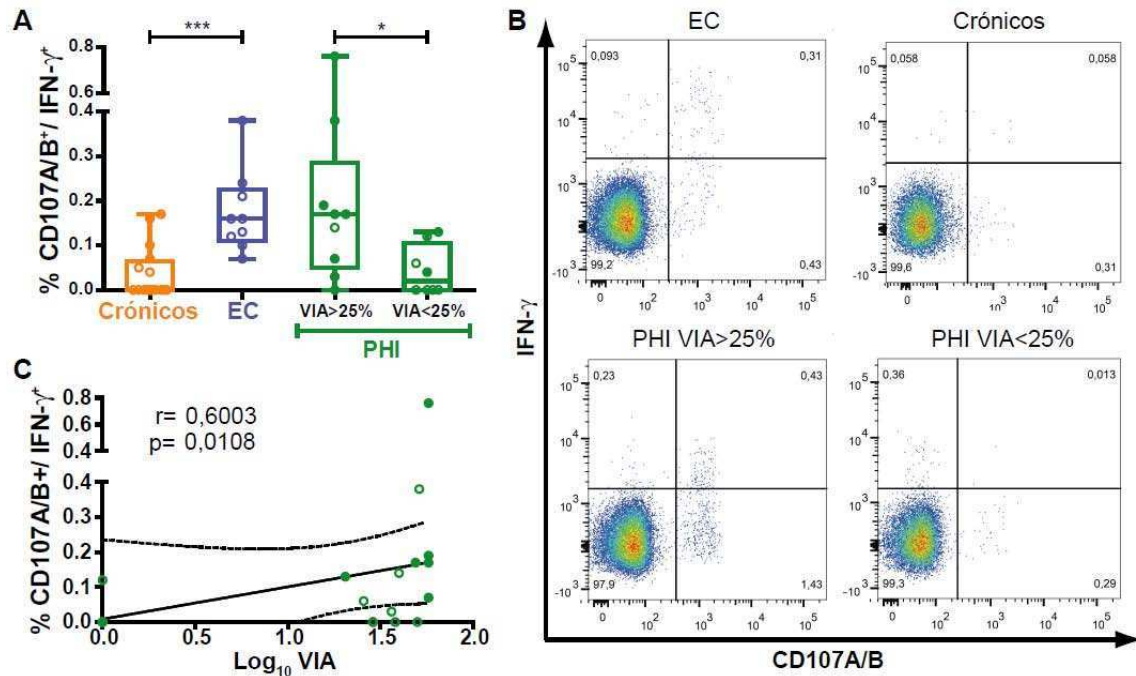
las funciones significativamente asociada con el estatus EC (*Figura 19*). Dada esta observación, se hipotetizó que esta combinación en particular de funciones (en vez de la polifuncionalidad como un todo) podría asociarse con una mayor capacidad de las células T CD8<sup>+</sup> HIV-específicas para controlar la replicación viral y así contribuir a una menor tasa de progresión durante la infección aguda/temprana. Por lo tanto, se decidió analizar las posibles asociaciones entre el porcentaje de células T CD8<sup>+</sup> HIV-específicas CD107A/B<sup>+</sup>/IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> y los parámetros virológicos e inmunológicos evaluados en el grupo PHI (en las muestras basales).

#### **IV. 5. 1. Relación entre la capacidad de inhibir la replicación viral *in vitro* (VIA) y la frecuencia de células bifuncionales CD107A/B<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> observadas en los individuos cursando la infección primaria**

Se observó que aquellos individuos PHI que mostraron una mayor capacidad de mediar VIA (VIA mayor a un 25%), presentaron un número significativamente mayor de células T CD8<sup>+</sup> CD107A/B<sup>+</sup>/IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> comparado con aquellos individuos PHI que mostraron una menor capacidad de mediar VIA (VIA menor a 25%) ( $p=0,0220$ ). Más aún, el porcentaje de células T CD8<sup>+</sup> CD107A/B<sup>+</sup>/IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> observado en los individuos que presentaban un VIA > 25% fue comparable con lo observado en el grupo de EC (*Figura 21A y B*). Además, se observó en el grupo PHI, una correlación significativa entre el porcentaje de células T CD8<sup>+</sup> HIV-específicas CD107A/B<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> y su capacidad de mediar VIA (*Spearman's*  $r=0,6003$ ,  $p=0,0108$ , *Figura 21C*). Estas observaciones, indican que la capacidad simultánea de degranulación y de expresión de IFN- $\gamma$  podrían jugar un rol relevante en la habilidad de las células T CD8<sup>+</sup> HIV-específicas de suprimir la replicación viral *in vitro*, que a su vez se asocia con una mejor preservación de la subpoblación celular T CD4<sup>+</sup> durante la infección temprana y con el estatus que presentan los EC.

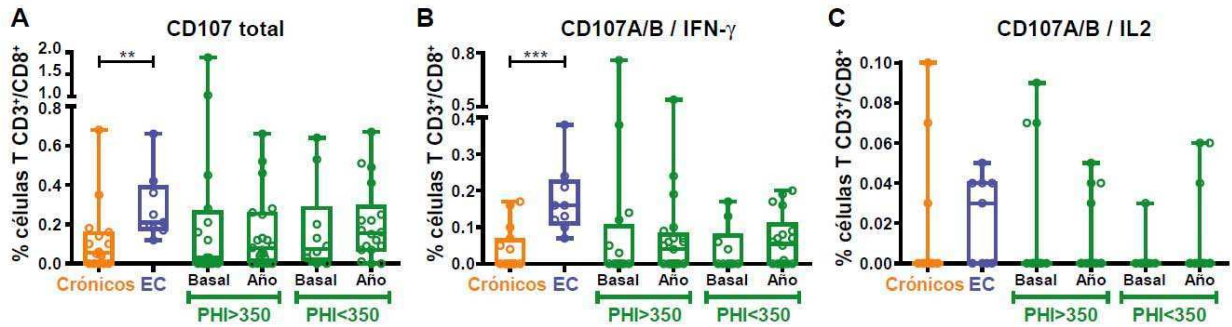
En base a estas observaciones, se decidió profundizar el análisis de la subpoblación de células T CD8<sup>+</sup> HIV-específicas CD107A/B<sup>+</sup>. Este análisis reveló que del total de células T CD8<sup>+</sup> HIV-específicas CD107A/B<sup>+</sup> (*Figura 22A*), el grupo de EC presentaba un porcentaje

mayor (mediana: 0,2% [IQ25-75= 0,2-0,4]) comparado con el grupo de Crónicos (mediana: 0,06% [IQ25-75= 0,0-0,2]), siendo esta diferencia estadísticamente significativa ( $p=0,0031$ ).



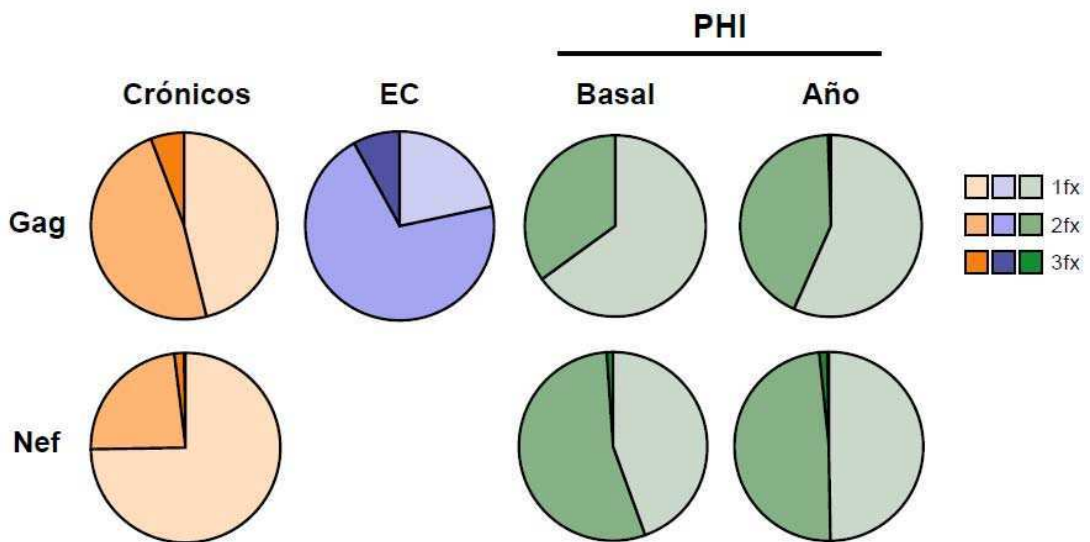
**Figura 21:** Asociación entre la capacidad de las células T CD8<sup>+</sup> de suprimir la replicación de HIV *in vitro* y la frecuencia de las células T CD8<sup>+</sup> HIV-específicas de degranular y secretar IFN- $\gamma$  luego de la estimulación. (A) Frecuencia de células T CD8<sup>+</sup> HIV-específicas CD107A/B<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> observada en los EC, Crónicos y sujetos PHI (segregados de acuerdo a la magnitud del VIA). (B) Citogramas representativos de IFN- $\gamma$  versus CD107A/B<sup>+</sup> (en la población CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>) correspondientes a un individuo de cada grupo de estudio. (C) Correlación entre la frecuencia de células T CD8<sup>+</sup> HIV-específicas CD107A/B<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> y la magnitud de VIA de los individuos PHI. Los datos provenientes de los sujetos PHI corresponden a la muestra basal. Las líneas horizontales dentro de las cajas muestran el valor de la mediana. Los asteriscos denotan distintos valores de  $p$ : \*,  $p < 0,05$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ ; los cuales se calcularon utilizando la prueba de *Mann-Whitney*. En el análisis de correlación el valor de  $r$  y  $p$  corresponde a la prueba de *Spearman's*.

Más aún, el 100% de los EC presentaban células T CD8<sup>+</sup> HIV-específicas CD107A/B<sup>+</sup> que co-expresaban IFN- $\gamma$  (mediana: 0,2% [IQ25-75= 0,1-0,2]) (Figura 22B) en una proporción estadísticamente mayor que el grupo de Crónicos (mediana: 0,0% [IQ25-75= 0,0-0,1];  $p=0,0006$ ). Esta misma tendencia se observó en el grupo de células T CD8<sup>+</sup> HIV-específicas CD107A/B<sup>+</sup> que co-expresaban IL-2 (Figura 22C) pero no alcanzo la significancia; por lo que en conclusión se puede inferir que la mayoría de las células T CD8<sup>+</sup> HIV-específicas con capacidad de degranulación eran células bi- o tri-funcionales.



**Figura 22:** Análisis de la expresión de CD107 total (A), CD107A/B / IFN- $\gamma$  (B) y CD107A/B / IL-2 (C) en los individuos reclutados. Se muestran los subgrupos PHI>350 y PHI<350, respectivamente. Las líneas horizontales muestran los valores de mediana. Los asteriscos denotan distintos valores de p: \*\*, p<0,01 y \*\*\*, p<0,001; los cuales se calcularon utilizando la prueba de *Mann-Whitney*.

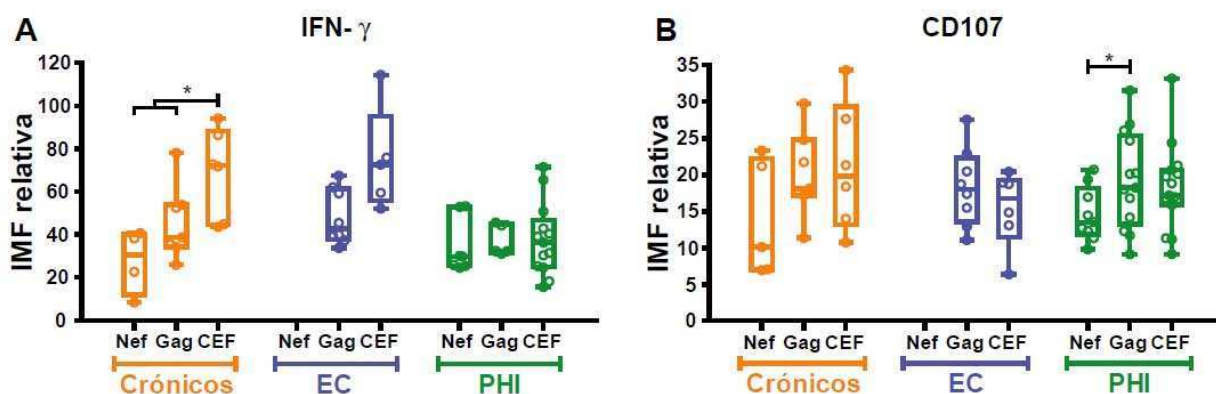
Cuando se realizó un análisis similar pero teniendo en consideración la especificidad de la respuesta (*Figura 23*), se observó que en el grupo de Crónicos, las células T CD8<sup>+</sup> Gag-específicas CD107A/B<sup>+</sup> (3fx: 5,7%) mostraban una mayor polifuncionalidad en comparación con las células Nef-específicas (3fx:1,5%), incluso en proporciones comparables a las células Gag-específicas observadas en los EC (3fx:8,7%). Sin embargo, no se observaron diferencias entre las células T CD8<sup>+</sup> Nef-específicas y Gag-específicas, en términos de polifuncionalidad asociada a la capacidad de degranulación en el grupo PHI, tanto en la muestra basal como en la muestra al año.



**Figura 23:** Diagrama de tortas del perfil funcional, según el péptido utilizado como estímulo (Gag o Nef), de los individuos Crónicos, EC y PHI (muestra basal y al año en este último grupo) con capacidad de degranulación (CD107A/B<sup>+</sup>). Las subpoblaciones celulares fueron agrupadas por número de funciones, según si expresan una (1fx), dos (2fx) o tres (3fx) funciones

#### IV. 5. 2. Análisis de la producción de IFN- $\gamma$ y CD107A/B

Luego, se estudió la IMF<sub>r</sub> de IFN- $\gamma$  y CD107A/B en las células T CD8<sup>+</sup> HIV-específicas como un indicador de estas funciones (Figura 24). El análisis de la IMF<sub>r</sub> de IFN- $\gamma$  mostró resultados que concordaban con lo observado previamente al analizar el tamaño promedio de spots en el ensayo de ELISPOT (Figura 24A).



**Figura 24:** Intensidad de fluorescencia media relativa (IMFr) de IFN- $\gamma$  (A) y CD107A/B (B) en las células T CD8<sup>+</sup> Nef-específicas, Gag-específicas y CEF-específicas, calculada como la relación entre la IMF de las células T CD8<sup>+</sup> específicas sobre la IMF de las células T CD8<sup>+</sup> totales, en los individuos Crónicos, EC y PHI. Los datos provenientes de los sujetos PHI corresponden a la muestra basal. Las líneas horizontales dentro de las cajas muestran el valor de la mediana. Los asteriscos denotan distintos valores de  $p$ : \*,  $p < 0,05$ ; los cuales se calcularon utilizando la prueba de *Mann-Whitney*. ND, no determinado.

Las células T CD8<sup>+</sup> CEF-específicas mostraron una IMF<sub>r</sub> de IFN- $\gamma$  1,7 veces mayor que las células T CD8<sup>+</sup> HIV-específicas, en el grupo de Crónicos ( $p=0,03$ ) y en los EC ( $p > 0,05$ ), pero no así en el grupo PHI. En cuanto a la expresión de CD107A/B, no se observaron diferencias entre los grupos, en la población de células T CD8<sup>+</sup> CEF-específicas (Figura 24B). Cuando se realizó el análisis intragrupo de la IMF<sub>r</sub> de CD107A/B, se observó que las células T CD8<sup>+</sup> Gag-específicas mostraban niveles mayores de IMF<sub>r</sub> comparado con las células Nef-específicas tanto en el grupo de Crónicos (1,7 veces mayor  $p > 0,05$ ) como en los individuos PHI (1,4 veces mayor  $p=0,033$ ). Más aún, la IMF<sub>r</sub> de CD107A/B para las células T CD8<sup>+</sup> Gag-específicas fue comparable a la observada para las células T CD8<sup>+</sup> CEF-específicas en los tres grupos de sujetos analizados, mientras que la de Nef fue menor. Cuando se realizó este mismo análisis pero en la población celular T CD8<sup>+</sup> doble positiva para CD107A/B<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>, se observó que la IMF<sub>r</sub> era mayor para cada función, como ya había sido reportado para

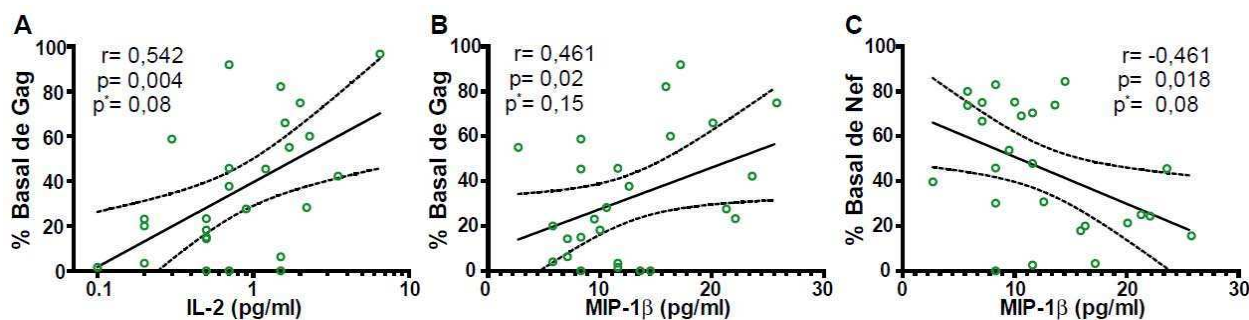
las células T CD8<sup>+</sup> polifuncionales [81], y las mismas tendencias observadas en la figura 24 se mantuvieron. Además, las diferencias en la expresión de CD107A/B entre las células T CD8<sup>+</sup> Nef-específicas versus las Gag-específicas se profundizaron. Sin embargo, esta observación deriva de un subgrupo de individuos reducido y con un pequeño número de eventos (especialmente en el grupo de Crónicos y PHI), como para poder delinear una conclusión definitiva.

En resumen, el grupo de EC mostró un mayor número de células T CD8<sup>+</sup> HIV-específicas con capacidad de degranulación, en comparación a los sujetos Crónicos y PHI. Más aún, en estos individuos esta actividad fue acompañada más frecuentemente, por la capacidad de secreción de citoquinas (IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> y/o IL-2), mientras que en los Crónicos y el grupo PHI, estas células fueron en su mayoría monofuncionales. Dentro del grupo PHI, se observó una correlación directa entre el porcentaje de células T CD8<sup>+</sup> HIV-específicas CD107A/B<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> y la capacidad de estas células de mediar VIA. Finalmente, la especificidad de Gag fue asociada con una mayor capacidad de degranulación (evidenciada por una mayor IMFr de CD107A/B), lo cual parece consistente con el hecho de que estas células tienen una mayor capacidad de mediar inhibición viral.

#### **IV. 6. ANÁLISIS DE LOS FACTORES SOLUBLES EN PLASMA Y SU RELACIÓN CON LA INMUNODOMINANCIA DE GAG**

La secreción de citoquinas juega un rol clave en muchas enfermedades infecciosas, tanto moldeando la respuesta inmune que se monta para contrarrestar un patógeno como contribuyendo a la patogenia. Reportes previos han establecido que los niveles de citoquinas en plasma durante la infección aguda de HIV podrían predecir la subsecuente progresión a la enfermedad [82-84]. En este contexto, se decidió analizar la relación entre los niveles de citoquinas presentes en el plasma de los individuos PHI y la inmunodominancia, ya sea de Gag o Nef, observada previamente en las muestras basales de este grupo en estudio. Este análisis se llevó a cabo con el objetivo de determinar si existe asociación entre determinantes inmunes solubles y celulares asociados con protección

frente a la progresión de la enfermedad. Además, se planteó que sí dos parámetros inmunes son verdaderos determinantes de protección, entonces se debería observar una asociación directa entre ellos. Para ello, se determinaron, de manera simultánea 39 citoquinas y quemoquinas (Ver *Materiales & Métodos*, capítulo III. 9.), en la muestra basal de plasma en un subgrupo de 28 sujetos PHI. En primer lugar, se observó que del total de la respuesta HIV-específica, el porcentaje de células T CD8<sup>+</sup> Gag-específicas correlacionó directamente con los niveles de MIP-1 $\beta$  e IL-2 en plasma (Figura 25A y B). Luego del ajuste del análisis (Ver *Materiales & Métodos*, capítulo III. 10.), la correlación entre MIP-1 $\beta$  y el porcentaje basal de Gag pierde la significancia, sin embargo se observa una clara tendencia la cual podría estar indicando la existencia de una asociación directa entre ambos parámetros. Además, la proporción de células T CD8<sup>+</sup> Nef-específicas correlacionó inversamente con la concentración plasmática de MIP-1 $\beta$  (Figura 25C). Estas observaciones son particularmente importantes, ya que estas moléculas son secretadas por los linfocitos T CD8<sup>+</sup> luego de ser estimulados. Además, el porcentaje de células que expresan IL-2 y MIP-1 $\beta$  tanto de forma individual como en combinación con otras funciones fueron previamente asociadas con control viral [47, 68, 85-87].



**Figura 25:** Correlación entre la respuesta inmunodominante anti-Gag o anti-Nef y los niveles de citoquinas/quemoquinas en plasma de los individuos PHI (en las muestras basales). Se observaron correlaciones significativas entre la inmunodominancia de Gag (A y B) y de Nef (C) y la concentración en plasma de IL-2 (A) y MIP-1 $\beta$  (B y C). Los valores de  $r$  y  $p$  corresponden a la prueba de *Spearman's*. Los valores de  $p$  ajustados ( $p^*$ ) fueron calculados mediante el método de *Benjamini & Hochberg* por la tasa de falso descubrimiento (FDR).

Cabe resaltar que el factor soluble MIP-1 $\beta$  ha sido reportado previamente por poseer la capacidad de mediar inhibición viral *in vitro* [88]. El hecho de que exista una asociación entre mediadores solubles con capacidad antivirales, como son IL-2 y MIP-1 $\beta$ , y la

inmunodominancia de Gag, se encuentra en concordancia con evidencia previa que indicaría que la inmunodominancia temprana por parte de Gag se encuentra de alguna manera relacionada con la generación de una respuesta antiviral robusta, eficiente y multifacética, reforzando así, la idea de que es un factor determinante de la inmunidad protectora que contribuye a una menor tasa de progresión a la enfermedad.

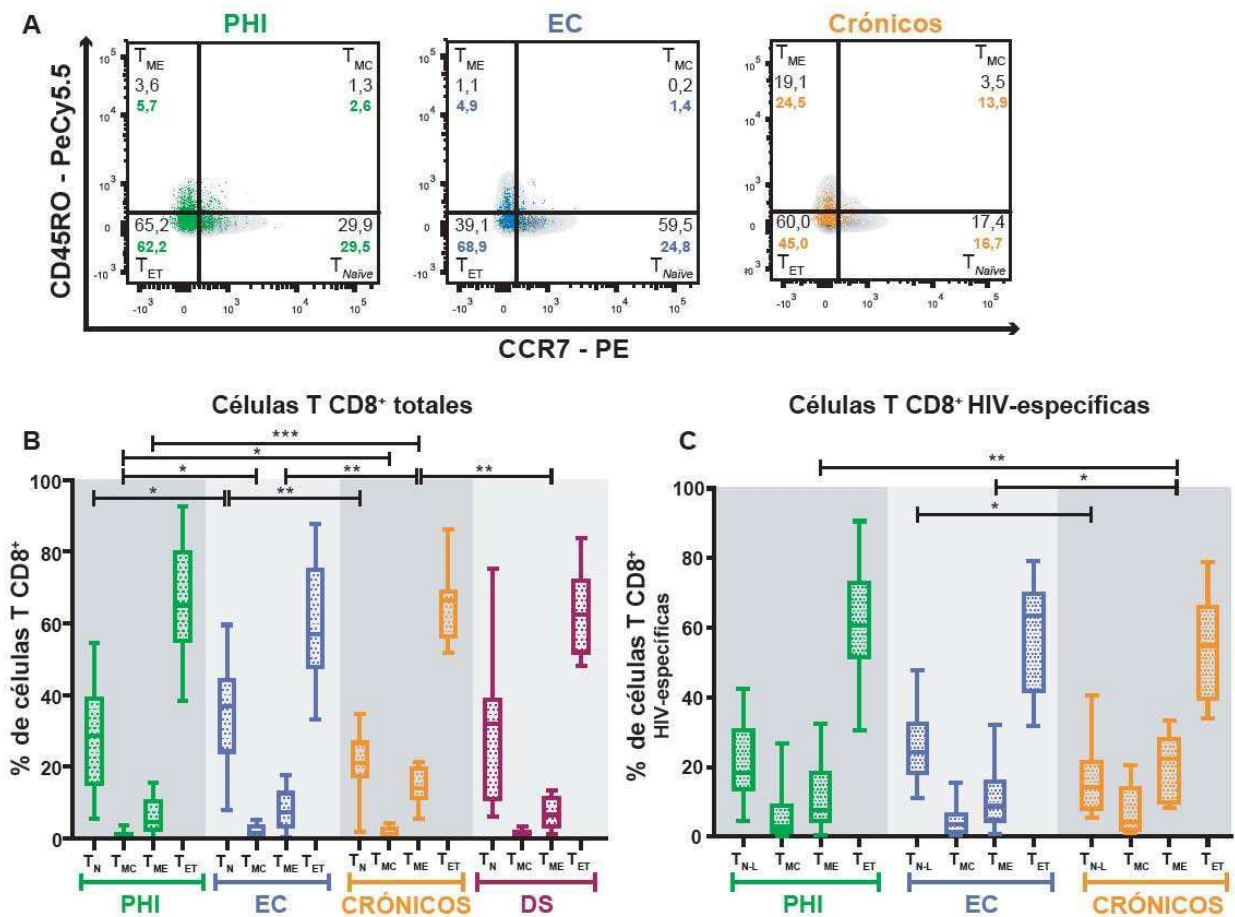
#### **IV. 7. ANÁLISIS DE LA DISTRIBUCIÓN DE LOS FENOTIPOS DE MEMORIA EN LAS CÉLULAS T CD8<sup>+</sup> TOTAL Y HIV-ESPECÍFICAS**

Luego, se decidió estudiar la distribución de los fenotipos de memoria en los distintos grupos de individuos reclutados en este trabajo y su asociación con la progresión a la enfermedad. Para ello, se realizó un análisis inmunofenotípico de las células T CD8<sup>+</sup> por citometría de flujo, lo que nos permitió definir cuatro sub-poblaciones (*Figura 26A*): células *naïve* ( $T_{Naïve}$ , CCR7<sup>+</sup>CD45RO<sup>-</sup>), células de memoria central ( $T_{MC}$ , CCR7<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>), células de memoria efectora ( $T_{ME}$ , CCR7<sup>-</sup>CD45RO<sup>+</sup>) y células efectoras terminales ( $T_{ET}$ , CCR7<sup>-</sup>CD45RO<sup>-</sup>). La distribución de estas sub-poblaciones se analizó tanto en el total de las células T CD8<sup>+</sup> como en las células HIV-específicas. Estas últimas se identificaron por su capacidad de degranular (secreción de CD107A/B) y/o de secretar citoquinas (IFN- $\gamma$ , IL-2 y/o TNF- $\alpha$ ) luego de la estimulación con el correspondiente *pool* de péptidos (como se mencionó anteriormente se utilizaron los *pools* de péptidos que presentaron una respuesta positiva en el ensayo de ELISPOT). Todas las moléculas utilizadas para identificar las células T CD8<sup>+</sup> HIV-específicas (CD107A/B, IFN- $\gamma$ , IL-2 y TNF- $\alpha$ ) fueron identificadas utilizando anticuerpos conjugados al mismo fluorocromo (FITC) en función de poder detectar las células respondedoras luego de la estimulación, independientemente de su función particular.

##### **IV. 7. 1. Distribución de las subpoblaciones de memoria de las células T CD8<sup>+</sup>**

La distribución de los fenotipos de memoria en el compartimiento celular T CD8<sup>+</sup> total mostró la siguiente jerarquía en todos los grupos en estudio:  $T_{ET} > T_{Naïve} > T_{ME} > T_{MC}$  (*Figura 26B*). A pesar de que esta jerarquía se conservó en todos los grupos, se observaron

diferencias en la proporción de las subpoblaciones al realizar la comparación entre grupos. Se observó que la mediana de la proporción de las células  $CD8^+ T_{Naive}$  fue mayor en los EC (36,9%; IQ25-75: 24,2-44,2), seguido por los DS (31,9%; IQ25-75: 11,0-38,8), los individuos PHI (29,0%; IQ25-75: 15,4-38,9) y por último los Crónicos (20,9%; IQ25-75: 17,4-26,6). La diferencia observada en la proporción de células  $CD8^+ T_{Naive}$  entre los EC y los DS no fue estadísticamente significativa, apenas alcanza una significancia estadística entre los EC y PHI ( $p=0,0493$ ) y por último difirió significativamente entre los EC y los Crónicos ( $p=0,0018$ ).



**Figura 26:** Distribución de las sub-poblaciones de memoria en las células T CD8<sup>+</sup> totales y HIV-específicas. (A) Gráficos de densidad y superposición de las sub-poblaciones de memoria total (gráfico de densidad) y HIV-específica (gráfico de puntos coloreados) de un individuo representativo por grupo de estudio. Se definen 4 sub-poblaciones en cada cuadrante: T<sub>N</sub> and T<sub>N-L</sub>= células Naïve y Naïve-like, respectivamente (CCR7<sup>+</sup>/CD45RO<sup>-</sup>); T<sub>MC</sub>= células de memoria central (CCR7<sup>+</sup>/CD45RO<sup>+</sup>); T<sub>ME</sub>= células de memoria efectora (CCR7<sup>-</sup>/CD45RO<sup>+</sup>); T<sub>ET</sub>= células efectoras terminales (CCR7<sup>-</sup>/CD45RO<sup>-</sup>). (B) Porcentaje de las sub-poblaciones T CD8<sup>+</sup> totales y (C) HIV-específicas por grupo de estudio. Las líneas horizontales dentro de las cajas muestran el valor de la mediana. Los asteriscos denotan distintos valores de  $p$ : \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ ; los cuales se calcularon utilizando la prueba de Mann-Whitney.



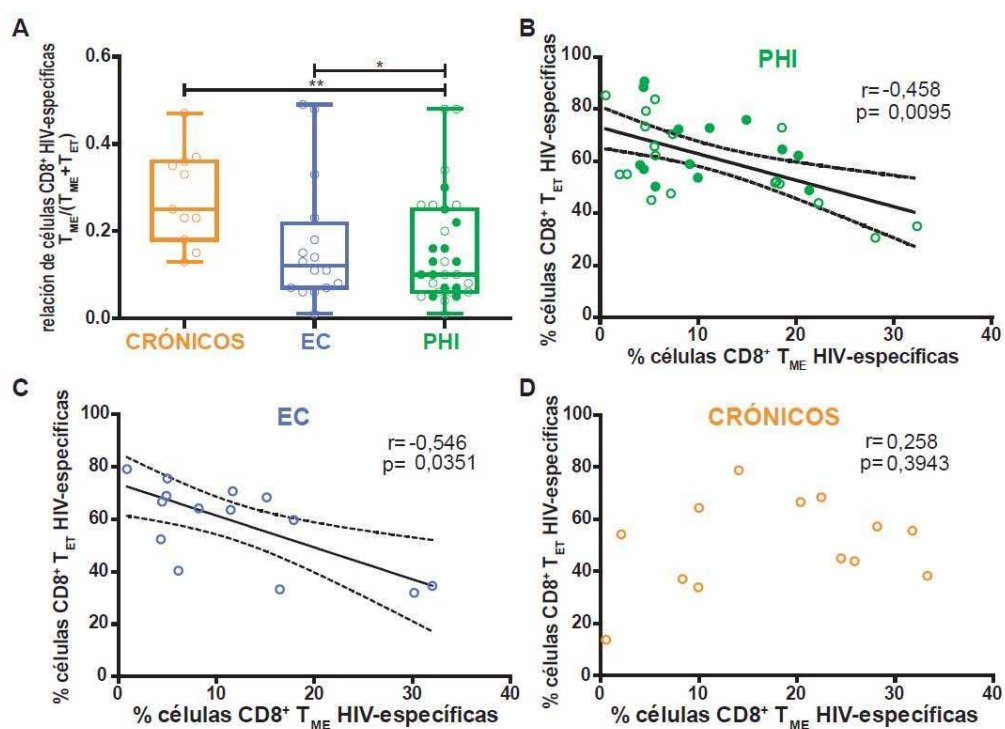
Esta observación indicaría que las células  $CD8^+ T_{Naive}$  comprenden una gran proporción del compartimento T en tiempos tempranos post-infección [89]. Por otro lado, la mayor proporción de células  $CD8^+ T_{ET}$  se observó en el grupo de Crónicos (66,5%; IQ25-75: 56,4-68,7), seguido por el grupo PHI (64,2%; IQ25-75: 55,3-79,5), DS (62,6%; IQ25-75: 51,9-71,8) y por último EC (56,8%; IQ25-75: 47,9-74,9) (*Figura 26B*). La mediana de la proporción de las células  $CD8^+ T_{MC}$  fue estadísticamente menor en los individuos PHI (0,6%; IQ25-75: 0,2-1,3) comparado con ambos grupos de individuos crónicamente infectados: Crónicos (1,3%; [IQ25-75: 0,6-2,8];  $p=0,0127$ ) y EC (1,5%; [IQ25-75: 0,3-3,3];  $p=0,0405$ ). Por último, se observó que el grupo de Crónicos presentaba una mayor proporción (aproximadamente el doble) de células  $CD8^+ T_{ME}$  (13,9%; IQ25-75: 11,3-19,5), comparado con los EC (7,1%; [IQ25-75: 3,2-13,0];  $p=0,0048$ ), DS (6,5%; [IQ25-75: 3,2-11,2];  $p=0,0076$ ) y PHI (4,5%; [IQ25-75: 2,5-10,1];  $p<0,0001$ ). Se realizó un análisis similar entre los subgrupos  $PHI>350$  y  $PHI<350$  y no se observaron diferencias estadísticamente significativas. En conjunto, estos resultados indican que la distribución del fenotipo de memoria en el compartimento celular T  $CD8^+$  evaluado en tiempos tempranos post-infección es similar a lo observado en DS y EC. En contraste, una alta proporción de células T  $CD8^+$  que presentan un fenotipo con mayor diferenciación, como son las células  $CD8^+ T_{ME}$  y  $T_{ET}$ , se observó en el grupo de Crónicos virémicos, mientras que una mayor proporción de células  $CD8^+$  menos diferenciadas  $T_{Naive}$  y  $T_{MC}$  se observó en los EC, similar a lo observado en DS (*Figura 26B*).

#### **IV. 7. 2. Distribución de las subpoblaciones de memoria en las células T $CD8^+$ HIV-específicas**

La distribución de los fenotipos de memoria en el compartimento T  $CD8^+$  HIV-específico reflejó lo observado en el compartimento total. Sin embargo, se observaron algunas diferencias importantes. Dentro del contexto de este trabajo, cabe señalar que debido a limitaciones técnicas, nuestra definición de células  $CD8^+ T_{Naive}$  no es lo suficientemente estricta como para excluir completamente a la subpoblación de células de memoria

temprana, denominadas células *stem* de memoria (*stem-cell memory T-cells*) [90]. Para evadir por completo esta dificultad técnica, es necesario incluir marcadores de superficie adicionales (como por ejemplo CD95) en el panel de marcación [91]. Por lo tanto, cuando nos referimos a las células T CD8<sup>+</sup> HIV-específicas CCR7<sup>+</sup>CD45RO<sup>-</sup>, utilizaremos el término "naïve-like" (T<sub>Naïve-Like</sub>). La mayor proporción de células CD8<sup>+</sup> T<sub>Naïve-Like</sub> HIV-específicas se observó en los EC (24,2%; IQ25-75: 18,4-32,5), seguido por los sujetos PHI (18,5%; IQ25-75: 14,0-33,3) y por último el grupo de Crónicos (14,34%; IQ25-75: 8,0-21,4; p=0,0164) (Figura 26C). El grupo de Crónicos, mostró una proporción significativamente mayor de células CD8<sup>+</sup> T<sub>ME</sub> HIV-específicas (22%; IQ25-75: 10,0-28,2), comparado con el grupo PHI (7,4%; [IQ25-75: 4,6-18,3]; p=0,002) y con los EC (8,8%; [IQ25-75: 4,7-15,8]; p=0,0111). Además, presentó una menor proporción de células CD8<sup>+</sup> T<sub>ET</sub> HIV-específicas (54,9%; IQ25-75: 39,7-66,0), comparado con los PHI (58,9%; IQ25-75: 51,3-72,9) y con los EC (63,5%; IQ25-75: 41,9-69,8). Estos resultados están en concordancia con estudios previos que indican que, durante la infección crónica progresiva, hay un arresto en la maduración de las células T CD8<sup>+</sup> HIV-específicas de T<sub>ME</sub> a T<sub>ET</sub> [39, 92]. Para obtener un panorama más amplio al respecto, se estudió la relación entre las células CD8<sup>+</sup> HIV-específicas T<sub>ME</sub> + T<sub>ET</sub> mediante el cálculo del coeficiente T<sub>ME</sub>/(T<sub>ME</sub>+T<sub>ET</sub>) en todos los grupos. El objetivo fue analizar la proporción de células T<sub>ME</sub> en función del total de la subpoblación más diferenciada (T<sub>ME</sub> más T<sub>ET</sub>). Se observó que la relación T<sub>ME</sub>/(T<sub>ME</sub>+T<sub>ET</sub>) fue significativamente mayor en el grupo de Crónicos comparado con los EC (p=0,0144) y los sujetos PHI (p=0,0042) (Figura 27A). Por otro lado, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los EC y PHI o entre los subgrupos PHI>350 versus PHI<350. Más aún, los porcentajes de células CD8<sup>+</sup> HIV-específicas T<sub>ME</sub> y T<sub>ET</sub> correlacionaron negativamente en los individuos PHI (r=-0,458; p=0,0095; Figura 27B) y en los EC (r=-0,546; p=0,0351; Figura 27C) mientras que no se observó dicha correlación en el grupo de Crónicos (r=0,258; p>0,05; Figura 27D). Estos resultados apoyan la hipótesis de que la diferenciación de las células CD8<sup>+</sup> T<sub>ET</sub> a partir de las T<sub>ME</sub> se encuentra alterada en los individuos cursando la infección crónica virémica. Sin embargo, no es el caso

que se observa en los EC o, aún más importante, en los individuos de infección primaria. En estos individuos este resultado estaría indicando la existencia de una preservación temprana del compartimiento celular T CD8<sup>+</sup> previo a la entrada en la etapa crónica de la infección.

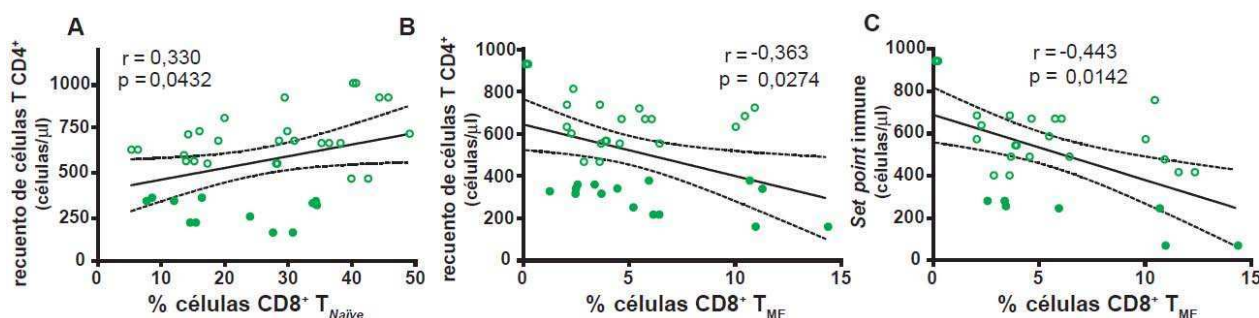


**Figura 27:** Arresto en la diferenciación de las células T CD8<sup>+</sup> HIV-específicas desde memoria efectora (T<sub>ME</sub>) hacia efectoras terminales (T<sub>ET</sub>) de los sujetos enrolados en el estudio. (A) Relación de las células CD8<sup>+</sup> HIV-específicas T<sub>ME</sub>/(T<sub>ME</sub>+T<sub>ET</sub>) por grupo de estudio. Correlación entre las células CD8<sup>+</sup> HIV-específicas T<sub>ET</sub> versus T<sub>ME</sub> en el grupo PHI (B), en los EC (C), y en el grupo de Crónicos (D). En el grupo PHI, los puntos verdes y blancos denotan los subgrupos PHI<350 y PHI>350 respectivamente. En el gráfico A, las líneas horizontales dentro de las cajas muestran el valor de la mediana. El análisis intergrupo se realizó mediante el test *Mann-Whitney*. Los asteriscos denotan distintos valores de *p*: \*, *p*<0,05; \*\*, *p*<0,01. En el análisis de correlación el valor de *r* y *p* corresponde a la prueba de *Spearman's*.

Finalmente, en base a nuestros resultados que mostraron que las células T CD8<sup>+</sup> Gag-específicas tienen una mayor capacidad de mediar funciones antivirales, hipotetizamos que la distribución de los fenotipos de memoria en el compartimiento de células T CD8<sup>+</sup> HIV-específicas podría variar de acuerdo al antígeno utilizado como estímulo, por ejemplo el *pool* de péptidos Nef *versus* Gag. Sin embargo, no se observaron asociaciones entre la especificidad antigénica y el fenotipo de memoria de las células T CD8<sup>+</sup> en todos los grupos analizados.

### IV. 7. 3. La distribución de las células T CD8<sup>+</sup> de memoria está asociada con marcadores de progresión a la enfermedad

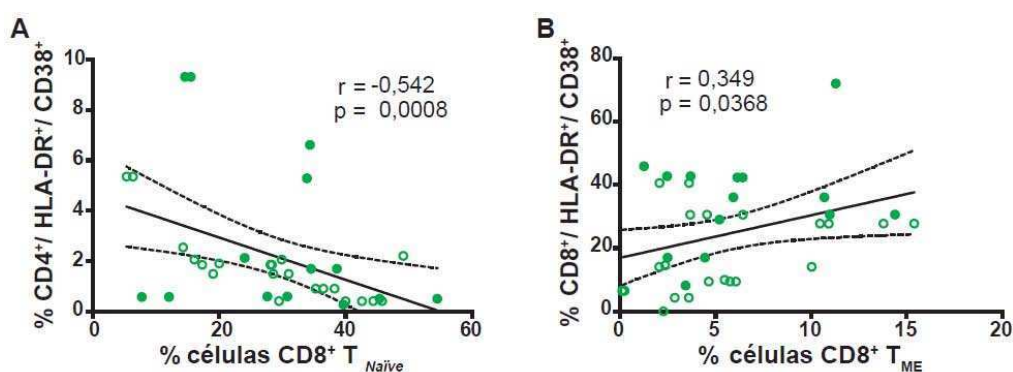
En base a los resultados descritos en esta tesis, en cuanto a la distribución de los fenotipos de memoria, tanto en el compartimiento T CD8<sup>+</sup> total como el compartimiento HIV-específico, en los distintos grupos en estudio, los cuales a su vez representan distintos estadios de progresión a la enfermedad, se hipotetizó que dentro del grupo PHI, la frecuencia relativa de las distintas subpoblaciones de memoria evaluadas en la muestra basal podrían asociarse con diferentes tasas de progresión a la enfermedad. De ser así, la frecuencia relativa de una subpoblación dada, ensayada a tiempos tempranos post-infección, podría postularse como un indicador de la posterior tasa de progresión a la enfermedad. Para evaluar esto, se realizaron análisis de correlación entre el porcentaje de las distintas subpoblaciones de memoria de los sujetos reclutados en este estudio y los datos clínicos obtenidos en la muestra basal y durante el primer año post-infección.



**Figura 28:** Correlaciones entre la proporción de la subpoblación celular CD8<sup>+</sup> T<sub>Naive</sub> (A) y T<sub>ME</sub> (B y C) evaluados en la muestra basal de los individuos PHI y el recuento de células T CD4<sup>+</sup> basal (A y B) o el *set point* inmune (C). Los puntos verdes y blancos denotan los subgrupos PHI < 350 y PHI > 350, respectivamente. En el análisis de correlación el valor de *r* y *p* corresponde a la prueba de *Spearman's*.

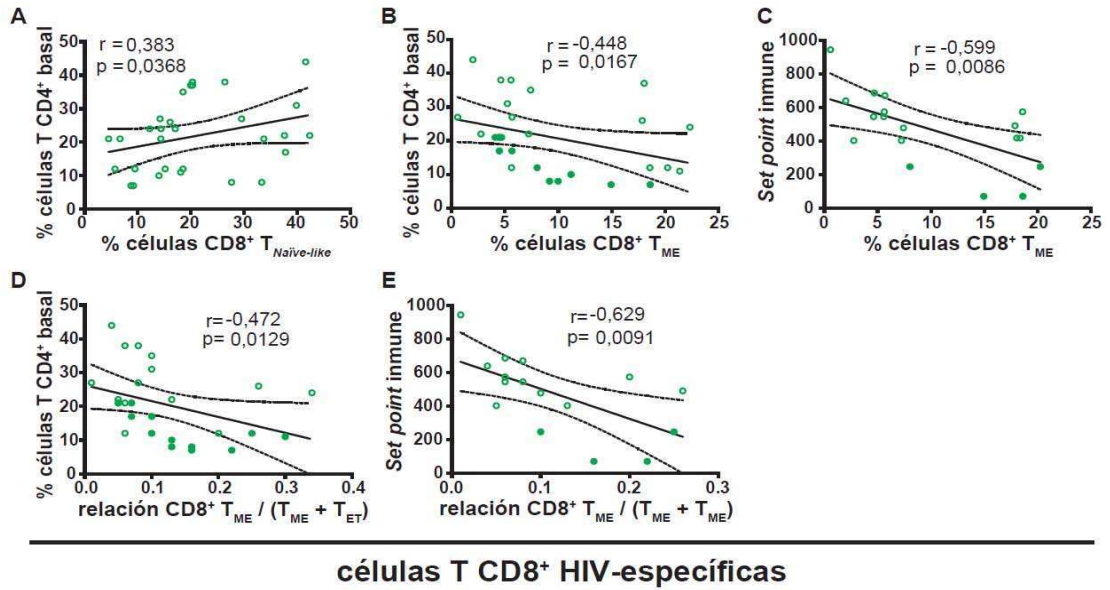
En cuanto al compartimiento de células T CD8<sup>+</sup> totales, y siempre analizando el grupo de individuos PHI, se observó en primer lugar que la proporción de células CD8<sup>+</sup> T<sub>Naive</sub> se correlacionó de manera directa con el recuento de células T CD4<sup>+</sup> basal ( $r=0,330$ ;  $p=0,0432$ ; *Figura 28A*) y, en contraste, la proporción de células CD8<sup>+</sup> T<sub>ME</sub> se correlacionó inversamente con el recuento de células T CD4<sup>+</sup> basal ( $r=-0,363$ ;  $p=0,0274$ ; *Figura 28B*) y con el *set point* inmune ( $r=-0,443$ ;  $p=0,0142$ ; *Figura 28C*) indicando que la diferenciación de manera temprana de estas subpoblaciones celulares se asociaría luego con el nivel de *set*

*point* inmune. Por otro lado, no se encontró asociación alguna entre las distintas subpoblaciones de células T CD8<sup>+</sup> y la CV plasmática o el *set point* viral. Por último, al analizar los niveles basales de activación inmune, se observó una asociación indirecta entre la proporción de células CD8<sup>+</sup> T<sub>Naïve</sub> y la activación inmune de la población linfocitaria T CD4<sup>+</sup> ( $r = -0,542$ ;  $p = 0,0008$ ; *Figura 29A*) y, por el contrario, se observó una asociación directa entre los linfocitos CD8<sup>+</sup> T<sub>ME</sub> y la activación inmune de la población linfocitaria T CD8<sup>+</sup> ( $r = 0,349$ ;  $p = 0,0368$ ; *Figura 29B*).



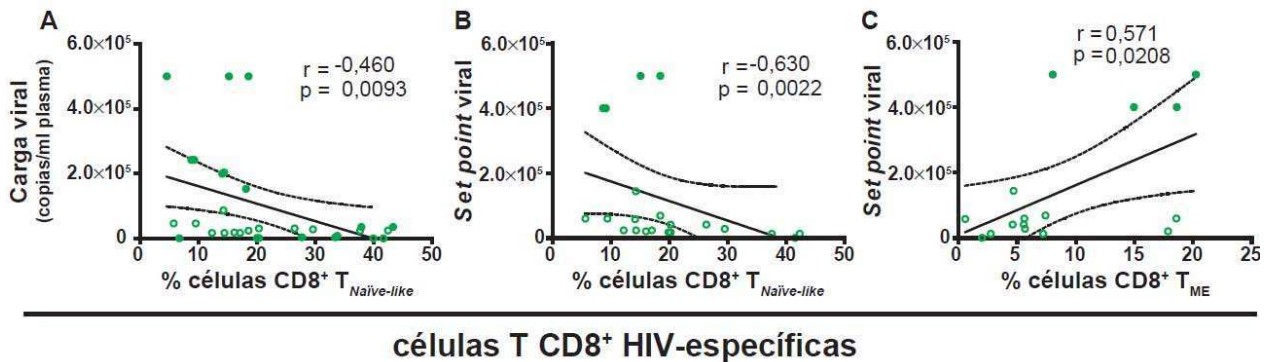
**Figura 29:** Correlaciones entre la proporción de la subpoblación celular CD8<sup>+</sup> T<sub>Naïve</sub> (A) y T<sub>ME</sub> (B) evaluados en la muestra basal de los individuos PHI y la activación inmune de la subpoblación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> (A) o T CD8<sup>+</sup> (B). Los puntos verdes y blancos denotan los subgrupos PHI < 350 y PHI > 350, respectivamente. En el análisis de correlación el valor de  $r$  y  $p$  corresponde a la prueba de Spearman's.

Cuando se analizó el compartimiento T CD8<sup>+</sup> HIV-específico, se encontró que la proporción de células CD8<sup>+</sup> T<sub>Naïve-Like</sub> se correlacionó directamente con el porcentaje de células T CD4<sup>+</sup> basal ( $r = 0,383$ ;  $p = 0,0368$ , *Figura 30A*). Por el contrario, la proporción de células CD8<sup>+</sup> T<sub>ME</sub> HIV-específicas se correlacionó de manera inversa con el porcentaje de células T CD4<sup>+</sup> basal ( $r = -0,448$ ;  $p = 0,0167$ , *Figura 30B*) y con el *set point* inmune ( $r = -0,599$ ;  $p = 0,0086$ , *Figura 30C*). Las mismas tendencias significativas se observaron cuando se analizó la relación T<sub>ME</sub> / (T<sub>ME</sub> + T<sub>ET</sub>) en el compartimiento T CD8<sup>+</sup> HIV-específico ( $r = -0,472$ ;  $p = 0,0129$ , *Figura 30D* y  $r = -0,629$ ;  $p = 0,0091$ , *Figura 30E*, respectivamente).



**Figura 30:** Correlaciones entre la proporción de la subpoblación de células CD8<sup>+</sup> T<sub>Naive-Like</sub> (A), T<sub>ME</sub> (B y C), la relación T<sub>ME</sub>/(T<sub>ME</sub>+T<sub>ET</sub>) (D y E) evaluados en la muestra basal de los individuos PHI y el porcentaje de células T CD4<sup>+</sup> basal (A, B y D) o el *set point* inmune (C y E). Los puntos verdes y blancos denotan los subgrupos PHI < 350 y PHI > 350, respectivamente. En el análisis de correlación el valor de *r* y *p* corresponde a la prueba de *Spearman's*.

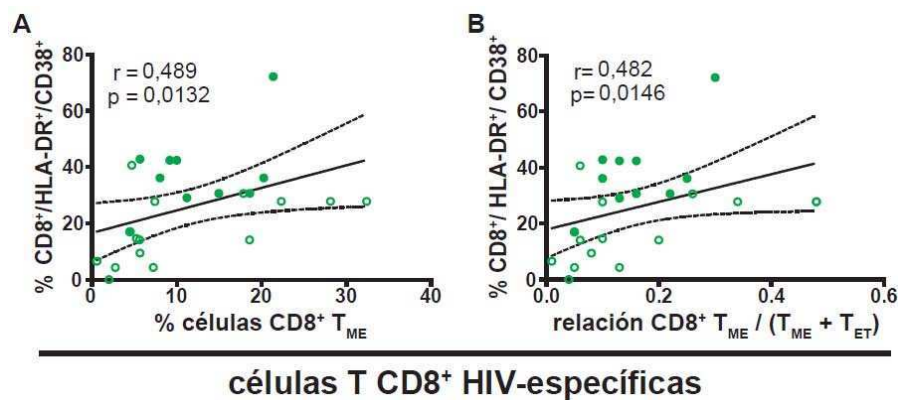
Por otro lado, la proporción de células CD8<sup>+</sup> T<sub>Naive-Like</sub> se relacionó de manera inversa con la CV plasmática evaluada en la muestra basal ( $r = -0,460$ ;  $p = 0,0093$ , *Figura 31A*) y el *set point* viral ( $r = -0,630$ ;  $p = 0,0022$ , *Figura 31B*). Además, la proporción de células CD8<sup>+</sup> T<sub>ME</sub> HIV-específicas se correlacionaron directamente con el *set point* viral ( $r = 0,571$ ;  $p = 0,0208$ , *Figura 31C*). Luego, se analizó la asociación con la activación inmune, observándose una correlación directa tanto con el porcentaje de células CD8<sup>+</sup> T<sub>ME</sub> HIV-específicas ( $r = 0,489$ ;  $p = 0,0132$ , *Figura 32A*), como con la relación T<sub>ME</sub>/(T<sub>ME</sub>+T<sub>ET</sub>) en el compartimiento T CD8<sup>+</sup> HIV-específico ( $r = 0,482$ ;  $p = 0,0146$ , *Figura 32B*).



**Figura 31:** Leyenda en página siguiente

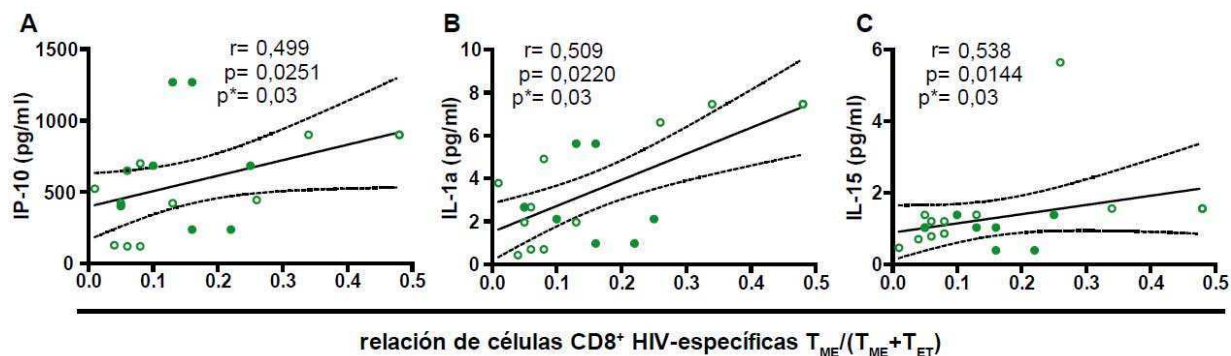
**Figura 31:** Correlaciones entre la proporción de la subpoblación de células  $CD8^+ T_{Naive-Like}$  (A y B),  $T_{ME}$  (C) evaluados en la muestra basal de los individuos PHI y la CV plasmática basal (A) o el *set point* viral (B y C). Los puntos verdes y blancos denotan los subgrupos PHI<350 y PHI>350, respectivamente. En el análisis de correlación el valor de  $r$  y  $p$  corresponde a la prueba de *Spearman's*. (Figuras en página anterior)

Por último, se observó que la relación  $T_{ME}/(T_{ME}+T_{ET})$  en el compartimento T  $CD8^+$  HIV-específico correlacionaba de manera directa con los niveles plasmáticos de tres citoquinas asociadas a progresión a la enfermedad como son IP-10 ( $r=0,499$ ;  $p=0,0251$ , *Figura 33A*), IL-1a ( $r=0,509$ ;  $p=0,0220$ , *Figura 33B*) e IL-15 ( $r=0,538$ ;  $p=0,0144$ , *Figura 33C*).



**Figura 32:** Correlaciones entre la proporción de la subpoblación de células  $CD8^+ T_{ME}$  (A), la relación  $T_{ME}/(T_{ME}+T_{ET})$  (B) evaluado en la muestra basal de los individuos PHI y la activación inmune de la población linfocitaria T  $CD8^+$ . Los puntos verdes y blancos denotan los subgrupos PHI<350 y PHI>350, respectivamente. En el análisis de correlación el valor de  $r$  y  $p$  corresponde a la prueba de *Spearman's*.

En conjunto, y en concordancia con el análisis intergrupo realizado, estos resultados indican que una mayor proporción relativa tanto de las células  $CD8^+ T_{Naive}$  totales como HIV-específicas ( $T_{Naive-Like}$ ) a tiempos tempranos post-infección se correlaciona con un mejor estatus inmunológico en términos de recuento de células T  $CD4^+$  basal como con el *set point* inmune. De manera inversa, una mayor proporción de células  $CD8^+ T_{ME}$  y su acumulación relativa en función del conjunto de células efectoras ( $T_{ME}+T_{ET}$ ) en el compartimento T  $CD8^+$  HIV-específico (evaluado como la relación  $T_{ME}/(T_{ME}+T_{ET})$ ) se correlaciona con marcadores de progresión rápida a la enfermedad: un menor recuento de células T  $CD4^+$  basal y un menor *set point* inmune, así como también un mayor *set point* viral (esto último, sólo para el compartimento T  $CD8^+$  HIV-específico) y mayores niveles, tanto celulares como factores solubles, de activación inmune.



**Figura 33:** Correlaciones entre la relación de las células CD8<sup>+</sup> HIV-específicas  $T_{ME}/(T_{ME}+T_{ET})$  evaluado en la muestra basal de los individuos PHI y los niveles plasmáticos de las citoquinas IP-10 (A), IL-1a (B) e IL-15 (C). Los puntos verdes y blancos denotan los subgrupos PHI < 350 y PHI > 350, respectivamente. En el análisis de correlación el valor de  $r$  y  $p$  corresponde a la prueba de Spearman's. Los valores de  $p$  ajustados ( $p^*$ ) fueron calculados mediante el método de Benjamini & Hochberg por la tasa de falso descubrimiento (FDR).

#### IV. 8. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL FACTOR DE MUERTE CELULAR PROGRAMADA 1 (PD-1) DURANTE LA INFECCIÓN PRIMARIA Y SU ASOCIACIÓN CON LA DISTRIBUCIÓN DEL FENOTIPO DE MEMORIA Y PROGRESIÓN A LA ENFERMEDAD

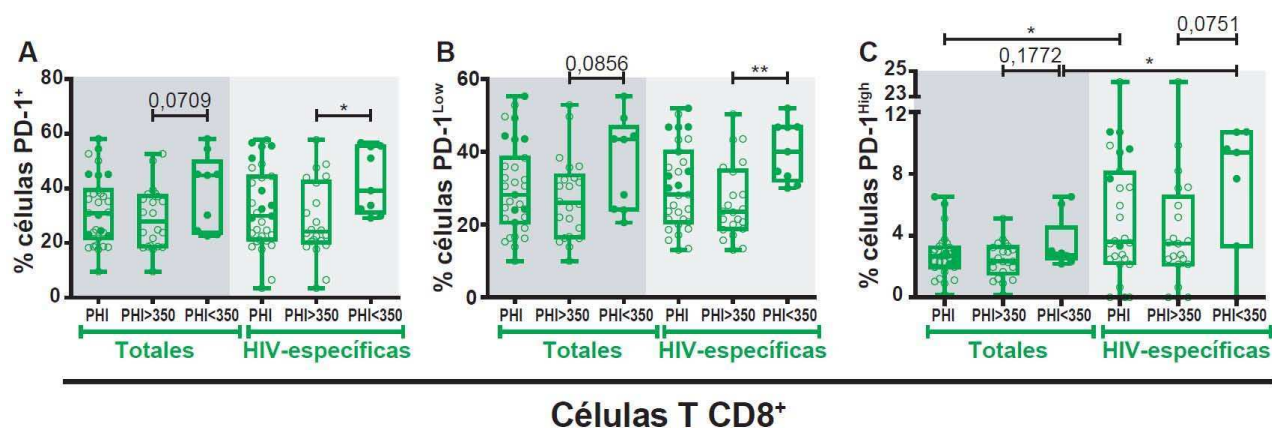
Con el objetivo de profundizar el análisis del fenotipo de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> durante la infección primaria por HIV, se analizó, tanto en la población de células T CD8<sup>+</sup> totales como en las HIV-específicas, la expresión de PD-1, una molécula comúnmente asociada al agotamiento funcional de las células T. El análisis se llevó a cabo en un subgrupo de 19 individuos PHI, utilizando muestras obtenidas a los  $8 \pm 1$  meses post-infección, donde se estudiaron la relación entre la expresión de PD-1, los marcadores de progresión a la enfermedad (CV plasmática, recuento de células T CD4<sup>+</sup>, activación inmune) así como también la especificidad, la funcionalidad y la distribución de las poblaciones de memoria.

##### IV. 8. 1. Análisis de la expresión de PD-1 en los individuos cursando la infección primaria

Al analizar la expresión de PD-1, se observó que un 31,8% (mediana; IQ25-75: 22,6-40,2) de la población T CD8<sup>+</sup> total expresaba este marcador de agotamiento celular (Figura 34A). A su vez un porcentaje similar de expresión se observó en la población T CD8<sup>+</sup> HIV-



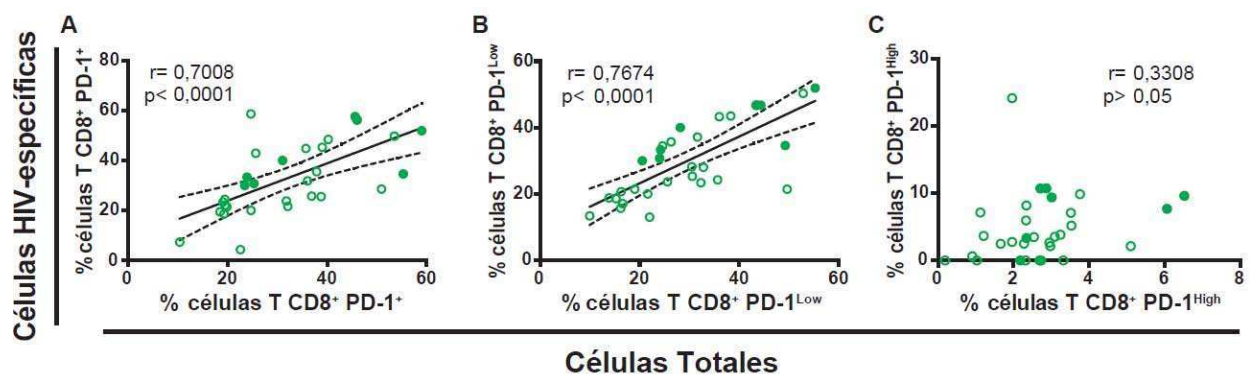
específica (mediana 30,8%; IQ25-75: 22,1-45,3). Más aún, al dividir al grupo PHI, se evidenció que, los individuos PHI<350 presentaban una mayor proporción de células T CD8<sup>+</sup> PD-1<sup>+</sup>, tanto totales como HIV-específicas, comparado con su contraparte PHI>350 (45,6% versus 28,8% [p>0,05] y 40,0% versus 25,0% [p=0,0109], respectivamente, *Figura 34A*). En el caso del compartimiento T CD8<sup>+</sup> total se observó una clara tendencia a pesar de que no alcanzó a ser una diferencia estadísticamente significativa.



**Figura 34:** Expresión de la molécula PD-1 en los individuos PHI. Porcentaje de PD-1 (A), PD-1<sup>Low</sup> (B) y PD-1<sup>High</sup> (C) tanto en el total de las células T CD8<sup>+</sup> como en la población HIV-específica. Los puntos verdes y blancos denotan los subgrupos PHI<350 y PHI>350, respectivamente. Las líneas horizontales dentro de las cajas muestran el valor de la mediana. Los asteriscos denotan distintos valores de p: \*, p<0,05; \*\*, p<0,01; calculados mediante el test de Mann-Whitney.

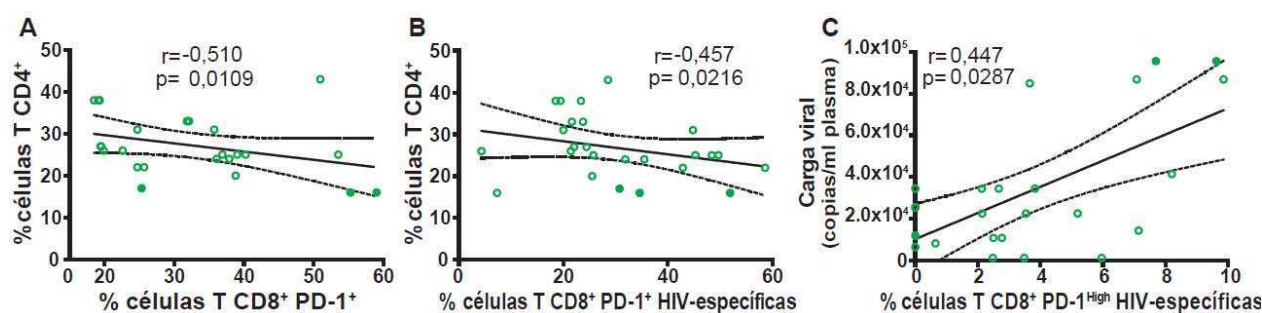
Con el fin de realizar un análisis más profundo de esta población se decidió subdividir los eventos PD-1<sup>+</sup> en PD-1<sup>Low</sup> (*Figura 34B*) y PD-1<sup>High</sup> (*Figura 34C*) en función de la IMF, lo que refleja su nivel de expresión. En su mayoría, las células T CD8<sup>+</sup> PD-1<sup>+</sup> (tanto totales como HIV-específicas) presentaron un fenotipo PD-1<sup>Low</sup> (mediana: 28,2%; [IQ25-75: 20,5-38,3] y 28,2%; [IQ25-75: 20,7-40,0]; respectivamente) y una pequeña proporción mostró un fenotipo PD-1<sup>High</sup> (2,7%; [IQ25-75: 2,0-3,2] y 3,6%; [IQ25-75: 2,2-8,1], respectivamente). Sin embargo, cabe destacar que las células T CD8<sup>+</sup> HIV-específicas difirieron significativamente con respecto a la población total en el subgrupo de células PD-1<sup>High</sup> (p=0,0294, *Figura 34C*). Estos parámetros también fueron evaluados en ambos subgrupos de individuos PHI. Nuevamente el subgrupo PHI<350 presentaba una clara tendencia a una mayor proporción de células, tanto PD-1<sup>Low</sup> como PD-1<sup>High</sup>, en ambos compartimientos (población T CD8<sup>+</sup> total y HIV-específica), comparado con su contraparte, PHI>350 (PD1<sup>Low</sup>:

43,4%; [IQ25-75: 24,1-46,8] versus 26,0%; [IQ25-75: 16,6-33,5] y 40,0%; [IQ25-75: 32,1-46,8] versus 23,5%; [IQ25-75: 18,8-34,8], respectivamente, *Figura 34B*) (PD-1<sup>High</sup>: 2,7%; [IQ25-75: 2,5-4,5] versus 2,4%; [IQ25-75: 1,6-3,3] y 9,4%; [IQ25-75: 3,3-10,7] versus 3,5%; [IQ25-75: 2,1-6,5], respectivamente, *Figura 34C*); siendo significativa esta diferencia únicamente para la población T CD8<sup>+</sup> PD-1<sup>Low</sup> HIV-específica (p=0,0025). Además, se observaron correlaciones positivas entre la proporción de células T CD8<sup>+</sup> totales y la proporción de células T CD8<sup>+</sup> HIV-específica tanto en la subpoblación celular PD-1<sup>+</sup> total (r=0,7008, p<0,0001, *Figura 35A*) así como también para la subpoblación celular PD-1<sup>Low</sup> (r=0,7674, p<0,0001, *Figura 35B*). Sin embargo, no se observó correlación en la subpoblación celular PD-1<sup>High</sup> (r=0,3308, p>0,05; *Figura 35C*). Esto, sumado al resultado descrito en la *Figura 34C* donde las células T CD8<sup>+</sup> HIV-específicas muestran una proporción significativamente mayor de PD-1<sup>High</sup> comparado con las células T CD8<sup>+</sup> totales, indica que la molécula PD-1 es modulada positivamente y de manera preferencial en la población celular T CD8<sup>+</sup> HIV-específica cómo había sido descrito con anterioridad [93-95]. En cuanto al compartimiento HIV-específico, no se observaron diferencias en la expresión de PD-1 en función de las distintas especificidades celulares (es decir, cuando los *pool*es de péptidos Nef, Gag o CEF se utilizaron como estímulo).



**Figura 35:** Correlaciones entre las subpoblaciones T CD8<sup>+</sup> total y HIV-específica en el contexto de la expresión de la molécula PD-1, evaluado en los individuos PHI: (A) porcentaje de células T CD8<sup>+</sup> PD-1<sup>+</sup> versus el porcentaje de células T CD8<sup>+</sup> PD-1<sup>+</sup> HIV-específicas. (B) porcentaje de células T CD8<sup>+</sup> PD-1<sup>Low</sup> versus el porcentaje de células T CD8<sup>+</sup> PD-1<sup>Low</sup> HIV-específicas. (C) porcentaje de células T CD8<sup>+</sup> PD-1<sup>High</sup> versus el porcentaje de células T CD8<sup>+</sup> PD-1<sup>High</sup> HIV-específicas. Los puntos verdes y blancos denotan los subgrupos PHI < 350 y PHI > 350, respectivamente. En el análisis de correlación el valor de *r* y *p* corresponde a la prueba de *Spearman*'s.

Dadas las diferencias observadas entre los subgrupos PHI > 350 y PHI < 350, se decidió evaluar la posibilidad de una relación entre la expresión de PD-1 y los parámetros clínicos en este grupo de estudio. En primer lugar se observó una correlación negativa entre el porcentaje de células T CD8<sup>+</sup> PD-1<sup>+</sup>, tanto en el compartimiento total como HIV-específico, y el porcentaje de células T CD4<sup>+</sup> ( $r = -0,0510$ ,  $p = 0,0109$  y  $r = -0,457$  y  $p = 0,0216$ , respectivamente) (Figura 36A y 36B). En contraste, no se encontró ninguna otra asociación entre la expresión de PD-1 (analizada como el porcentaje de PD-1 o la IMF) en las células T CD8<sup>+</sup> (tanto en el compartimiento total como HIV-específico) y los restantes marcadores de progresión, como ser la CV plasmática, el *set point* viral o los marcadores de activación inmune. Por otro lado, cuando se analizó la proporción celular que expresaban los fenotipos PD-1<sup>Low</sup> y PD-1<sup>High</sup>, se observó una correlación directa entre el porcentaje de células T CD8<sup>+</sup> PD-1<sup>High</sup> y la CV plasmática ( $r = 0,447$ ,  $p = 0,0287$ , Figura 36C). Estos resultados sugieren una relación entre la expresión de PD-1 y una progresión rápida a la enfermedad.

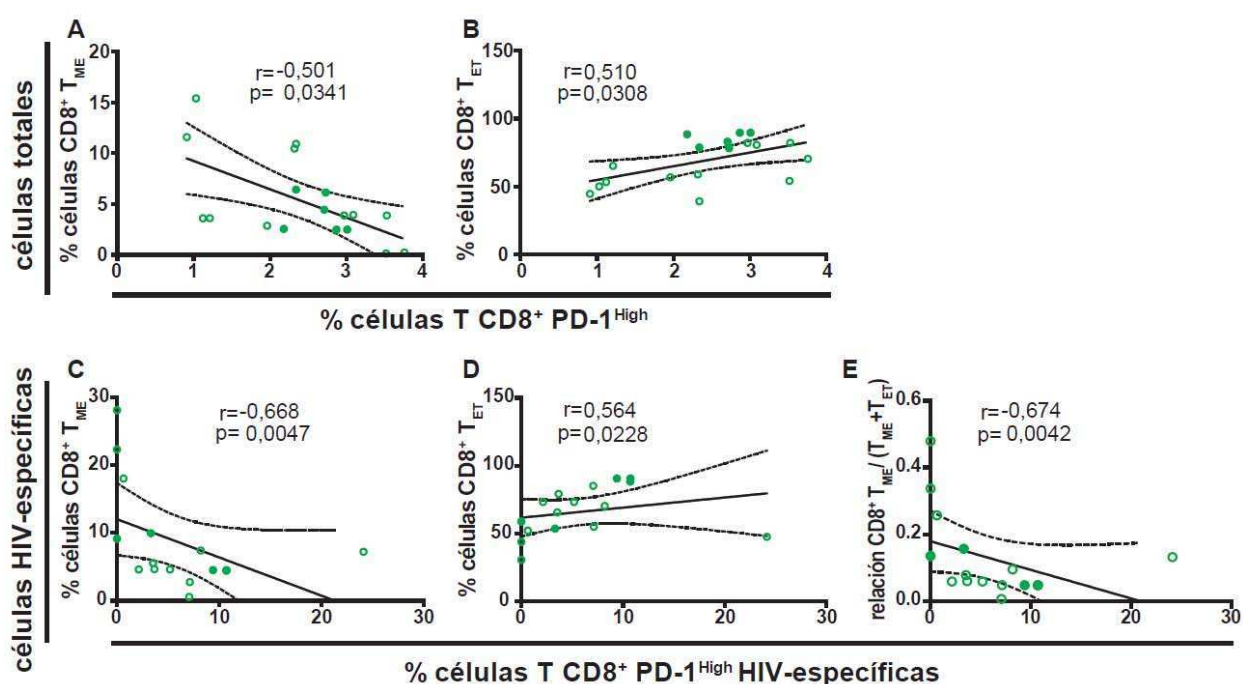


**Figura 36:** Correlaciones entre los parámetros clínicos y la expresión de PD-1 en el compartimiento celular T CD8<sup>+</sup> de los individuos PHI: porcentaje de células T CD4<sup>+</sup> versus el porcentaje de células T CD8<sup>+</sup> PD-1<sup>+</sup> totales (A) o el porcentaje de células T CD8<sup>+</sup> PD-1<sup>+</sup> HIV-específicas (B). CV plasmática versus el porcentaje de células T CD8<sup>+</sup> PD-1<sup>High</sup> HIV-específicas (C). Los puntos verdes y blancos denotan los subgrupos PHI < 350 y PHI > 350, respectivamente. En el análisis de correlación el valor de  $r$  y  $p$  corresponde a la prueba de Spearman's.

#### IV. 8. 2. Asociación entre la expresión de PD-1 y la distribución del fenotipo de memoria en los individuos cursando la infección primaria

Se decidió evaluar las posibles relaciones entre los patrones de expresión de PD-1 y la distribución de las subpoblaciones de memoria, durante la infección primaria. En primer lugar se encontró que el porcentaje de células T CD8<sup>+</sup> PD-1<sup>High</sup>, en ambos compartimientos total y HIV-específico, correlacionó de manera negativa con la proporción de células CD8<sup>+</sup>

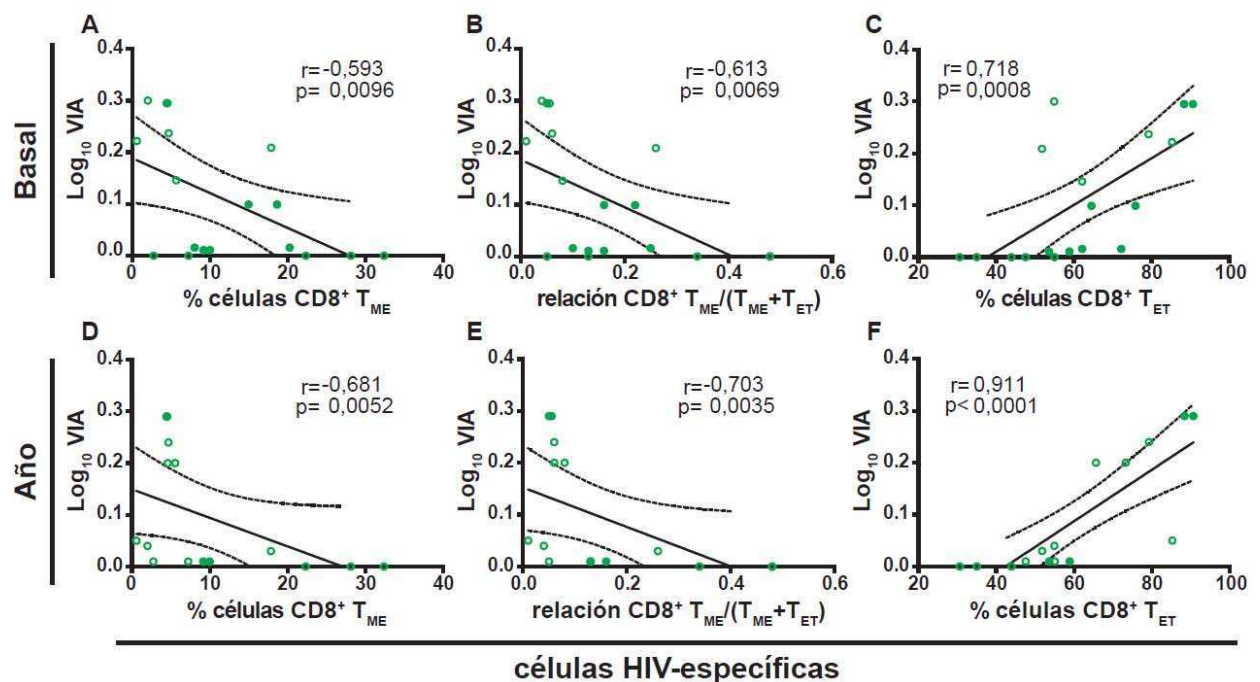
$T_{ME}$ , también en los compartimientos total y HIV-específico ( $r=-0,501$ ,  $p=0,0341$  y  $r=-0,668$ ,  $p=0,0047$ , respectivamente) (Figura 37A y 37C). Por el contrario, se observó una correlación positiva con la proporción de células  $CD8^+ T_{ET}$ , nuevamente en ambos compartimientos total y HIV-específico ( $r=0,510$ ,  $p=0,0308$  y  $r=0,564$ ,  $p=0,0228$ , respectivamente) (Figuras 37B y 37D). Además, la relación entre las células HIV-específicas  $T_{ME}/(T_{ME}+T_{ET})$  correlacionó de manera inversa con la proporción de células T  $CD8^+ PD-1^{High}$  HIV-específicas ( $r=-0,674$ ,  $p=0,0042$ , Figura 37E). Estos resultados se encuentran en concordancia con datos previos que muestran que PD-1 no es solamente un marcador de agotamiento celular si no que su expresión también se encuentra relacionada con los estadios de diferenciación de las células T  $CD8^+$  y el estado de activación de las mismas [96].



**Figura 37:** Correlaciones entre la proporción de la subpoblaciones de memoria evaluado en la muestra basal y la expresión de PD-1 evaluada a los 8 meses post-infección en los individuos PHI: porcentaje de células  $CD8^+ T_{ME}$  (A) o  $T_{ET}$  (B) versus el porcentaje de células T  $CD8^+ PD-1^{High}$  total. Porcentaje de células HIV-específicas  $CD8^+ T_{ME}$  (C),  $T_{ET}$  (D) o la relación  $T_{ME}/(T_{ME}+T_{ET})$  (E) versus el porcentaje de células  $CD8^+ PD-1^{High}$  HIV-específicas. Los puntos verdes y blancos denotan los subgrupos PHI < 350 y PHI > 350, respectivamente. En el análisis de correlación el valor de  $r$  y  $p$  corresponde a la prueba de Spearman's.

#### IV. 9. ANÁLISIS DE LA RELACIÓN ENTRE LA ACTIVIDAD ANTIVIRAL DE LAS CÉLULAS T CD8<sup>+</sup> Y EL PATRÓN DE MEMORIA Y EXPRESION DE PD-1, DURANTE LA INFECCIÓN PRIMARIA

En esta tesis, se mostró que las células T CD8<sup>+</sup> HIV-específicas, durante la infección aguda/temprana, son capaces de mediar actividad antiviral (VIA) y que la magnitud de esta actividad se encuentra asociada con un mayor *set point* inmune (*Figura 18B*). En consecuencia, se decidió analizar la posible relación entre el fenotipo de las células T CD8<sup>+</sup> y la funcionalidad de las mismas en un subgrupo de 11 individuos PHI. En primer lugar, no se encontró una asociación entre el fenotipo de memoria y la capacidad de las células T CD8<sup>+</sup> HIV-específicas de ejercer alguna función en particular (ya sea degranular o secretar citoquinas) así como tampoco con la proporción de células T CD8<sup>+</sup> polifuncionales. Además, no se encontró asociación alguna entre la expresión de PD-1 por parte de las células T CD8<sup>+</sup> y su funcionalidad.



**Figura 38:** Correlaciones entre la capacidad antiviral de las células T CD8<sup>+</sup> de suprimir la replicación viral *ex vivo* (VIA) y el porcentaje basal de las subpoblaciones HIV-específicas: (A) capacidad antiviral evaluada en la muestra basal *versus* el porcentaje de células CD8<sup>+</sup> T<sub>ME</sub> HIV-específicas; (B) la relación CD8<sup>+</sup> T<sub>ME</sub>/(T<sub>ME</sub>+T<sub>ET</sub>); (C) o el porcentaje de células CD8<sup>+</sup> T<sub>ET</sub> HIV-específicas. Capacidad antiviral evaluada al año post-infección *versus* (D) el porcentaje de células CD8<sup>+</sup> T<sub>ME</sub> HIV-específicas; (E) la relación CD8<sup>+</sup> T<sub>ME</sub>/(T<sub>ME</sub>+T<sub>ET</sub>); (F) o el porcentaje de células CD8<sup>+</sup> T<sub>ET</sub> HIV-específicas. Los puntos verdes y blancos denotan los subgrupos PHI < 350 y PHI > 350, respectivamente. En el análisis de correlación el valor de *r* y *p* corresponde a la prueba de *Spearman's*.

Por el contrario, se observó una correlación inversa entre el VIA evaluado en la muestra basal de los individuos PHI y la proporción de células HIV-específicas CD8<sup>+</sup> T<sub>ME</sub> ( $r = -0,593$ ,  $p = 0,0096$ ; *Figura 38A*) y la relación CD8<sup>+</sup> HIV-específica T<sub>ME</sub>/(T<sub>ME</sub>+T<sub>ET</sub>) ( $r = -0,613$ ,  $p = 0,0069$ ; *Figura 38B*). En contraste, se obtuvo una correlación positiva con la proporción de células CD8<sup>+</sup> HIV-específicas T<sub>ET</sub> ( $r = 0,718$ ,  $p = 0,0008$ ; *Figura 38C*). Estos resultados indican que la magnitud de la actividad antiviral de las células T CD8<sup>+</sup> durante la etapa aguda/temprana de la infección se encuentra relacionada con una mayor proporción de células T CD8<sup>+</sup> HIV-específicas con un fenotipo efector terminal, capaces de ejercer rápidamente funciones efectoras. Además, un mayor arresto de la diferenciación de las células T CD8<sup>+</sup> HIV-específicas (evidenciado por una mayor relación T<sub>ME</sub>/(T<sub>ME</sub>+T<sub>ET</sub>)) se traduce en una menor actividad antiviral. Más aún, cuando se analizó el fenotipo de las células T CD8<sup>+</sup> HIV-específicas en la muestra basal y la actividad antiviral a los 12 meses post-infección, se observaron las mismas correlaciones, estadísticamente significativas, (*Figura 38D a 38F*) indicando que la diferenciación temprana del fenotipo celular de la población T CD8<sup>+</sup> también se encuentra relacionado con la función antiviral de las mismas más allá del establecimiento del *set point*.

## **V. DISCUSIÓN**

Se ha puesto especial énfasis, a lo largo de los últimos años, en el estudio de la respuesta T CD8<sup>+</sup> ya que ha sido demostrado, tanto en modelos de primates como en infecciones naturales en humanos, el rol crítico que juega en el control del HIV [97, 98]. Esto es aún más evidente durante los primeros estadios de la infección, donde el surgimiento de las células T CD8<sup>+</sup> HIV-específicas está asociado con el descenso del pico de viremia [99], característico de la infección aguda. Por esta razón, se han realizado enormes esfuerzos en tratar de comprender qué funciones en particular y/o qué fenotipo celular, dentro de la población total de células T CD8<sup>+</sup>, son las que mejor se asocian al control de la replicación viral [98]. Además, esta información sería fundamental para lograr definir los correlatos inmunes de protección, así como también para poder evaluar posibles candidatos vacunales. En este sentido, es esencial el estudio de cohortes que aborden la caracterización de la respuesta T CD8<sup>+</sup> durante la infección aguda en busca de potenciales marcadores asociados con progresión a la enfermedad. Hasta la fecha, la mayoría de los estudios provienen de cohortes de América del Norte, Europeas o Africanas, pero existe muy poca información proveniente de regiones como América del Sur, en donde se necesitan estudios a nivel local para poder comprender las características particulares de la infección en esta región. Cabe resaltar, que las cohortes en estudio deben estar bien definidas bajo estrictos criterios de inclusión, poseer un tamaño muestral acorde y presentar una potencia significativa para que los datos que surjan del análisis sean concluyentes.

En este contexto, el objetivo de este trabajo fue estudiar múltiples aspectos funcionales y fenotípicos de la respuesta T CD8<sup>+</sup> HIV-específica durante la infección aguda/temprana en un grupo de individuos pertenecientes a una cohorte Argentina de seroconvertidores, y comparar los resultados con los grupos de control compuestos por sujetos Crónicos y *Elite Controllers*. Esta cohorte ha sido previamente analizada en cuanto a sus características clínicas y epidemiológicas [63]. Por consiguiente, con el objetivo de delinear las características de la respuesta T CD8<sup>+</sup> que mejor se asocien con progresión a la enfermedad en esta cohorte de individuos infectados, hemos encontrado que: (i) existen diferencias en cuanto a los blancos virales inmunodominantes de la respuesta HIV-específica temprana



entre individuos con distintas tasas de progresión a la enfermedad (en términos de pérdida del número de células T CD4<sup>+</sup>) durante el primer año de infección (*Figura 14 y 15*); (ii) se detectaron células T CD8<sup>+</sup> HIV-específicas polifuncionales durante la infección aguda, pero su frecuencia no se asoció con el control viral o con protección (*Figura 19*); (iii) la distribución del fenotipo de las poblaciones T CD8<sup>+</sup> de memoria se encuentra alterada en la infección primaria, además un panel de memoria menos diferenciado (células T<sub>Naive</sub> y T<sub>Naive-Like</sub>) se correlacionó con una progresión típica a la enfermedad, mientras que un panel con una mayor diferenciación (células T<sub>ME</sub> y el balance T<sub>ME</sub>/(T<sub>ME</sub>+T<sub>ET</sub>)) se asoció con una progresión rápida a la enfermedad (*Figura 26-32*); (iv) una mayor expresión del marcador de agotamiento celular PD-1 se asoció con un perfil de memoria con mayor diferenciación y se relacionó con una progresión rápida (*Figura 34-36*); (v) las células T CD8<sup>+</sup> capaces de mediar supresión viral *in vitro* también fueron detectadas durante la infección aguda/temprana (*Figura 17*) y por último (vi) una mayor capacidad de mediar supresión viral durante la infección aguda/temprana se asoció con un mayor *set point* inmune; se relacionó con la inmunodominancia de la respuesta anti Gag; una mayor capacidad de degranular y secretar IFN- $\gamma$  y correlacionó con un panel de memoria con una mayor diferenciación hacia un fenotipo terminal (*Figura 17, 18, 23 y 38*). La mayor contribución de este trabajo yace en la correlación observada entre las propiedades funcionales y fenotípicas de las células T CD8<sup>+</sup> HIV-específicas durante la infección aguda/temprana y el desenlace clínico al año post-infección. Por otro lado, este es el primer reporte, donde se realizó una caracterización inmunológica de la respuesta T CD8<sup>+</sup> en una cohorte de individuos, cursando la infección aguda/temprana, proveniente de Sud América.

## **BLANCOS ANTIGÉNICOS Y MAGNITUD DE LA RESPUESTA**

Las proteínas virales que son blanco de la respuesta celular específica han sido estudiadas y descritas, tanto en la infección aguda/temprana como en la fase crónica de la infección por HIV, hallándose claras diferencias entre ellas. Mientras que en estadios tempranos de la infección, las células con especificidad por Nef dominan la respuesta [67, 100], con el

transcurso del tiempo, la respuesta se amplía hacia otros epítopes virales de otras proteínas como Gag, Env y Vpr [54, 56, 74, 101, 102]. Muchos de estos estudios han reportado que la respuesta celular específica anti-Gag está asociada a una baja viremia en la etapa crónica de la infección [56, 74, 97, 103]. Otros reportes indican que Gag es un blanco inmunodominante en EC [76, 104], tanto en sangre como en tejido linfoide asociado a mucosa [105], apoyando la hipótesis del importante rol que presentan las células Gag-específicas en la restricción de la replicación viral. Algunas hipótesis sobre los posibles mecanismos que explicarían la habilidad que poseen las células Gag-específicas de controlar la replicación viral incluyen la capacidad de eliminar células recientemente infectadas (incluso antes de la integración del genoma viral al genoma del huésped) [106, 107], las limitaciones que presenta Gag para evadir la presión inmune [108, 109], y la alta capacidad de mediar actividad antiviral, la cual se discutirá en el siguiente párrafo. En concordancia con estos hallazgos, en este trabajo se observó que las células con especificidad frente a Gag (en particular las células p24-específicas) dominan la respuesta en EC, tanto en términos de magnitud como en jerarquía (*Figura 14A y 14B*). Por el contrario, las células Nef-específicas dominan la respuesta en los individuos cursando la infección aguda (PHI). Sin embargo, cuando este grupo se dividió en los subgrupos PHI > 350 y PHI < 350, se observó que las células Nef-específicas dominaban claramente la respuesta anti-HIV en el grupo que presenta una progresión rápida (PHI < 350) (*Figura 14A-C*). Además, en los sujetos PHI se observó una correlación directa, estadísticamente significativa, entre la inmunodominancia de la respuesta basal anti-Gag y el recuento basal de células T CD4<sup>+</sup> y el *set point* inmune. Por el contrario, se observó una correlación inversa entre el porcentaje basal de Gag y el logaritmo del *set point* viral (*Figura 16*). En concordancia con nuestros resultados, otros autores han descrito correlaciones directas entre la magnitud de la respuesta T CD8<sup>+</sup> Nef-específica y la CV en una cohorte de individuos recientemente infectados con variantes virales de subtipo C [110]. Un trabajo publicado recientemente por *Riou* y colaboradores [111] caracterizó la respuesta T CD8<sup>+</sup> HIV-específica, en individuos cursando la infección aguda, analizando el impacto que tiene la magnitud, así como también

la polifuncionalidad y la especificidad de la respuesta sobre el establecimiento del *set point* viral. En línea con nuestras observaciones, este trabajo muestra que el efecto de la magnitud de la respuesta HIV-específica en el control de la replicación viral es dependiente de la especificidad de la proteína viral que se tenga como blanco. A su vez, evidenciaron que una mayor frecuencia de respuesta anti-Gag se asociaba con un menor *set point* viral. En conjunto, los resultados de la presente tesis, junto con la bibliografía reciente, argumentan en favor de que una mayor inmunodominancia de Gag de manera temprana contribuye a una menor tasa de progresión a la enfermedad.

### **CAPACIDAD DE SUPRESIÓN VIRAL (VIA)**

La habilidad de las células T CD8<sup>+</sup> de eliminar células infectadas depende de múltiples factores y puede ocurrir por distintos mecanismos como ser a través de mediadores solubles, o por contacto célula-célula. La evaluación de la capacidad inhibitoria *ex vivo* (VIA) provee una medición global del potencial antiviral de las células T CD8<sup>+</sup> [68]. Reportes previos, han utilizado este ensayo para evaluar el VIA que llevan a cabo las células T CD8<sup>+</sup> obtenidas de muestras de EC, controladores virémicos, individuos crónicos con y sin tratamiento [76-80, 112, 113], así como también individuos y simios vacunados [78, 114]. Estos estudios, demostraron que el VIA correlaciona con la magnitud de la respuesta T CD8<sup>+</sup> Gag-específica [76, 80], que la expresión de alelos HLA-I "protectivos" no es una condición necesaria para que las células T CD8<sup>+</sup> medien VIA [78, 80], y que un mayor VIA se encuentra asociado con altas frecuencias de células T CD8<sup>+</sup> HIV-específicas con capacidad de degranulación (evaluado por la expresión de CD107 A/B) y usualmente acompañada por otras funciones antivirales como la secreción de IFN- $\gamma$  y MIP-1 $\beta$  [78, 80, 112, 114]. En el presente trabajo se encontró que las células T CD8<sup>+</sup> provenientes de EC median VIA con una mayor magnitud y amplitud en comparación con aquellas células provenientes de sujetos Crónicos (*Figura 17*). Además, hemos demostrado que las células T CD8<sup>+</sup> capaces de mediar VIA pueden ser detectadas en individuos cursando la infección aguda/temprana, incluso a tiempos muy tempranos post-infección (con una magnitud

menor en comparación con el grupo de EC), y que esta actividad antiviral persiste en el tiempo (*Figura 17*). Al día de hoy existen únicamente dos reportes en los que se estudió la capacidad de las células T CD8<sup>+</sup> de mediar VIA en individuos cursando la infección aguda/temprana [88, 115]. Ambos reportes presentan resultados contrapuestos. Por un lado, en el trabajo de *Lecuroux* y colaboradores [115], concluyen que a pesar de presentar una alta frecuencia de células HIV-específicas polifuncionales, los individuos cursando la infección primaria no muestran una gran capacidad de mediar VIA, comparado con el fuerte VIA que sí presentan los EC, concluyendo que el hallazgo observado previamente en EC no sería una característica de la respuesta HIV-específica durante la infección primaria. Por el contrario, *Freel* y colaboradores [88], observaron que los individuos cursando la infección primaria poseen una gran capacidad de mediar VIA. Además, demostraron que la magnitud del VIA correlaciona con el porcentaje de células T CD8<sup>+</sup> HIV-específicas que expresan CD107A, MIP1- $\beta$  e IFN- $\gamma$  y con la secreción de MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , IP-10 e IL-1 $\alpha$ , luego de la estimulación con péptidos. Nuestros resultados apoyan las observaciones de este último reporte ya que hemos demostrado que las células T CD8<sup>+</sup> capaces de mediar VIA pueden ser detectadas en individuos cursando la infección aguda/temprana, incluso a tiempos muy tempranos post-infección. Más aún, nuestro trabajo aporta más datos sobre el rol que poseen las células T CD8<sup>+</sup> que median VIA durante la infección aguda/temprana ya que pudimos establecer que las células T CD8<sup>+</sup>, provenientes de individuos PHI, que presentan una respuesta Gag-específica inmunodominante a tiempos tempranos post-infección, poseían una mayor capacidad de mediar VIA, en comparación con los individuos donde la respuesta estaba preferentemente dirigida contra Nef (*Figura 17*). Además, en el grupo PHI se observó una correlación directa, estadísticamente significativa, entre la capacidad de las células T CD8<sup>+</sup> de mediar VIA y la magnitud de la respuesta celular Gag-específica (*Figura 17*). Este resultado concuerda con lo observado en EC y sujetos Crónicos con una amplia respuesta anti-Gag [76, 80], y podría proveer una explicación adicional para el rol que presentan las células T CD8<sup>+</sup> Gag-específicas en el control de la replicación viral y en el delineamiento de la progresión. Aunque *Freel et al.* [88] encontraron que las células T

CD8<sup>+</sup> Nef-específicas pueden mediar VIA de la misma manera que las Gag-específicas en individuos recientemente infectados, estos autores no estudiaron las asociaciones que existen entre esta actividad antiviral y los parámetros clínicos, como es el caso de los resultados presentados en esta tesis. Además, es importante destacar, que ambos estudios difieren en la definición de la especificidad de las células T CD8<sup>+</sup> que median VIA, lo que podría explicar la diferencia en los resultados obtenidos.

En cuanto a la funcionalidad de las células T CD8<sup>+</sup> que median VIA, hemos encontrado que aquellos sujetos PHI que mostraron un VIA más robusto (es decir >25%) presentaban una alta frecuencia de células T CD8<sup>+</sup> HIV-específicas CD107A/B<sup>+</sup>/IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> (valores incluso comparables con los EC) en comparación con aquellos individuos que presentaban un VIA más débil (<25%). Más aún, en el grupo PHI se halló una correlación directa, estadísticamente significativa, entre las células T CD8<sup>+</sup> con capacidad de mediar VIA y el porcentaje de células T CD8<sup>+</sup> HIV-específicas CD107A/B<sup>+</sup>/IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> (*Figura 21*). En cuanto a la expresión de CD107A/B, este resultado está en concordancia con datos previos obtenidos en EC, Crónicos, sujetos cursando la infección aguda y simios vacunados [62, 88, 114]. Sin embargo, según nuestros datos es necesaria la expresión simultánea de ambos marcadores (CD107A/B e IFN- $\gamma$ ) para mantener esta asociación. Otros grupos de investigación reportaron que la secreción de MIP-1 $\beta$  también se encuentra asociada con la capacidad de las células T CD8<sup>+</sup> de mediar VIA tanto en la infección aguda como en la etapa crónica [78, 88]. Debido a limitaciones técnicas, en este trabajo no se pudo incluir la evaluación de esta citoquina en el análisis de citometría. Sin embargo, presumimos que una asociación similar podría hallarse debido a la gran contribución de MIP-1 $\beta$  a la respuesta total durante la infección aguda/temprana y a la alta tasa de co-expresión de CD107A/B e IFN- $\gamma$  [67, 85].

Por último, como había sido reportado anteriormente para la infección crónica [80], no se encontró asociación entre la magnitud del VIA y la CV plasmática, en el grupo PHI. Sin embargo, se observó una correlación inversa entre la capacidad de las células T CD8<sup>+</sup> de mediar VIA y la activación inmune de las mismas (*Figura 18*). También se observó una

asociación directa entre la capacidad que poseen las células T CD8<sup>+</sup> de mediar VIA y el *set point* inmune (*Figura 18*). Estos resultados, junto con la mayor capacidad de mediar VIA observada previamente en EC, (tanto en nuestro estudio como en otros mencionados previamente) y los resultados obtenidos en monos *resus* vacunados donde un mayor VIA se relacionó con un incremento del control viral [114], claramente indican que la generación de las células T CD8<sup>+</sup> capaces de mediar VIA es una característica importante a tener en cuenta para ser incorporada en futuras intervenciones profilácticas o terapéuticas con el objetivo de retrasar la progresión a la enfermedad.

### **POLIFUNCIONALIDAD CELULAR**

Reportes previos que comparan la capacidad de las células T CD8<sup>+</sup> de degranular o secretar múltiples mediadores solubles luego de ser estimuladas, en individuos progresores *versus* LTNP, sugieren que la polifuncionalidad de las células T CD8<sup>+</sup> sería un correlato funcional del control viral [47, 86, 104, 111, 116]. Sin embargo, de estos estudios también surge el interrogante de si la polifuncionalidad no sería la causa del control viral sino la consecuencia del mismo. De la presente tesis surgieron resultados que argumentan a favor de esta última hipótesis. Las células T CD8<sup>+</sup> HIV-específicas polifuncionales fueron detectadas a tiempos muy tempranos post-infección en el grupo PHI (en consonancia con nuestras observaciones previas [67]). Además, la proporción de estas células se incrementó ligeramente a medida que transcurría la infección hasta la muestra tomada a los 12 meses post-infección (*Figura 19*) (como también reportó Ferrari et al. [85]). Los EC presentaron una mayor proporción de células bifuncionales y trifuncionales comparado con los individuos Crónicos (lo cual era esperable, basado en reportes previos [47, 104, 116]) y con el grupo PHI. Sin embargo cuando se dividió al grupo PHI en progresores (PHI < 350) y no progresores (PHI > 350) no se observaron diferencias significativas entre ambos subgrupos. Estos resultados arrojan aún más luz al concepto que, en vez de ser un marcador de función antiviral, la polifuncionalidad de las células T CD8<sup>+</sup> estaría directamente afectada por la persistencia viral. En otras palabras, la disminución de las células T CD8<sup>+</sup> polifuncionales en individuos crónicamente infectados, sería la consecuencia de la constante estimulación antigénica durante la

infección crónica, que en última instancia conduciría al agotamiento celular y deterioro funcional, como ha sido postulado previamente [85, 117]. Además, existe una correlación entre la polifuncionalidad de las células T CD8<sup>+</sup> y la clínica observada en los individuos reclutados. Los perfiles de polifuncionalidad fueron similares en individuos PHI, con distintos patrones de inmunodominancia (Anti-Gag versus anti-Nef), indicando que la polifuncionalidad no estaría relacionada con la especificidad de la respuesta (*Figura 20*). Por otro lado, hemos demostrado que de todas las posibles combinaciones de funciones de la población T CD8<sup>+</sup>, solo la frecuencia de células T CD8<sup>+</sup> bifuncionales CD107A/B<sup>+</sup>/IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> correlaciona con la capacidad de las células de mediar VIA (*Figura 21*), indicando que no todas las funciones que lleva a cabo una célula polifuncional serían igual de relevantes al momento de mediar funciones efectoras antivirales.

El desencadenamiento de las funciones efectoras se produce luego del encuentro de las células T CD8<sup>+</sup> con el antígeno. La potencia de la respuesta, luego de este evento, depende de cuan fuerte sea el estímulo, el cual a su vez puede estar directamente afectado por el nivel de sensibilidad antigénica o la avidéz celular [57, 118]. Estos parámetros, pueden ser analizados de manera indirecta en el ensayo de ELISPOT de IFN- $\gamma$  [75], mediante el análisis del tamaño de *spot* o evaluando la IMFr de una función dada, por citometría de flujo [57]. En el presente trabajo, el análisis de la media del tamaño de *spot* y la IMFr de IFN- $\gamma$  mostraron resultados comparables. Se observó, en todos los grupos analizados, que la intensidad de la respuesta de las células CEF-específicas fue mayor comparado con las HIV-específicas. Esto indicaría que, las células HIV-específicas presentan una menor calidad en la respuesta, en comparación con su contraparte. Llamativamente esta diferencia fue significativa en todos los grupos excepto en los EC (*Figura 15F* y *Figura 24*). La población celular CEF-específica fue analizada como control dado que es una población celular que tiene como blanco a patógenos que causan tanto infecciones agudas, como es el caso de influenza, así como también infecciones crónicas controladas como son CMV y *Epstein-Bar*. En consecuencia el análisis de la población CEF-específica provee información que se encuentra asociada con el control viral. Además, la población de células T CD8<sup>+</sup> de los

individuos PHI mostró el menor tamaño de *spot*, comparados con los EC y los Crónicos, es decir la respuesta con menor calidad (*Figura 15F*). Estos resultados, de nuevo sugieren que la constante estimulación antigénica por parte del virus conduciría al agotamiento celular, inclusive de manera temprana. En cuanto a la expresión de CD107A/B<sup>+</sup>, se encontró, en los tres grupos analizados, que la IMFr de las células T CD8<sup>+</sup> Gag-específicas era mayor comparado con las Nef-específicas y similar a los niveles observados en la población CEF-específica (*Figura 24*). La relación existente entre la magnitud de CD107A/B<sup>+</sup> (evaluada en este tesis por citometría de flujo), la sensibilidad al antígeno y la actividad antiviral que ya había sido establecida en trabajos previos [57], avalan la asociación (descrita previamente en esta tesis) que hemos encontrado entre la fuerte habilidad de las células T CD8<sup>+</sup> Gag-específicas de degranular y la gran capacidad que poseen de mediar VIA.

## HAPLOTIPO HLA

Se encuentra bien documentado que la expresión de ciertos alelos está relacionados con el control del virus. Algunos de estos reportes provienen de análisis realizados en cohortes de individuos EC y LTNP donde ciertos alelos se encontraban representados con mayor frecuencia [73, 119]. Otros estudios mostraron que la población celular T CD8<sup>+</sup>, proveniente de individuos con estos "alelos protectivos", poseen particularidades en cuanto a su especificidad, capacidad de proliferación, polifuncionalidad, presentación antigénica, presión inmune, entre otros factores [73, 120-126], lo cual podría asociarse con su capacidad protectora. Sin embargo, también se ha demostrado que estos "alelos protectivos" presentan diferencias cualitativas en individuos controladores comparado con individuos que progresan a la enfermedad a pesar de expresar estos alelos [126], indicando que la sola expresión de un alelo no es suficiente para ejercer control sobre el virus sino que una combinación de las funciones celulares así como también del fenotipo deben coexistir con el fin de poder ejercer cierto control en la replicación viral. Por otro lado, algunos individuos alcanzan el estatus de EC en ausencia de estos "alelos protectivos" (como puede observarse en nuestra cohorte), lo cual indicaría que la presencia de dichos alelos no sería un requisito



indispensable para el control del virus. A modo de ejemplo, *Freel* y colaboradores observaron células T CD8<sup>+</sup> con capacidad de mediar VIA tanto en presencia como en ausencia de "alelos protectivos" [78, 80]. A pesar de que en esta tesis se analizaron múltiples funciones como son: la magnitud, la amplitud, los blancos inmunodominantes, la polifuncionalidad, el VIA y el fenotipo celular; en un subgrupo de individuos a los cuales se les había tipificado el HLA y de los cuales se conocía el estadio de la enfermedad en el que se encontraban; no pudimos establecer una asociación entre estas funciones celulares, el fenotipo de las mismas y la progresión a la enfermedad de los individuos analizados; probablemente debido a la heterogenicidad que presentaban los alelos y al tamaño muestral de nuestra cohorte en el que se analizaron estos parámetros. En consecuencia, sería necesario llevar a cabo un nuevo análisis con el objetivo de elaborar un modelo que incluya todos estos factores (haplotipo HLA, funcionalidad y fenotipo celular y progresión clínica) en una cohorte con un tamaño muestral apropiado.

### **FACTORES SOLUBLES**

Los múltiples factores solubles que se secretan luego de la infección por HIV/SIV han sido ampliamente estudiados con el fin de develar los eventos tempranos que ocurren en la infección y de esta manera poder comprender como esto eventos gatillan con el tiempo el curso de la enfermedad. Además, los niveles plasmáticos de las distintas citoquinas y/o quemoquinas presentes durante la infección aguda han sido propuestos como potenciales biomarcadores capaces de predecir a futuro la tasa de progresión a la enfermedad [82-84, 127]. Sin embargo, aún no se conoce si existe una relación clara entre los factores solubles y la respuesta celular T CD8<sup>+</sup> HIV-específica. En esta tesis se encontró una correlación positiva entre la inmunodominancia de la respuesta anti-Gag y los niveles plasmáticos de IL-2 y MIP-1 $\beta$  (*Figura 25*). Como se mencionó con anterioridad, estas moléculas son secretadas por los linfocitos T CD8<sup>+</sup> luego de la estimulación de los mismos. El porcentaje de células T CD8<sup>+</sup> que expresan IL-2 y MIP-1 $\beta$ , tanto de manera individual como en combinación con otras funciones, fue previamente asociado con control viral [54, 74, 104,

110, 115, 128]. La IL-2 es una molécula que cumple un rol fundamental en la homeostasis celular y en la activación del sistema inmune [127]. Hasta la fecha, el análisis de los niveles de IL-2 presentes en plasma, durante la infección aguda/temprana, no ha sido asociado con la progresión a SIDA. Sin embargo el descenso de los niveles plasmáticos de otras moléculas, como son la IL-15 y la IL-12, que también participan en la homeostasis y el fenotipo celular respectivamente, sí ha sido asociado con progresión en un estudio llevado a cabo en una cohorte de mujeres africanas crónicamente infectadas [83]. Por otro lado, estudios previos han establecido que las células T CD8<sup>+</sup> productoras de MIP-1 $\beta$  representan una proporción elevada dentro de la respuesta T CD8<sup>+</sup> HIV-específica durante la infección aguda y que esta población ejerce una considerable presión inmune sobre la replicación viral [85]. Algunos autores proponen que, luego de la estimulación antigénica, la población de células T CD8<sup>+</sup> HIV-específicas producen rápidamente MIP-1 $\beta$  [57], lo que sugiere una elevada actividad de esta subpoblación celular en comparación con otras células T CD8<sup>+</sup> que secretan otros factores. Más aún, otro estudio reportó una asociación entre los niveles plasmáticos de MIP-1 $\beta$  y una menor CV plasmática y un mayor recuento de células T CD4<sup>+</sup> durante la infección crónica [83]. Estas evidencias proveen, de manera conjunta, una posible justificación para la relación existente entre el rol protector de la respuesta inmunodominante anti-Gag y los niveles plasmáticos de IL-2 y MIP-1 $\beta$  que hemos observado en esta tesis. Como ha sido mencionado anteriormente, estos resultados están en concordancia con trabajos que indican que la inmunodominancia de la respuesta anti-Gag, que se evidencia de manera temprana durante el transcurso de la infección, estaría de algún modo relacionada a la generación de una respuesta antiviral efectiva que luego conduciría a una progresión lenta a la enfermedad. Sin embargo aún se necesitan nuevos análisis que determinen la naturaleza de esta relación.

### **PERFIL INMUNOFENOTÍPICO**

Hasta la actualidad, el análisis de la distribución de las subpoblaciones celulares T CD8<sup>+</sup> de memoria durante la infección por HIV ha sido estudiado por diversos grupos de

investigación. Cada grupo utiliza distintas combinaciones y número de marcadores para definir las poblaciones, por lo que la comparación e interpretación de los resultados entre los distintos trabajos resulta ser una tarea ardua. En líneas generales, la mayoría de los reportes hasta el momento indican que, con el transcurso de la infección por HIV, la población de células T CD8<sup>+</sup> tiende a perder la capacidad de diferenciación hacia un fenotipo terminal.

Este fenómeno fue descrito por primera vez como un bloqueo en la diferenciación terminal del compartimento celular HIV-específico, durante la infección crónica [93] que posteriormente se confirmó en otros estadios como por ejemplo en la infección aguda [39, 94, 129]. Además, diversos reportes han establecido una asociación entre el patrón de diferenciación de las células T CD8<sup>+</sup> HIV-específicas y la progresión a la enfermedad [130-132]. Más aún, la diferenciación de la población total de células T CD8<sup>+</sup> también se encuentra sesgada en la infección por HIV y se relaciona con progresión [39, 53, 89, 130, 133]. En este contexto, nuestros resultados proveen aún más datos en este campo de estudio. En primer lugar, nuestras observaciones indican que la población total de células T CD8<sup>+</sup> presenta una distribución anormal en el grupo de individuos Crónicos (comparado con DS) pero este patrón no se evidenció en los grupos PHI y EC (*Figura 26B*). Esta observación se encuentra en concordancia con resultados que fueron reportados previamente por otros grupos [89, 130]. De manera similar, la distribución de las células T CD8<sup>+</sup>, en el compartimento HIV-específico, se ve severamente comprometido en el grupo de individuos Crónicos pero no así en el grupo PHI (*Figura 26C*). El hecho de que, de manera temprana, la distribución de las subpoblaciones en el grupo PHI se encuentre conservada, indicaría que la instauración del tratamiento de manera temprana, beneficiaría a los individuos infectados tanto virológica como inmunológicamente. Además, el inicio temprano de HAART limita la formación de reservorios, en particular en las células T de memoria central [134, 135]. Sin embargo ha sido reportado que, luego de iniciado HAART, la distribución de la población celular T CD8<sup>+</sup> no vuelve a alcanzar los niveles normales [133, 136, 137]. En conjunto con estas observaciones, nuestro resultado apoya el inicio temprano de la terapia HAART, en

función de poder prevenir el deterioro irreversible de los mecanismos que se encuentran involucrados en la homeostasis celular.

Llamativamente, se observó que la jerarquía de las poblaciones de memoria de ambos compartimientos, es decir tanto las células T CD8<sup>+</sup> totales como HIV-específicas, no difirieron de manera significativa, en ninguno de los grupos de estudio. Esta observación sugeriría que los sucesos que desencadenan y llevan adelante la diferenciación de las células T CD8<sup>+</sup> estarían afectando a los dos compartimientos de manera equitativa. Además, los patrones de diferenciación observados no difirieron en función de si la respuesta estaba dirigida contra Gag o Nef, como había sido reportado previamente [62, 132]. Por el contrario, *Meyer-Olson* y colaboradores [129] describió recientemente que la maduración de células T CD8<sup>+</sup> HIV-específicas (que responden a cada epítotope) en los distintos fenotipos de memoria o en células efectoras es un proceso TCR-dependiente. Esta discrepancia con nuestros resultados podría deberse al uso de *pools* de péptidos como estímulo en lugar de péptidos individuales, lo cual podría estar enmascarando las diferencias reportadas por *Meyer-Olson et. al.*

Como se mencionó anteriormente, la infección por HIV está caracterizada por la acumulación de células T CD8<sup>+</sup> HIV-específicas que presentan fenotipo de memoria efectora (CD45RO<sup>+</sup>/CCR7<sup>-</sup> o T<sub>ME</sub>, manera en que ha sido definida esta subpoblación en este trabajo) y por una disminución relativa en la frecuencia de células T CD8<sup>+</sup> HIV-específicas completamente diferenciadas, es decir con fenotipo efector terminal, (CD45RO<sup>-</sup>/CCR7<sup>-</sup> o T<sub>ET</sub>). El análisis inter-grupo llevado a cabo en la presente tesis apoya esta observación ya que el grupo de individuos Crónicos poseen una proporción significativamente mayor de células CD8<sup>+</sup> T<sub>ME</sub> HIV-específicas y una proporción menor de células CD8<sup>+</sup> T<sub>ET</sub> HIV-específicas, comparado con los grupos PHI y EC. Más aún, el grupo de Crónicos presentó una mayor relación T<sub>ME</sub>/(T<sub>ME</sub>+T<sub>ET</sub>) (*Figura 27A*). Esto refleja una acumulación de células CD8<sup>+</sup> T<sub>ME</sub> sobre las células CD8<sup>+</sup> T<sub>ET</sub> lo cual no se observó en el grupo de EC o PHI. El mismo resultado pudo deducirse a través del análisis de correlación entre la proporción de células

CD8<sup>+</sup> T<sub>ME</sub> y T<sub>ET</sub> en todos los grupos, donde se observaron correlaciones inversas, estadísticamente significativas, en el grupo PHI (como había sido reportado por [131]) y en los EC, pero no se evidenció en el grupo de sujetos Crónicos (*Figura 27B-D*). Cabe resaltar que, el análisis de correlación realizado en el grupo PHI indicó que la relación  $T_{ME}/(T_{ME}+T_{ET})$  de las células T CD8<sup>+</sup> HIV-específicas evaluadas en la muestra basal correlacionó inversamente con el recuento de células T CD4<sup>+</sup> basales y el *set point* inmune (*Figura 30D y E*) y directamente con marcadores solubles (*Figura 33A-C*) y marcadores celulares de activación inmune (*Figura 32B*). Estos resultados, junto a datos reportados previamente en otras cohortes [130, 131], indican claramente que el deterioro temprano en las vías de diferenciación de las células T CD8<sup>+</sup> se asocia con una mayor progresión a la enfermedad, incluso en tiempos muy tempranos post-infección. Además, el porcentaje de células CD8<sup>+</sup> HIV-específicas *T<sub>Naive-Like</sub>* correlacionó directamente con el porcentaje de células T CD4<sup>+</sup> basal (*Figura 30A*) e inversamente con la CV plasmática y el *set point* viral (*Figura 31A y B*). Cabe recordar que debido a limitaciones técnicas, las células CD8<sup>+</sup> HIV-específicas *T<sub>Naive-Like</sub>* observadas en esta tesis estarían incluyendo a una subpoblación de células de memoria temprana, denominadas células *stem* de memoria (*stem-cell memory T-cells*). Las células *stem* de memoria, población celular que ha sido identificada recientemente [90], poseen la habilidad de generar todas las subpoblaciones de memoria (como por ejemplo las células CD8<sup>+</sup> T<sub>MC</sub> o T<sub>ME</sub>) por lo que juegan un rol importante en la homeostasis inmune. Un reporte reciente sugiere que una mayor frecuencia de células T CD8<sup>+</sup> *stem* de memoria estaría asociado con control viral y representaría un posible correlato de protección a la enfermedad [138]. Nuestras observaciones argumentan en favor de este reporte. Además, los autores sugieren que la instauración de la terapia HAART en sujetos Crónicos se asocia con la recuperación de esta población celular lo que podría explicar en parte el beneficio que supone el tratamiento en cuanto a la recuperación de las funciones inmunes.

Por lo tanto, los resultados expuestos en esta tesis, junto a otros reportes [130, 136, 139], sugieren una relación directa entre el desbalance en la maduración del compartimiento celular T CD8<sup>+</sup> y la activación inmune generalizada que se observa en los sujetos infectados.

Sin embargo, los posibles mecanismos responsables de ser la causa o la consecuencia de esta observación no han sido totalmente develados aún. Un trabajo reciente llevado a cabo en EC [104] sugiere que, en este grupo de individuos en particular, el mantenimiento de un panel de células T CD4<sup>+</sup> de memoria con un fenotipo menos diferenciado, provee la cooperación T necesaria para una maduración óptima de la respuesta T CD8<sup>+</sup> efectiva. En otras palabras, las células T CD8<sup>+</sup> de memoria que presentan un fenotipo sesgado podrían ser el resultado de una colaboración inapropiada por parte de los linfocitos T CD4<sup>+</sup>. Dentro del contexto de la infección primaria, aun es necesario llevar a cabo nuevas investigaciones para poder dilucidar el impacto que tiene la diferenciación de la población celular T CD4<sup>+</sup> de memoria sobre su contraparte T CD8<sup>+</sup>, y cómo esto modula la progresión a la enfermedad.

### **EXPRESIÓN DE PD-1**

La expresión de la molécula de PD-1 en las células T CD8<sup>+</sup> HIV-específicas ha sido siempre asociada con un estado de agotamiento celular en el contexto de las infecciones virales persistentes, entre ellas la infección por HIV [93, 140-142]. Sin embargo, la información que se tiene al respecto, en el contexto de la infección aguda, es más escasa [94, 130, 133, 143]. En esta tesis, se evaluó la expresión de PD-1 en el compartimiento celular T CD8<sup>+</sup>, tanto total como HIV-específico, a los 8 meses post-infección. Además, con el objetivo de profundizar en las características fenotípicas de las células T CD8<sup>+</sup> durante la infección primaria, se evaluaron las posibles asociaciones con los parámetros clínicos, así como también con el patrón de diferenciación del panel de memoria y su funcionalidad. En primer lugar, se observó que las células T CD8<sup>+</sup> PD-1<sup>+</sup> (tanto totales como HIV-específicas) se encontraban aumentadas en el subgrupo PHI < 350 (*Figura 34A*), el cual cabe recordar que presenta un recuento de células T CD4<sup>+</sup> significativamente menor, comparado con el grupo PHI > 350, sugiriendo una relación entre la expresión de PD-1 y una rápida progresión a la enfermedad. En este mismo sentido, se observó una correlación inversa entre las células T CD8<sup>+</sup> PD-1<sup>+</sup> y el recuento de células T CD4<sup>+</sup> (*Figura 36A-B*). Como ha sido reportado durante la infección aguda [94, 130] (y contrario a lo descrito en la infección crónica [93,

141, 144]), no se encontró una asociación entre la expresión de PD-1 y la CV plasmática. Sin embargo, la relación entre la magnitud de la expresión de PD-1 y la replicación viral quedó en evidencia cuando se dividió al total de células T CD8<sup>+</sup> PD-1<sup>+</sup> en PD-1<sup>Low</sup> (células PD-1<sup>+</sup> con baja IMF) y PD-1<sup>High</sup> (células PD-1<sup>+</sup> con alta IMF). Se observó que, una mayor proporción de células T CD8<sup>+</sup> PD-1<sup>High</sup> HIV-específicas se correlaciona con una mayor CV plasmática (*Figura 36C*). Este resultado es consistente con reportes previos que muestran que la molécula de PD-1 es modulada positivamente en las células T CD8<sup>+</sup>, en presencia de CV elevadas, debido a la activación celular [96]. Siguiendo en esta misma línea, en el último tiempo se publicaron una variedad de trabajos que sugieren que PD-1 podría estar no sólo asociado al agotamiento celular sino que podría considerarse un marcador de activación celular [96, 130], así como también un regulador clave en la diferenciación del panel de memoria [95, 133, 145] y en la supervivencia de las células [146]. Nuestros resultados indican que, en los primeros tiempos que siguen a la infección primaria (es decir a los 8 meses post-infección), se observa una mayor proporción de células T CD8<sup>+</sup> PD-1<sup>High</sup> (tanto en el compartimiento T CD8<sup>+</sup> total como HIV-específico) que correlaciona con una menor proporción de células CD8<sup>+</sup> T<sub>ME</sub> y una mayor proporción de T<sub>ET</sub> (*Figura 37*). Este resultado está en concordancia con otros autores que indican que PD-1 se expresa en todas las subpoblaciones de memoria, y que la regulación positiva de PD-1 se encuentra asociada con la activación celular, así como también con la reducción del potencial proliferativo y con una mayor predisposición a la muerte celular [96, 130, 133, 141, 145, 146]. Más aún, estos resultados apoyan los reportes recientes que postulan a la molécula de PD-1 más bien como un marcador de activación celular durante la infección aguda, en lugar de un marcador de agotamiento, como lo es en la infección crónica [133, 147]. Además dentro de este contexto, ha sido demostrado que las células T CD8<sup>+</sup> PD-1<sup>+</sup> pueden ser completamente funcionales [94, 147-149]. Estos datos argumentan en favor de la falta de asociación entre la expresión de PD-1 y la funcionalidad de la población celular T CD8<sup>+</sup> HIV-específica durante la infección primaria observada en esta tesis, así como también se encuentran a favor de lo reportado previamente por *Petrovas et al.* [146] en la infección crónica.

## RELACIÓN FENOTIPO DE MEMORIA Y FUNCIONALIDAD CELULAR

En contraste a lo observado para la expresión de PD-1, se encontró una asociación estadísticamente significativa entre el fenotipo de memoria de las células T CD8<sup>+</sup> y su funcionalidad. Más precisamente, una menor proporción de células CD8<sup>+</sup> HIV-específicas T<sub>ME</sub> y una mayor proporción de células T<sub>ET</sub>, se correlacionaron con una mayor capacidad de las células T CD8<sup>+</sup> de mediar VIA *ex vivo* (Figura 38). Este resultado se observó tanto en la muestra basal de los individuos PHI como a los 12 meses post-infección. La actividad antiviral, como se evaluó en este trabajo, comprende mecanismos antivirales tanto líticos como no-lítics, lo cual deja en evidencia la capacidad total de las células T CD8<sup>+</sup> HIV-específica de mediar control viral. Reportes previos han demostrado que, a partir de EC o individuos vacunados y mediante el aislamiento de la población celular T CD8<sup>+</sup> (basándose en su patrón de diferenciación de memoria), se puede observar que todas las subpoblaciones celulares poseen la capacidad de mediar VIA [78, 114, 149, 150]. En estos trabajos, el estatus de los EC [150] y el control de la infección en monos vacunados [114] fueron asociados con un incremento en la capacidad antiviral por parte de las células CD8<sup>+</sup> T<sub>ME</sub>. Siguiendo esta misma línea, en esta tesis se encontró una relación entre la distribución de los fenotipos de memoria de las células T CD8<sup>+</sup> y la función antiviral de las mismas, en el contexto de la infección primaria. Más precisamente, en nuestro trabajo observamos una correlación inversa entre la subpoblación celular CD8<sup>+</sup> T<sub>ME</sub> y la capacidad de las células de mediar VIA. A pesar de que *a priori* estos resultados parecen estar en contradicción, se debe tener en cuenta que el abordaje experimental y, aún más importante, el contexto inmune de los individuos en estudio, son completamente distintos: en esta tesis se evaluó la función antiviral de las células T CD8<sup>+</sup> dentro del contexto de CV con valores elevados y una alta activación inmune, como es común observar en los individuos que se encuentran cursando la infección temprana/aguda, el cual afectaría su funcionalidad; mientras que las células provenientes de EC o sujetos vacunados no se encuentran expuestas a este entorno tan hostil. Esto nos lleva, nuevamente, a formularnos la pregunta sobre si la función antiviral de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> o el fenotipo de los mismos, como se observó en los EC,



serían la causa o la consecuencia del control viral. Como se mencionó previamente (ver polifuncionalidad), varios reportes e incluso resultados presentados en esta tesis, se encuentran a favor de la segunda hipótesis, por lo que, en conclusión, se debe tener cautela al interpretar este tipo de datos. Contrariamente a lo observado para el VIA, no se encontró relación alguna entre el patrón de diferenciación de las células T CD8<sup>+</sup> y la polifuncionalidad de las mismas. Este resultado contradice el reporte presentado por *Riou et al.* [132] donde se muestra que, en el contexto de la infección primaria, las células T CD8<sup>+</sup> HIV-específicas presentan una disminución en su polifuncionalidad a medida que la población celular se diferencia desde los estadios de memoria tempranos hacia el fenotipo de efectoras terminales. Estas diferencias probablemente se encuentren enmascaradas en nuestro diseño experimental debido a limitaciones de la técnica experimental utilizada. En consecuencia, hacen falta nuevos análisis que incluyan un mayor número de marcadores de memoria para poder esclarecer definitivamente esta hipótesis.

## **VI. CONCLUSIONES**

En este trabajo se caracterizaron múltiples aspectos de la población de linfocitos T CD8<sup>+</sup> HIV-específicos (como ser la especificidad, la capacidad de inhibición viral *ex vivo*, la polifuncionalidad y el fenotipo) que surgen de manera temprana en una cohorte Argentina de individuos cursando la etapa aguda de la infección por HIV, cuyos resultados se compararon con un grupo de individuos Crónicos y con un grupo de EC. Además se estudió la asociación entre estas múltiples funciones y la progresión a la enfermedad. En primer lugar, se encontró que la **especificidad** de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> que surgen de manera temprana luego del evento de transmisión es crítico para el control viral: una mayor proporción de células T CD8<sup>+</sup> con especificidad anti Gag se asoció con un retraso en la progresión a la enfermedad, en términos de preservación del recuento de células T CD4<sup>+</sup>, durante el primer año post-infección. A su vez, estos resultados se encontraron en concordancia con la inmunodominancia de Gag observada en EC y controladores virémicos. Otro aspecto evaluado fue la **polifuncionalidad** de las células T CD8<sup>+</sup> de los sujetos reclutados en este trabajo, lo que nos permitió establecer que una de las posibles ventajas de las células T CD8<sup>+</sup> Gag-específicas yace en la habilidad de eliminar células infectadas (lo que se evidenció por una mayor capacidad de degranulación, y de mediar VIA *in vitro*) e inhibición de la replicación viral mediante la secreción de IFN- $\gamma$  soluble. Además, la inmunodominancia de Gag observada en los individuos PHI se correlacionó con los niveles plasmáticos de IL-2 y MIP-1 $\beta$ , factores solubles que también contribuyen a la inhibición viral. Por último, al evaluar el **fenotipo** celular, observamos que la normal maduración de la población de células T CD8<sup>+</sup> HIV-específicas en las distintas subpoblaciones de memoria se encuentra sesgada en los individuos cursando la infección primaria, pero sin alcanzar los niveles dramáticos que se observan en la infección crónica. Más aún, esta alteración en el patrón de diferenciación de la población celular T CD8<sup>+</sup> se traduce en un descenso en la capacidad antiviral de las células T CD8<sup>+</sup> y se correlaciona directamente con una progresión temprana a la enfermedad.

El poder descifrar la relación que existe entre la distintas características que definen a las células T CD8<sup>+</sup> con los niveles de activación inmune, el control viral y la progresión a la enfermedad en los distintos estadios de la infección (como son la infección primaria, crónica o en EC), como ha sido llevado a cabo en este trabajo, es de suma importancia para poder profundizar en el conocimiento que se tiene de la patogénesis de HIV. En este contexto, los datos presentados en esta tesis resaltan la importancia de considerar tanto la especificidad, la funcionalidad y el fenotipo celular, en el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas frente al HIV así como en el diseño y posterior testeo de vacunas que promuevan una respuesta beneficiosa, capaz de contener la replicación viral antes del establecimiento de la infección.

## **VII. REFERENCIAS**

1. Barre-Sinoussi, F., et al., *Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS)*. Science, 1983. **220**(4599): p. 868-71.
2. Gallo, R.C., et al., *Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS*. Science, 1984. **224**(4648): p. 500-3.
3. Gallo, R.C., et al., *Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS)*. Science, 1983. **220**(4599): p. 865-7.
4. Levy, J.A., et al., *Isolation of lymphocytotropic retroviruses from San Francisco patients with AIDS*. Science, 1984. **225**(4664): p. 840-2.
5. Ratner, L., R.C. Gallo, and F. Wong-Staal, *HTLV-III, LAV, ARV are variants of same AIDS virus*. Nature, 1985. **313**(6004): p. 636-7.
6. Clavel, F., et al., *Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS*. Science, 1986. **233**(4761): p. 343-6.
7. Kong, L.I., et al., *West African HIV-2-related human retrovirus with attenuated cytopathicity*. Science, 1988. **240**(4858): p. 1525-9.
8. ONUSIDA, *UNAIDS report on the global AIDS epidemic 2013*. UNAIDS / JC2502/1/E, 2014.
9. SIDA., P.N.d., *Boletín Oficial sobre el VIH-sida e ITS N°31*. Ministerio de Salud de la Nación., 2014. .
10. Plantier, J.C., et al., *A new human immunodeficiency virus derived from gorillas*. Nat Med, 2009. **15**(8): p. 871-2.
11. <http://www.hiv.lanl.gov/content/hiv-db>, *Los Alamos HIV Sequence Database*.
12. Sanchez, A.M., et al., *Development of a contemporary globally diverse HIV viral panel by the EQAPOL program*. J Immunol Methods, 2014.
13. Hemelaar, J., *Implications of HIV diversity for the HIV-1 pandemic*. J Infect, 2013. **66**(5): p. 391-400.
14. Arien, K.K., G. Vanham, and E.J. Arts, *Is HIV-1 evolving to a less virulent form in humans?* Nat Rev Microbiol, 2007. **5**(2): p. 141-51.
15. Graf, T. and A.R. Pinto, *The increasing prevalence of HIV-1 subtype C in Southern Brazil and its dispersion through the continent*. Virology. **435**(1): p. 170-8.
16. Almeida, S.E., et al., *Temporal dynamics of HIV-1 circulating subtypes in distinct exposure categories in southern Brazil*. Virol J. **9**: p. 306.
17. Marquina, S., et al., *Coexistence of subtypes B, F, and as B/F env recombinant of HIV type 1 in Buenos Aires Argentina*. AIDS Res Hum Retroviruses, 1996. **12**(17): p. 1651-4.
18. Campodonico, M., et al., *HIV type 1 subtypes in Argentina and genetic heterogeneity of the V3 region*. AIDS Res Hum Retroviruses, 1996. **12**(1): p. 79-81.

19. Carr, J.K., et al., *Diverse BF recombinants have spread widely since the introduction of HIV-1 into South America*. *Aids*, 2001. **15**(15): p. F41-7.
20. Quarleri, J.F., et al., *HIV type 1 BF recombinant strains exhibit different pol gene mosaic patterns: descriptive analysis from 284 patients under treatment failure*. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 2004. **20**(10): p. 1100-7.
21. Dilernia, D., et al., *HIV-1 Genetic Diversity Surveillance among Newly Diagnosed Individuals in Buenos Aires, Argentina*. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 2007. **23**(10): p. 1201-7.
22. Gomez-Carrillo, M., et al., *Analysis of HIV type 1 diversity in pregnant women from four Latin American and Caribbean countries*. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 2006. **22**(11): p. 1186-91.
23. Rubio, A.E., et al., *Similar replicative fitness is shared by the subtype B and unique BF recombinant HIV-1 isolates that dominate the epidemic in Argentina*. *PLoS One*, 2014. **9**(4): p. e92084.
24. Coffin, J.M., S.H. Hughes, and H.E. Varmus, *Retroviruses*. 1997, Cold Spring Harbor Cold Spring Harbor Laboratory Press.
25. Flint, S.J., et al., *Principles of Virology: Molecular Biology, Pathogenesis and Control*. 2004, Washington, D. C. : ASM Press.
26. Peterlin, B.M. and D. Trono, *Hide, shield and strike back: how HIV-infected cells avoid immune eradication*. *Nat Rev Immunol*, 2003. **3**(2): p. 97-107.
27. Lever, A.M. and K.T. Jeang, *Replication of human immunodeficiency virus type 1 from entry to exit*. *Int J Hematol*, 2006. **84**(1): p. 23-30.
28. Choe, H., et al., *The beta-chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates*. *Cell*, 1996. **85**(7): p. 1135-48.
29. Deng, H., et al., *Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1*. *Nature*, 1996. **381**(6584): p. 661-6.
30. Dragic, T., et al., *HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5*. *Nature*, 1996. **381**(6584): p. 667-73.
31. Chan, D.C. and P.S. Kim, *HIV entry and its inhibition*. *Cell*, 1998. **93**: p. 681-684.
32. Matreyek, K.A. and A. Engelman, *Viral and cellular requirements for the nuclear entry of retroviral preintegration nucleoprotein complexes*. *Viruses*, 2013. **5**(10): p. 2483-511.
33. Engelman, A. and P. Cherepanov, *The structural biology of HIV-1: mechanistic and therapeutic insights*. *Nat Rev Microbiol*, 2012. **10**(4): p. 279-90.
34. Paiardini, M., et al., *Mucosal immune dysfunction in AIDS pathogenesis*. *AIDS Rev*, 2008. **10**(1): p. 36-46.
35. Cunningham, A.L., A.N. Harman, and N. Nasr, *Initial HIV mucosal infection and dendritic cells*. *EMBO Mol Med*, 2013. **5**(5): p. 658-60.

36. Harman, A.N., et al., *Tissue dendritic cells as portals for HIV entry*. Rev Med Virol, 2013. **23**(5): p. 319-33.
37. Miller, C.J., et al., *Propagation and dissemination of infection after vaginal transmission of simian immunodeficiency virus*. J Virol, 2005. **79**(14): p. 9217-27.
38. Cohen, M.S., J.A. Anderson, and R. Swanstrom, *Acute HIV Infection: Implications for HIV Spread, Disease Progression, and Vaccine Development*, in *HIV Molecular Immunology*, C.B. Bette T. M. Korber, Barton F. Haynes, Richard Koup, John P. Moore, Bruce D. Walker, and David I. Watkins., Editor. 2005, Los Alamos National Laboratory, Theoretical Biology and Biophysics: Los Alamos, New Mexico. p. 21-31.
39. Addo, M.M., et al., *Fully differentiated HIV-1 specific CD8+ T effector cells are more frequently detectable in controlled than in progressive HIV-1 infection*. PLoS One, 2007. **2**(3): p. e321.
40. Simon, V., D.D. Ho, and Q. Abdool Karim, *HIV/AIDS epidemiology, pathogenesis, prevention, and treatment*. Lancet, 2006. **368**(9534): p. 489-504.
41. Walker, L.M., et al., *Broad neutralization coverage of HIV by multiple highly potent antibodies*. Nature, 2011. **477**(7365): p. 466-70.
42. Liao, H.X., et al., *Co-evolution of a broadly neutralizing HIV-1 antibody and founder virus*. Nature, 2013. **496**(7446): p. 469-76.
43. Cooper, A., et al., *HIV-1 causes CD4 cell death through DNA-dependent protein kinase during viral integration*. Nature, 2013. **498**(7454): p. 376-9.
44. Mehandru, S., et al., *Mechanisms of gastrointestinal CD4+ T-cell depletion during acute and early human immunodeficiency virus type 1 infection*. J Virol, 2007. **81**(2): p. 599-612.
45. Brenchley, J.M., D.A. Price, and D.C. Douek, *HIV disease: fallout from a mucosal catastrophe?* Nat Immunol, 2006. **7**(3): p. 235-9.
46. Vriskoop, N., J.N. Mandl, and R.N. Germain, *Life and death as a T lymphocyte: from immune protection to HIV pathogenesis*. J Biol, 2009. **8**(10): p. 91.
47. Betts, M.R., et al., *HIV nonprogressors preferentially maintain highly functional HIV-specific CD8+ T cells*. Blood, 2006. **107**(12): p. 4781-9.
48. Klein, M.R., et al., *Kinetics of Gag-specific cytotoxic T lymphocyte responses during the clinical course of HIV-1 infection: a longitudinal analysis of rapid progressors and long-term asymptomatics*. J Exp Med, 1995. **181**(4): p. 1365-72.
49. Kloosterboer, N., et al., *Natural controlled HIV infection: preserved HIV-specific immunity despite undetectable replication competent virus*. Virology, 2005. **339**(1): p. 70-80.
50. Lambotte, O., et al., *HIV controllers: a homogeneous group of HIV-1-infected patients with spontaneous control of viral replication*. Clin Infect Dis, 2005. **41**(7): p. 1053-6.
51. Jin, X., et al., *Dramatic rise in plasma viremia after CD8(+) T cell depletion in simian immunodeficiency virus-infected macaques*. J Exp Med, 1999. **189**(6): p. 991-8.



52. Schmitz, J.E., et al., *Control of viremia in simian immunodeficiency virus infection by CD8+ lymphocytes*. Science, 1999. **283**(5403): p. 857-60.
53. Mahnke, Y.D., et al., *The who's who of T-cell differentiation: human memory T-cell subsets*. Eur J Immunol, 2013. **43**(11): p. 2797-809.
54. Streeck, H., et al., *Human immunodeficiency virus type 1-specific CD8+ T-cell responses during primary infection are major determinants of the viral set point and loss of CD4+ T cells*. J Virol, 2009. **83**(15): p. 7641-8.
55. Edwards, B.H., et al., *Magnitude of functional CD8+ T-cell responses to the gag protein of human immunodeficiency virus type 1 correlates inversely with viral load in plasma*. J Virol, 2002. **76**(5): p. 2298-305.
56. Kiepiela, P., et al., *CD8+ T-cell responses to different HIV proteins have discordant associations with viral load*. Nat Med, 2007. **13**(1): p. 46-53.
57. Almeida, J.R., et al., *Antigen sensitivity is a major determinant of CD8+ T-cell polyfunctionality and HIV-suppressive activity*. Blood, 2009. **113**(25): p. 6351-60.
58. Ferre, A.L., et al., *Mucosal immune responses to HIV-1 in elite controllers: a potential correlate of immune control*. Blood, 2009. **113**(17): p. 3978-89.
59. Hersperger, A.R., et al., *Perforin expression directly ex vivo by HIV-specific CD8 T-cells is a correlate of HIV elite control*. PLoS Pathog, 2010. **6**(5): p. e1000917.
60. Papagno, L., et al., *Immune activation and CD8+ T-cell differentiation towards senescence in HIV-1 infection*. PLoS Biol, 2004. **2**(2): p. E20.
61. Appay, V., et al., *Phenotype and function of human T lymphocyte subsets: consensus and issues*. Cytometry A, 2008. **73**(11): p. 975-83.
62. Julg, B., et al., *Enhanced anti-HIV functional activity associated with Gag-specific CD8 T-cell responses*. J Virol, 2010. **84**(11): p. 5540-9.
63. Socias, M.E., et al., *Acute retroviral syndrome and high baseline viral load are predictors of rapid HIV progression among untreated Argentinean seroconverters*. J Int AIDS Soc. **14**: p. 40.
64. Coloccini, R.S., et al., *Host Genetic Factors Associated with Symptomatic Primary HIV Infection and Disease Progression among Argentinean Seroconverters*. PLoS One, 2014. **9**(11): p. e113146.
65. Malhotra, U., et al., *Enhanced detection of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Nef-specific T cells recognizing multiple variants in early HIV-1 infection*. J Virol, 2007. **81**(10): p. 5225-37.
66. Currier, J.R., et al., *A panel of MHC class I restricted viral peptides for use as a quality control for vaccine trial ELISPOT assays*. J Immunol Methods, 2002. **260**(1-2): p. 157-72.
67. Turk, G., et al., *Magnitude, breadth, and functional profile of T-cell responses during human immunodeficiency virus primary infection with B and BF viral variants*. J Virol, 2008. **82**(6): p. 2853-66.

68. Saez-Cirion, A., et al., *Ex vivo T cell-based HIV suppression assay to evaluate HIV-specific CD8+ T-cell responses*. Nat Protoc, 2010. **5**(6): p. 1033-41.
69. Liu, Z., et al., *Elevated CD38 antigen expression on CD8+ T cells is a stronger marker for the risk of chronic HIV disease progression to AIDS and death in the Multicenter AIDS Cohort Study than CD4+ cell count, soluble immune activation markers, or combinations of HLA-DR and CD38 expression*. J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol, 1997. **16**(2): p. 83-92.
70. Giavedoni, L.D., *Simultaneous detection of multiple cytokines and chemokines from nonhuman primates using luminex technology*. J Immunol Methods, 2005. **301**(1-2): p. 89-101.
71. Fiebig, E.W., et al., *Dynamics of HIV viremia and antibody seroconversion in plasma donors: implications for diagnosis and staging of primary HIV infection*. Aids, 2003. **17**(13): p. 1871-9.
72. Deeks, S.G., et al., *Immune activation set point during early HIV infection predicts subsequent CD4+ T-cell changes independent of viral load*. Blood, 2004. **104**(4): p. 942-7.
73. Pereyra, F., et al., *The major genetic determinants of HIV-1 control affect HLA class I peptide presentation*. Science, 2010. **330**(6010): p. 1551-7.
74. Zuniga, R., et al., *Relative dominance of Gag p24-specific cytotoxic T lymphocytes is associated with human immunodeficiency virus control*. J Virol, 2006. **80**(6): p. 3122-5.
75. Rodriguez, A.M., et al., *IL-12 and GM-CSF in DNA/MVA immunizations against HIV-1 CRF12\_BF Nef induced T-cell responses with an enhanced magnitude, breadth and quality*. PLoS One. **7**(5): p. e37801.
76. Saez-Cirion, A., et al., *Heterogeneity in HIV suppression by CD8 T cells from HIV controllers: association with Gag-specific CD8 T cell responses*. J Immunol, 2009. **182**(12): p. 7828-37.
77. Saez-Cirion, A., et al., *HIV controllers exhibit potent CD8 T cell capacity to suppress HIV infection ex vivo and peculiar cytotoxic T lymphocyte activation phenotype*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(16): p. 6776-81.
78. Freel, S.A., et al., *Phenotypic and functional profile of HIV-inhibitory CD8 T cells elicited by natural infection and heterologous prime/boost vaccination*. J Virol, 2010. **84**(10): p. 4998-5006.
79. Ndhlovu, Z.M., et al., *Elite controllers with low to absent effector CD8+ T cell responses maintain highly functional, broadly directed central memory responses*. J Virol. **86**(12): p. 6959-69.
80. Julg, B., et al., *Enhanced anti-HIV functional activity associated with Gag-specific CD8 T-cell responses*. J Virol. **84**(11): p. 5540-9.
81. Precopio, M.L., et al., *Immunization with vaccinia virus induces polyfunctional and phenotypically distinctive CD8(+) T cell responses*. J Exp Med, 2007. **204**(6): p. 1405-16.

82. Roberts, L., et al., *Plasma cytokine levels during acute HIV-1 infection predict HIV disease progression*. *Aids*, 2010. **24**(6): p. 819-31.
83. Keating, S.M., et al., *The effect of HIV infection and HAART on inflammatory biomarkers in a population-based cohort of women*. *Aids*, 2011. **25**(15): p. 1823-32.
84. Liovat, A.S., et al., *Acute plasma biomarkers of T cell activation set-point levels and of disease progression in HIV-1 infection*. *PLoS One*, 2012. **7**(10): p. e46143.
85. Ferrari, G., et al., *Relationship between functional profile of HIV-1 specific CD8 T cells and epitope variability with the selection of escape mutants in acute HIV-1 infection*. *PLoS Pathog*, 2011. **7**(2): p. e1001273.
86. Zimmerli, S.C., et al., *HIV-1-specific IFN-gamma/IL-2-secreting CD8 T cells support CD4-independent proliferation of HIV-1-specific CD8 T cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(20): p. 7239-44.
87. Saunders, K.O., et al., *Secretion of MIP-1beta and MIP-1alpha by CD8(+) T-lymphocytes correlates with HIV-1 inhibition independent of coreceptor usage*. *Cell Immunol*, 2010. **266**(2): p. 154-64.
88. Freel, S.A., et al., *Initial HIV-1 antigen-specific CD8+ T cells in acute HIV-1 infection inhibit transmitted/founder virus replication*. *J Virol*, 2012. **86**(12): p. 6835-46.
89. Ganesan, A., et al., *Immunologic and virologic events in early HIV infection predict subsequent rate of progression*. *J Infect Dis*, 2010. **201**(2): p. 272-84.
90. Gattinoni, L., et al., *A human memory T cell subset with stem cell-like properties*. *Nat Med*, 2011. **17**(10): p. 1290-7.
91. Mahnke, Y.D., et al., *The who's who of T-cell differentiation: human memory T-cell subsets*. *Eur J Immunol*. **43**(11): p. 2797-809.
92. Champagne, P., et al., *Skewed maturation of memory HIV-specific CD8 T lymphocytes*. *Nature*, 2001. **410**(6824): p. 106-11.
93. Day, C.L., et al., *PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression*. *Nature*, 2006. **443**(7109): p. 350-4.
94. Trautmann, L., et al., *Profound metabolic, functional, and cytolytic differences characterize HIV-specific CD8 T cells in primary and chronic HIV infection*. *Blood*, 2012. **120**(17): p. 3466-77.
95. de Silva, T.I., et al., *Correlates of T-cell-mediated viral control and phenotype of CD8(+) T cells in HIV-2, a naturally contained human retroviral infection*. *Blood*, 2013. **121**(21): p. 4330-9.
96. Sauce, D., et al., *PD-1 expression on human CD8 T cells depends on both state of differentiation and activation status*. *Aids*, 2007. **21**(15): p. 2005-13.
97. Freel, S.A., K.O. Saunders, and G.D. Tomaras, *CD8(+)T-cell-mediated control of HIV-1 and SIV infection*. *Immunol Res*, 2011. **49**(1-3): p. 135-46.
98. McDermott, A.B. and R.A. Koup, *CD8(+) T cells in preventing HIV infection and disease*. *Aids*, 2012. **26**(10): p. 1281-92.

99. Cohen, M.S., et al., *Acute HIV-1 Infection*. N Engl J Med. **364**(20): p. 1943-54.
100. Lichterfeld, M., et al., *HIV-1 Nef is preferentially recognized by CD8 T cells in primary HIV-1 infection despite a relatively high degree of genetic diversity*. Aids, 2004. **18**(10): p. 1383-92.
101. Masemola, A., et al., *Hierarchical targeting of subtype C human immunodeficiency virus type 1 proteins by CD8+ T cells: correlation with viral load*. J Virol, 2004. **78**(7): p. 3233-43.
102. Kunwar, P., et al., *Superior control of HIV-1 replication by CD8+ T cells targeting conserved epitopes: implications for HIV vaccine design*. PLoS One, 2013. **8**(5): p. e64405.
103. Geldmacher, C., et al., *CD8 T-cell recognition of multiple epitopes within specific Gag regions is associated with maintenance of a low steady-state viremia in human immunodeficiency virus type 1-seropositive patients*. J Virol, 2007. **81**(5): p. 2440-8.
104. Ferrando-Martinez, S., et al., *Differential Gag-specific polyfunctional T cell maturation patterns in HIV-1 elite controllers*. J Virol, 2012. **86**(7): p. 3667-74.
105. Ferre, A.L., et al., *Immunodominant HIV-specific CD8+ T-cell responses are common to blood and gastrointestinal mucosa, and Gag-specific responses dominate in rectal mucosa of HIV controllers*. J Virol, 2010. **84**(19): p. 10354-65.
106. Sacha, J.B., et al., *Gag-specific CD8+ T lymphocytes recognize infected cells before AIDS-virus integration and viral protein expression*. J Immunol, 2007. **178**(5): p. 2746-54.
107. Payne, R.P., et al., *Efficacious early antiviral activity of HIV Gag- and Pol-specific HLA-B 2705-restricted CD8+ T cells*. J Virol. **84**(20): p. 10543-57.
108. Miura, T., et al., *Impaired replication capacity of acute/early viruses in persons who become HIV controllers*. J Virol. **84**(15): p. 7581-91.
109. Henn, M.R., et al., *Whole genome deep sequencing of HIV-1 reveals the impact of early minor variants upon immune recognition during acute infection*. PLoS Pathog. **8**(3): p. e1002529.
110. Radebe, M., et al., *Limited immunogenicity of HIV CD8+ T-cell epitopes in acute Clade C virus infection*. J Infect Dis, 2011. **204**(5): p. 768-76.
111. Riou, C., et al., *Differential impact of magnitude, polyfunctional capacity, and specificity of HIV-specific CD8+ T cell responses on HIV set point*. J Virol, 2014. **88**(3): p. 1819-24.
112. Hua, S., et al., *Potential role for HIV-specific CD38-/HLA-DR+ CD8+ T cells in viral suppression and cytotoxicity in HIV controllers*. PLoS One, 2014. **9**(7): p. e101920.
113. Buckheit, R.W., 3rd, R.F. Siliciano, and J.N. Blankson, *Primary CD8+ T cells from elite suppressors effectively eliminate non-productively HIV-1 infected resting and activated CD4+ T cells*. Retrovirology, 2013. **10**: p. 68.
114. Yamamoto, T., et al., *Virus inhibition activity of effector memory CD8(+) T cells determines simian immunodeficiency virus load in vaccinated monkeys after vaccine breakthrough infection*. J Virol, 2012. **86**(10): p. 5877-84.

115. Lecuroux, C., et al., *CD8 T-cells from most HIV-infected patients lack ex vivo HIV-suppressive capacity during acute and early infection*. PLoS One, 2013. **8**(3): p. e59767.
116. Peris-Pertusa, A., et al., *Evolution of the functional profile of HIV-specific CD8+ T cells in patients with different progression of HIV infection over 4 years*. J Acquir Immune Defic Syndr, 2010. **55**(1): p. 29-38.
117. Streeck, H., et al., *Antigen load and viral sequence diversification determine the functional profile of HIV-1-specific CD8+ T cells*. PLoS Med, 2008. **5**(5): p. e100.
118. Viola, A. and A. Lanzavecchia, *T cell activation determined by T cell receptor number and tunable thresholds*. Science, 1996. **273**(5271): p. 104-6.
119. Altfeld, M., et al., *HLA Alleles Associated with Delayed Progression to AIDS Contribute Strongly to the Initial CD8(+) T Cell Response against HIV-1*. PLoS Med, 2006. **3**(10): p. e403.
120. Borghans, J.A., et al., *HLA alleles associated with slow progression to AIDS truly prefer to present HIV-1 p24*. PLoS One, 2007. **2**(9): p. e920.
121. Carlson, J.M., et al., *Correlates of protective cellular immunity revealed by analysis of population-level immune escape pathways in HIV-1*. J Virol. **86**(24): p. 13202-16.
122. Harari, A., et al., *Skewed association of polyfunctional antigen-specific CD8 T cell populations with HLA-B genotype*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(41): p. 16233-8.
123. Hoof, I., et al., *Humans with chimpanzee-like major histocompatibility complex-specificities control HIV-1 infection*. Aids, 2008. **22**(11): p. 1299-303.
124. Horton, H., et al., *Preservation of T cell proliferation restricted by protective HLA alleles is critical for immune control of HIV-1 infection*. J Immunol, 2006. **177**(10): p. 7406-15.
125. Klooverpris, H.N., et al., *Early antigen presentation of protective HIV-1 KF11Gag and KK10Gag epitopes from incoming viral particles facilitates rapid recognition of infected cells by specific CD8+ T cells*. J Virol. **87**(5): p. 2628-38.
126. Ndhlovu, Z.M., et al., *High-dimensional immunomonitoring models of HIV-1-specific CD8 T-cell responses accurately identify subjects achieving spontaneous viral control*. Blood. **121**(5): p. 801-11.
127. Katsikis, P.D., Y.M. Mueller, and F. Villinger, *The cytokine network of acute HIV infection: a promising target for vaccines and therapy to reduce viral set-point?* PLoS Pathog, 2011. **7**(8): p. e1002055.
128. Cohen, M.S., et al., *Acute HIV-1 Infection*. N Engl J Med, 2011. **364**(20): p. 1943-54.
129. Meyer-Olson, D., et al., *Clonal expansion and TCR-independent differentiation shape the HIV-specific CD8+ effector-memory T-cell repertoire in vivo*. Blood, 2010. **116**(3): p. 396-405.
130. Burgers, W.A., et al., *Association of HIV-specific and total CD8+ T memory phenotypes in subtype C HIV-1 infection with viral set point*. J Immunol, 2009. **182**(8): p. 4751-61.

131. Northfield, J.W., et al., *Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-specific CD8+ T(EMRA) cells in early infection are linked to control of HIV-1 viremia and predict the subsequent viral load set point.* J Virol, 2007. **81**(11): p. 5759-65.
132. Riou, C., et al., *Increased memory differentiation is associated with decreased polyfunctionality for HIV but not for cytomegalovirus-specific CD8+ T cells.* J Immunol, 2012. **189**(8): p. 3838-47.
133. Breton, G., et al., *Programmed death-1 is a marker for abnormal distribution of naive/memory T cell subsets in HIV-1 infection.* J Immunol, 2013. **191**(5): p. 2194-204.
134. Pires, A., et al., *Initiation of antiretroviral therapy during recent HIV-1 infection results in lower residual viral reservoirs.* J Acquir Immune Defic Syndr, 2004. **36**(3): p. 783-90.
135. Passaes, C.P. and A. Saez-Cirion, *HIV cure research: advances and prospects.* Virology, 2014. **454-455**: p. 340-52.
136. Barbour, J.D., et al., *High CD8+ T cell activation marks a less differentiated HIV-1 specific CD8+ T cell response that is not altered by suppression of viral replication.* PLoS One, 2009. **4**(2): p. e4408.
137. Emu, B., et al., *Composition and function of T cell subpopulations are slow to change despite effective antiretroviral treatment of HIV disease.* PLoS One, 2014. **9**(1): p. e85613.
138. Ribeiro, S.P., et al., *The CD8+ Memory Stem T Cell (TSCM) Subset Is Associated with Improved Prognosis in Chronic HIV-1 Infection.* J Virol, 2014. **88**(23): p. 13836-44.
139. Chun, T.W., et al., *Relationship between the frequency of HIV-specific CD8+ T cells and the level of CD38+CD8+ T cells in untreated HIV-infected individuals.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(8): p. 2464-9.
140. Trautmann, L., et al., *Upregulation of PD-1 expression on HIV-specific CD8+ T cells leads to reversible immune dysfunction.* Nat Med, 2006. **12**(10): p. 1198-202.
141. Zhang, J.Y., et al., *PD-1 up-regulation is correlated with HIV-specific memory CD8+ T-cell exhaustion in typical progressors but not in long-term nonprogressors.* Blood, 2007. **109**(11): p. 4671-8.
142. Yamamoto, T., et al., *Surface expression patterns of negative regulatory molecules identify determinants of virus-specific CD8+ T-cell exhaustion in HIV infection.* Blood, 2011. **117**(18): p. 4805-15.
143. Peretz, Y., et al., *CD160 and PD-1 co-expression on HIV-specific CD8 T cells defines a subset with advanced dysfunction.* PLoS Pathog, 2012. **8**(8): p. e1002840.
144. Kloverpris, H.N., et al., *Programmed death-1 expression on HIV-1-specific CD8+ T cells is shaped by epitope specificity, T-cell receptor clonotype usage and antigen load.* Aids, 2014. **28**(14): p. 2007-21.
145. Hong, J.J., et al., *Re-evaluation of PD-1 expression by T cells as a marker for immune exhaustion during SIV infection.* PLoS One, 2013. **8**(3): p. e60186.

146. Petrovas, C., et al., *Differential association of programmed death-1 and CD57 with ex vivo survival of CD8+ T cells in HIV infection*. J Immunol, 2009. **183**(2): p. 1120-32.
147. Zelinskyy, G., et al., *Virus-specific CD8+ T cells upregulate programmed death-1 expression during acute friend retrovirus infection but are highly cytotoxic and control virus replication*. J Immunol, 2011. **187**(7): p. 3730-7.
148. Wei, F., et al., *Strength of PD-1 signaling differentially affects T-cell effector functions*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(27): p. E2480-9.
149. Killian, M.S., et al., *Natural suppression of human immunodeficiency virus type 1 replication is mediated by transitional memory CD8+ T cells*. J Virol, 2011. **85**(4): p. 1696-705.
150. Buckheit, R.W., 3rd, et al., *Inhibitory potential of subpopulations of CD8+ T cells in HIV-1-infected elite suppressors*. J Virol, 2012. **86**(24): p. 13679-88.