

Tesis Doctoral

Estudio del impacto del balance Th17/Treg en periferia y en mucosas sobre la funcionalidad de la respuesta celular antiviral y la inmunopatogénesis de la infección HIV/SIDA

Falivene, Juliana

2016-03-08

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. 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. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Falivene, Juliana. (2016-03-08). Estudio del impacto del balance Th17/Treg en periferia y en mucosas sobre la funcionalidad de la respuesta celular antiviral y la inmunopatogénesis de la infección HIV/SIDA. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Falivene, Juliana. "Estudio del impacto del balance Th17/Treg en periferia y en mucosas sobre la funcionalidad de la respuesta celular antiviral y la inmunopatogénesis de la infección HIV/SIDA". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2016-03-08.

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

Estudio del impacto del balance Th17/Treg en periferia y en mucosas sobre la funcionalidad de la respuesta celular antiviral y la inmunopatogénesis de la infección HIV/SIDA

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

Juliana Falivene

Director de tesis: Dra. María Magdalena Gherardi

Consejero de estudios: Dra. Laura Alché

Lugar de trabajo: Instituto de Investigaciones Biomédicas en Retrovirus y SIDA,
UBA-CONICET

Buenos Aires, 2015

Estudio del impacto del balance Th17/ Treg en periferia y en mucosas sobre la funcionalidad de la respuesta celular antiviral y la inmunopatogénesis de la infección HIV/ SIDA

Las subpoblaciones de linfocitos Th17 y T regulatorios (Treg) han sido relacionados con la progresión a enfermedad en el contexto de la infección por HIV-1. Sin embargo, su relación con la respuesta adaptativa T CD8⁺ antiviral durante la infección aguda/temprana por HIV (PHI, *primary HIV infection*) no ha sido aún estudiada. En este contexto, el primer objetivo general de este trabajo de tesis consistió en analizar las subpoblaciones Th17 y Treg y su relación con la respuesta celular T CD8⁺ específica frente a HIV y parámetros de seguimiento de la infección durante la infección aguda/temprana y hasta un año post-infección (p.i). Para ello se utilizaron muestras de sangre de 14 dadores sanos (DSs), 40 PHI, 17 Crónicos y 13 controladores elite (ECs, *Elite Controllers*). Los porcentajes de células Th17 y Treg se encontraban severamente alterados en individuos Crónicos, mientras que todos los pacientes infectados con HIV evidenciaron un desbalance Th17/Treg comparados con DSs (incluso ECs), en concordancia con sus mayores proporciones de células T CD8⁺ activadas (HLA-DR⁺/CD38⁺). Un mejor estatus clínico (evidenciado por mayores recuentos de células T CD4⁺ y menores cargas virales y activación inmune) se asoció con mayores niveles de Th17 y menores niveles de Treg. Notablemente, se encontraron correlaciones positivas entre los niveles basales de Th17 y la funcionalidad de la respuesta T CD8⁺ específica frente a HIV: la capacidad de suprimir la replicación viral (VIA, *viral inhibitory activity*) y la proporción de células polifuncionales (IFN- γ ⁺/CD107_{A/B}⁺) tanto a tiempos tempranos como tardíos p.i, resaltando el valor pronóstico de la subpoblación Th17 en la preservación de una inmunidad celular antiviral más eficiente. La relación Th17/Treg y la intensidad media de fluorescencia relativa (IMFr) de IL-17 también se correlacionaron positivamente con VIA.

Debido a la importancia del tratamiento antirretroviral (TARV) en la reconstitución inmune de individuos infectados, a continuación se decidió caracterizar las subpoblaciones

Th17, Treg y su balance en sangre periférica y mucosa cervical y su implicancia en la inmunopatogénesis de HIV-1 en ausencia o presencia de TARV. Para ello se utilizaron muestras de 19 individuos TARV⁺ (más de 2 años con supresión efectiva de la CV), 22 pacientes crónicamente infectados *naïve* de tratamiento (TARV⁻) y 20 DSs. Tras el tratamiento, tanto la frecuencia de Th17 como la relación Th17/Treg en periferia alcanzaron valores similares a los observados en DSs, en contraste a lo observado en células Treg cuyos niveles se mantuvieron altos. Asimismo, en individuos TARV⁺ se observó una disminución de los niveles de activación inmune a pesar de lo cual no se alcanzaron valores normales, hallándose correlaciones negativas entre los niveles de activación celular y el balance Th17/Treg. Por otro lado, mayores niveles de la citoquina proinflamatoria IL-1 β en exocervix se correlacionaron positivamente con los niveles de activación celular periféricos, sugiriendo que existiría una relación entre los niveles de inflamación sistémicos y lo observado en sitios de mucosas. Es importante destacar que el tratamiento no indujo un incremento de los recuentos de células T CD4⁺ CD161⁺ (subpoblación de células precursoras de Th17 que migran a intestino) los cuales resultaron significativamente menores a los observados en DSs. Asimismo, al estudiar el patrón de secreción de citoquinas por parte de células mononucleares de cérvix (CMCs) estimuladas, se observó que las CMCs provenientes de individuos TARV⁺ secretan menores niveles de IL-17A e IL-10 en relación a las de DSs.

En conjunto, los resultados de la presente tesis sugieren, por un lado, la existencia de una potencial relación entre la subpoblación Th17 y el balance Th17/Treg con respuestas T CD8⁺ HIV-específicas que juegan un rol clave en la contención de la infección. Por otro lado, aunque el tratamiento antirretroviral parece tener un impacto positivo sobre la restauración de las funciones inmunes a nivel sistémico, tanto los niveles de precursores de células Th17 que migran a intestino como la secreción de IL-17A e IL-10 por CMCs no alcanzaron valores normales, sugiriendo que en sitios de mucosas la restauración inmune es incompleta.

PALABRAS CLAVE: Balance Th17/Treg, HIV, infección aguda/temprana, inmunidad antiviral, respuesta T CD8⁺, tracto genital femenino, tratamiento antirretroviral.

Study of the impact of Th17/ Treg balance in peripheral and mucosal sites over the functionality of the antiviral T-cell responses and HIV immunopathogenesis

Th17 and Treg subsets have been related to disease progression during HIV-1 infection. However, the potential relation of these T cell subsets with antiviral T-cell responses during primary HIV infection (PHI) has not been studied yet. In this context, the first aim of this study was to analyze Th17 and Treg subsets and their relation with anti-HIV T-cell responses and clinical parameters during PHI and up to one year post-infection (p.i). Samples from 14 healthy donors (HDs), 40 PHI patients, 17 Chronics, and 13 Elite controllers (ECs) were studied. The percentages of Th17 and Treg subsets were severely altered in Chronics, whereas all HIV-infected individuals (including ECs) showed Th17/Treg imbalance compared to HDs, in concordance with higher frequencies of activated CD8⁺ T-cells (HLA-DR⁺/CD38⁺). Better clinical status (higher CD4⁺ T-cell counts, lower viral loads and immune activation) was associated with higher Th17 and lower Treg levels. Positive correlations were found between Th17 at baseline and anti-HIV CD8⁺ T-cell functionality: viral inhibitory activity (VIA) and key polyfunctions (IFN- γ ⁺/CD107_{A/B}⁺) at both early and later times p.i, highlighting the prognostic value of Th17 cells to preserve an effective antiviral T-cell immunity. Th17/Treg ratio and the IL-17 relative mean fluorescence intensity were also positively correlated with VIA.

Due to the importance that antiretroviral treatment (ART) has in the immune reconstitution of HIV⁺ patients, the second aim of this study was to characterize Th17 and Treg subsets and their balance in peripheral blood and female genital tract and their implications in the immunopathogenesis of HIV-1 infection comparing ART⁺ with ART⁻ patients. Samples from 19 HIV⁺ ART⁺ patients (more than 2 years under treatment), 22 HIV⁺ ART *naïve* patients (ART⁻) and 20 HDs were used. After treatment, both the frequency of Th17 cells as well as Th17/Treg ratio in peripheral blood reached similar levels compared to HDs, in contrast to that observed for Treg cells that remained at high levels despite ART. Also, ART was accompanied by a reduction in the immune activation levels, yet not to

normal values, finding negative correlations between cellular immune activation and Th17/Treg ratio. On the other hand, high levels of the proinflammatory cytokine IL-1 β in exocervix samples were positively correlated with higher levels of cellular immune activation in the blood, suggesting a relationship exists between systemic and mucosal activation/inflammation. Importantly, ART did not induce a proper restoration of CD4⁺ CD161⁺ T-cell counts (a subset of Th17 precursor cells with GALT homing properties) which were significantly lower compared to HDs. Interestingly, it was observed that cervix mononuclear cells (CMCs) from ART⁺ subjects secreted lower amounts of IL-17A and IL-10 upon stimulation than those obtained from HDs.

Taken together, these results suggested, first, a potential link between Th17 and Th17/Treg ratio with key HIV-specific CD8⁺ T-cell responses against the infection. On the other hand, although ART has a positive impact on immune restoration in blood, both the levels of Th17 precursor subset with GALT homing properties and the ability of CMCs to secrete IL-17A and IL-10 did not reach normal values, suggesting that immune restoration at mucosal sites is impaired or incomplete.

KEY WORDS: Th17/Treg ratio, HIV, acute/early infection, antiviral immunity, CD8⁺ T-cell responses, female genital tract, antiretroviral treatment.

ÍNDICE:

LISTADO DE FIGURAS Y TABLAS	V
ABREVIATURAS.....	VIII
I. INTRODUCCIÓN	1
I. 1. VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA	2
I. 2. EPIDEMIOLOGÍA.....	2
I. 2. 1. Epidemiología molecular	3
I. 3. EL VIRIÓN: MORFOLOGÍA, GENOMA Y CICLO DE REPLICACIÓN.....	4
I. 4. INMUNOPATOGENIA.....	7
I. 5. RESPUESTA CITOTÓXICA T CD8 ⁺ ESPECÍFICA FRENTE A HIV-1	10
I. 5. 1. Importancia del fenotipo y funcionalidad de la respuesta T CD8 ⁺ antiviral en el control de la progresión a SIDA	11
I. 6. CÉLULAS TH17 Y T REGULATORIAS EN LA INFECCIÓN POR HIV-1.....	14
I. 6. 1. Células Th17	14
I. 6. 2. Células T regulatorias (Treg)	15
I. 6. 3. Relación Th17/Treg	16
I. 6. 4. Rol de las células Th17 y de la relación Th17/Treg en la progresión a enfermedad durante la infección por HIV-1	17
I. 6. 5. Relación entre la subpoblación de células Th17 y el balance Th17/Treg y la respuesta celular T adaptativa antiviral.....	18
I. 6. 6. Efecto de la terapia antirretroviral sobre el reestablecimiento de las subpoblaciones de células Th17 y Treg	19
I. 7. INMUNIDAD EN EL TRACTO GENITAL FEMENINO.....	20
I. 7. 1. Infección por HIV-1 en el tracto genital femenino	21
II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	23
II. 1. HIPÓTESIS GENERAL DE TRABAJO.....	24
II. 2. OBJETIVO GENERAL I	24
II. 2. 1. Objetivos específicos I	24
II. 3. OBJETIVO GENERAL II	25
II. 3. 1. Objetivos específicos II	25

III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
III. 1. POBLACIÓN EN ESTUDIO	27
III. 2. PROCESAMIENTO DE MUESTRAS DE SANGRE PERIFÉRICA	31
III. 3. ESTÍMULOS UTILIZADOS EN LOS DIFERENTES ENSAYOS.....	32
III. 3. 1. Anticuerpos	32
III. 3. 2. Péptidos.....	33
III. 3. 3. Mitógenos.....	34
III. 4. MARCACIONES CELULARES Y ANÁLISIS POR CITOMETRÍA DE FLUJO	34
III. 4. 1. Procedimiento general y reactivos utilizados	34
III. 4. 2. Análisis inicial común a todos los ensayos	35
III. 4. 3. Ensayos realizados para la identificación de las diferentes subpoblaciones linfocitarias de interés	36
<i>III.4.3.1. Identificación de células T CD4⁺ y T CD8⁺ productoras de IL-17A e IFN-γ tras una estimulación policlonal</i>	<i>36</i>
<i>III.4.3.2. Identificación de células Treg.....</i>	<i>37</i>
<i>III.4.3.3. Evaluación de los niveles de activación inmune celular.....</i>	<i>39</i>
<i>III.4.3.4. Identificación de la subpoblación de células T CD4⁺ CD161⁺, precursoras de células Th17 que migran a intestino, tras una estimulación policlonal</i>	<i>39</i>
<i>III.4.3.5. Evaluación de la polifuncionalidad de la población celular T CD8⁺ específica frente a HIV-1: capacidad de degranulación (expresión de los marcadores CD107_{A/B} en membrana) y secreción simultánea de IFN-γ</i>	<i>40</i>
<i>III.4.3.6. Evaluación del fenotipo de agotamiento (evidenciado por la presencia del marcador de superficie PD-1) en la población T CD8⁺ HIV-específica</i>	<i>41</i>
III. 5. ENSAYO DE SUPRESIÓN VIRAL (VIA, VIRAL INHIBITORY ACTIVITY)	43
III. 6. CUANTIFICACIÓN DE FACTORES SOLUBLES EN PLASMA	45
III. 7. OBTENCIÓN Y PROCESAMIENTO DE MUESTRAS DE TRACTO GENITAL FEMENINO ...	45
III. 7. 1. Obtención de mediadores solubles de inflamación mediante la toma de un hisopado de exocervix.....	46
III. 7. 2. Obtención de células mononucleares de cérvix (CMCs) mediante la toma de dos citocepillos endocervicales	46
III. 7. 3. Detección de citoquinas características de los perfiles celulares Th17 y Treg en sobrenadantes de CMCs estimuladas.....	47
<i>III.7.3.1. Cuantificación de IL-17A, IL-17F, IL-21 e IL-10 mediante una matriz de nanopartículas fluorescentes acopladas a anticuerpos específicos (CBA, cytokine bead array, BD Biosciences).....</i>	<i>47</i>

III. 7. 4. Detección de citoquinas proinflamatorias en sobrenadante de hisopados exocervicales.....	50
III.7.4.1. Cuantificación simultánea de seis mediadores solubles en muestras de exocervix mediante la técnica de CBA.....	50
III.7.4.2. Cuantificación de proteínas totales en muestras de hisopado de exocervix mediante el ensayo de ácido bicinconínico (BCA, biconchonic acid).....	50
III. 8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	51
IV. RESULTADOS	52
IV. 1. <i>PARTE I</i> : ESTUDIO DE LAS SUBPOBLACIONES TH17, T _{REG} Y SU BALANCE EN MUESTRAS DE SANGRE PERIFÉRICA DURANTE LA INFECCIÓN AGUDA/TEMPRANA POR HIV-1 Y SU RELACIÓN CON LA RESPUESTA T ANTIVIRAL PROTECTIVA.....	53
IV. 1. 1. Características de los individuos HIV ⁺ seleccionados.....	53
IV. 1. 2. La relación Th17/Treg se encuentra disminuida desde tiempos tempranos post-infección, mientras que las frecuencias de células Treg y Th17 se encuentran severamente alteradas en estadios avanzados de la infección por HIV-1 en comparación a lo observado en individuos HIV ⁻	55
IV. 1. 3. Los niveles basales de células Th17 se correlacionan tanto con la activación inmune de células T CD8 ⁺ como con la tasa de progresión a la enfermedad	57
IV. 1. 4. La preservación de la subpoblación de células Th17 se correlaciona positivamente con mejoras en los parámetros de seguimiento de la infección y progresión a la enfermedad, mientras que los niveles de células Treg se correlacionan con mayores cargas virales y activación de células T CD8 ⁺	59
IV. 1. 5. Mayores niveles basales de células Th17 se correlacionan con una mayor funcionalidad de la respuesta T CD8 ⁺ específica frente a HIV-1	62
IV. 1. 6. La funcionalidad de las células Th17 y la relación Th17/Treg detectadas a tiempos tardíos post-infección también influyen la calidad de las respuestas T CD8 ⁺ específicas frente a HIV-1	66
IV. 1. 7. Los niveles de células Th17 también se correlacionan con otras subpoblaciones de células T efectoras.....	68
IV. 2. <i>PARTE II</i> : ESTUDIO DEL IMPACTO DEL TRATAMIENTO ANTIRRETROVIRAL SOBRE LA RESTAURACIÓN DE LAS SUBPOBLACIONES DE CÉLULAS TH17, T _{REG} Y SU BALANCE EN SANGRE PERIFÉRICA Y TRACTO GENITAL FEMENINO.....	70
IV. 2. 1. Características de los individuos seleccionados	70
IV. 2. 2. El tratamiento antirretroviral restaura tanto el balance Th17/Treg como la proporción y funcionalidad de células Th17 en sangre periférica	71

IV. 2. 3. El tratamiento antirretroviral no logra restaurar la activación de células T CD4 ⁺ a los valores observados en dadores sanos. Una mayor activación celular se correlaciona con menores niveles de células Th17 y de la relación Th17/Treg y con mayores niveles de células Treg	73
IV. 2. 4. Durante la infección crónica causada por HIV-1, aún bajo tratamiento antirretroviral, se observa una restauración incompleta de la inmunidad en sitios de mucosas, en contraste a lo observado en sangre periférica.....	75
IV. 2. 5. En individuos crónicamente infectados bajo tratamiento antirretroviral, mayores niveles de citoquinas proinflamatorias detectadas en exocervix se correlacionan con una mayor activación inmune y una menor funcionalidad de células Th17 en sangre periférica	78
V. DISCUSIÓN	80
V. 1. PARTE I	81
V. 1. 1. Subpoblaciones de células Th17, Treg y balance Th17/Treg y su relación con los niveles de activación celular	81
V. 1. 2. Subpoblaciones de células Th17, Treg y balance Th17/Treg y su relación con la concentración plasmática de citoquinas/quimioquinas y con parámetros de seguimiento de la infección y progresión a enfermedad.....	82
V. 1. 3. Evaluación de las respuestas T CD8 ⁺ antivirales previamente asociadas con control viral: estudio de su relación con la subpoblación de células Th17 y el balance Th17/Treg durante la seroconversión y el primer año de infección	83
V. 1. 4. Potenciales causas de las relaciones observadas entre los niveles de células Th17 y la funcionalidad de la respuesta T CD8 ⁺ antiviral protectora.....	84
V. 2. PARTE II.....	85
V. 2. 1. Efecto del tratamiento antirretroviral sobre las subpoblaciones de células Th17, Treg y el balance Th17/Treg y su relación con los niveles de activación celular en sangre periférica	86
V. 2. 2. Efecto del tratamiento antirretroviral sobre la reconstitución inmune en sitios de mucosas	88
V. 2. 3. Relación entre los niveles de inflamación en exocervix y la activación celular sistémica en pacientes bajo tratamiento antirretroviral	90
V. 3. LIMITACIONES Y ALCANCES DEL ESTUDIO.....	92
VI. CONCLUSIONES	94
VII. REFERENCIAS	97

LISTADO DE FIGURAS Y TABLAS

FIGURAS

I. INTRODUCCIÓN

Figura 1: Esquema general de la distribución mundial de subtipos y formas recombinantes más prevalentes de cada región.

Figura 2: Esquema de la partícula viral madura.

Figura 3: Genoma proviral del HIV-1.

Figura 4: Esquema simplificado del ciclo de replicación del HIV-1.

Figura 5: Modelo de infección cervico-vaginal.

Figura 6: Curso natural de la infección por HIV-1.

Figura 7: Esquema general de la diferenciación y fenotipo de células Th17.

Figura 8: Esquema general de la diferenciación, fenotipo y función de células Treg.

Figura 9: Esquema ilustrativo de la regulación del balance Th17/Treg.

Figura 10: Componentes anatómicos e inmunológicos de tracto genital femenino.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Figura 11: Estrategia inicial utilizada para la selección y análisis por citometría de flujo de las poblaciones linfocitarias T CD4⁺ y T CD8⁺.

Figura 12: Estrategia de selección utilizada para la detección de células Th17.

Figura 13: Estrategia de selección utilizada para la detección de células Treg.

Figura 14: Ejemplos de la estrategia de selección utilizada para la evaluación de la población T CD8⁺ HIV-específica bifuncional IFN- γ ⁺ CD107_{A/B}⁺.

Figura 15: Estrategia de selección utilizada para la identificación de células T CD8⁺ HIV-específicas (productoras de citoquinas y con actividad citotóxica) que expresan el marcador de agotamiento PD-1.

Figura 16: Esquema del ensayo de supresión viral.

Figura 17: Esquema general de toma de muestras de cérvix.

Figura 18: Esquema general de los pasos del ensayo de CBA.

IV. RESULTADOS

Figura 19: Alteraciones en las subpoblaciones de células Th17 y Treg y en la relación Th17/Treg en diferentes estadios de la infección por HIV-1.

Figura 20: Evaluación de las subpoblaciones de células Th17 y Treg en pacientes de la cohorte de infección aguda/temprana que muestran distintos patrones de activación inmune y progresión a la enfermedad.

Figura 21: Correlaciones entre las subpoblaciones Th17 y Treg con parámetros de seguimiento de la infección halladas dentro de la cohorte de individuos PHI en muestras basales.

Figura 22: Correlaciones entre las subpoblaciones Th17 y Treg con parámetros de seguimiento de la infección halladas dentro de la cohorte de individuos PHI en muestras de seguimiento al año p.i.

Figura 23: Correlaciones entre las subpoblaciones Th17 y Treg con parámetros de seguimiento de la infección halladas en etapas crónicas de la infección por HIV.

Figura 24: Correlaciones entre los niveles basales de células Th17 y respuestas T CD8⁺ HIV-específicas previamente asociadas con protección.

Figura 25: Correlaciones entre los niveles basales de células Th17 y respuestas T CD8⁺ HIV-específicas previamente asociadas con protección detectadas al año p.i.

Figura 26: Los niveles de la subpoblación de células Th1 no se correlacionan con la respuesta T CD8⁺ HIV-específica.

Figura 27: Influencia de los niveles de células Th17 y la relación Th17/Treg en la calidad de la respuesta T CD8⁺ específica frente a HIV a tiempos tardíos p.i.

Figura 28: Correlaciones entre la subpoblación de células Th17 y otras poblaciones de células T efectoras evaluadas tras una estimulación policlonal.

Figura 29: Evaluación de las subpoblaciones de células T efectoras Th1, Tc1 y Tc17 durante la infección aguda por HIV.

Figura 30: Restauración de la proporción y funcionalidad de la subpoblación Th17 y de la relación Th17/Treg en individuos crónicamente infectados bajo tratamiento antirretroviral.

Figura 31: Niveles de activación inmune y correlaciones entre las subpoblaciones Th17 y Treg con parámetros de seguimiento de la infección halladas dentro del grupo de individuos crónicamente infectados bajo tratamiento antirretroviral.

Figura 32: Niveles de la subpoblación T CD4⁺ CD161⁺ en sangre periférica y producción de las citoquinas IL-17A, IL-17F, IL-21 e IL-10 tras la estimulación de células mononucleares de cérvix (CMCs).

Figura 33: Correlaciones entre los niveles de citoquinas proinflamatorias en exocervix y los niveles de activación inmune y la subpoblación de células Th17 evaluadas en sangre periférica.

TABLAS

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla 1: Características de los individuos HIV⁺ incluidos en este trabajo de tesis

V. RESULTADOS

Tabla 2: Características de los individuos infectados por HIV-1 reclutados para la Parte I

Tabla 3: Características de los individuos crónicamente infectados con HIV-1 seleccionados para la Parte II

ABREVIATURAS

aa: Aminoácido

ADN: Ácido desoxirribonucleico

APC: Alococianina (*Allophycocyanin*)

APC-Cy7: Alococianina cianina 7 (*Allophycocyanin cyanine 7*)

ARN: Ácido ribonucleico

ARNm: ARN mensajero

ARNsc⁺: ARN simple cadena con polaridad positiva

BCA: Ácido bicinconínico (*Bicinchoninic acid*)

BSA: Seroalbúmina bovina (*Bovine serum albumin*)

CBA: Matriz de nanopartículas para la detección de citoquinas (*Cytokine bead array*)

CCR5: Receptor de quimioquinas tipo 5 (*C-C chemokine receptor type 5*)

CEF: Citomegalovirus, Epstein Barr e Influenza (*Cytomegalovirus, Epstein Barr and Flu*)

CMCs: Células mononucleares de cérvix

CMH: Complejo mayor de histocompatibilidad

CRF: Formas recombinantes circulantes (*Circulating recombinant forms*)

CV: Carga viral

CXCL10/ IP-10: Proteína 10 inducida por IFN- γ (*IFN- γ -induced protein 10*)

CXCL12: Factor derivado de células estromales 1 o quimioquina con motivo C-X-C 12 (*C-X-C motif chemokine 12*)

CXCL1-3/ GRO: Ligando de quimioquina 1-3 (*Chemokine ligand 1-3*)

CXCR4: Receptor de quimioquinas tipo 4 (*C-X-C chemokine receptor type 4*)

DC: Célula dendrítica (*Dendritic cell*)

DMSO: Dimetilsulfóxido

DS: Donante seronegativo para la infección por HIV-1

EC: Controlador Elite (*Elite Controller*)

EDTA: Ácido etilendiaminetetraacético (*Ethylenediaminetetraacetic acid*)

EGF: Factor de crecimiento epidérmico (*Epidermal growth factor*)

- ELISA:** Técnica de inmunoabsorción ligado a enzimas (*Enzyme-linked immunosorbent assay*)
- FGF-2:** Factor de crecimiento de fibroblastos (*Fibroblast growth factor*)
- FITC:** Isotiocianato de fluoresceína (*Fluorescein isothiocyanate*)
- Flt-3:** Ligando de Flt-3
- FoxP3:** Factor de transcripción característico del linaje celular Treg (*Forkhead box P3*)
- FSC:** Dispersión frontal de la luz (*Forward scatter*)
- FSC-A:** Área de la dispersión frontal de la luz (*Forward scatter area*)
- FSC-H:** Altura de la dispersión frontal de la luz (*Forward scatter height*)
- GALT:** Tejido linfoide asociado a intestino (*Gut-associated lymphoid tissue*)
- G-CSF:** Factor estimulante de colonias de granulocitos (*Granulocyte colony-stimulating factor*)
- GM-CSF:** Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (*Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*)
- HAART:** Tratamiento antirretroviral de alta eficacia (*Highly active antiretroviral treatment*)
- HEPES:** Solución tamponada de ácido 2-[4-(2-hidroxietil)piperazin-1-il] etansulfónico
- HESN:** Individuos altamente expuestos no infectados (*HIV-1-exposed seronegative*)
- HIV:** Virus de la inmunodeficiencia humana (*Human Immunodeficiency Virus*)
- IFN:** Interferón
- IL:** Interleuquina
- IMFr:** Intensidad media de fluorescencia relativa
- IQ:** Rango intercuartil (*Interquartile range*)
- Kb:** Kilobases
- LTNP:** Individuos no progresores a largo plazo (*Long term non progressors*)
- LTR:** Repeticiones terminales largas (*Long terminal repeats*)
- MCP:** Proteína quimiotáctica de monocitos (*Monocyte chemoattractant protein*)
- MDC/ CCL22:** Quimioquina derivada de macrófago (*Macrophage-derived chemokine*)
- MIP:** Proteína inflamatoria de macrófagos (*Macrophage inflammatory protein*)
- moi:** Multiplicidad de infección (*Multiplicity of infection*)

NIH: Institutos Nacionales de Salud de EEUU (*National Institutes of Health*)

NK: Células *Natural Killer*

ORF: Marco de lectura abierto (*Open reading frame*)

p.i: post-infección

PBMCs: Células mononucleares de sangre periférica (*Peripheral blood mononuclear cells*)

PBS: Solución tamponada de fosfato (*Phosphate buffer saline*)

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

PE: Ficoeritrina (*Phycoerythrin*)

PE-Cy7: Ficoeritrina cianina 7 (*Phycoerythrin cyanine 7*)

PerCP: Proteína pteridinín-clorofila (*Peridinin chlorophyll protein*)

PFA: Paraformaldehído

PHA: Fitohemaglutinina (*Phytohemagglutinin*)

PHI: Infección aguda/temprana por HIV (*Primary HIV infection*)

PKC: Proteína C quinasa (*Protein kinase C*)

PMA: Forbol 12-miristato 13-acetato (*Phorbol myristate acetate*)

PRs: progresores rápidos (individuos de la cohorte PHI cuyos recuentos de células T CD4⁺ decaen por debajo de 350 células/ μ l en algún momento durante el primer año de infección)

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

PTs: progresores típicos (individuos de la cohorte PHI cuyos recuentos de células T CD4⁺ se mantienen por encima de 350 células/ μ l durante el primer año de infección)

ROR: Receptor huérfano relacionado a RAR (*RAR-related orphan receptor*)

rpm: Revoluciones por minuto

sCD40L: Ligando de CD40 soluble (*Soluble CD40 ligand*)

SFB: Suero fetal bovino

SIDA: Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida

sIL-2R α : Cadena α del receptor para IL-2 soluble (*Soluble IL-2R α*)

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

SSC: Refracción del láser (*Side scatter*)

TARV: Tratamiento antirretroviral

Tc1: Células T CD8⁺ que producen principalmente IFN- γ (*T cytotoxic 1 cells*)

Tc17: Células T CD8⁺ que producen principalmente IL-17 (*T cytotoxic 17 cells*)

TCR: Receptor de células T (*T-cell receptor*)

TG: Tracto genital

TGF: Factor de crecimiento tumoral (*Tumor growth factor*)

Th1: Células T CD4⁺ colaboradoras que producen principalmente IFN- γ (*T helper 1 cells*)

Th17: Células T CD4⁺ colaboradoras que producen principalmente IL-17 (*T helper 17 cells*)

Th2: Células T CD4⁺ colaboradoras que producen principalmente IL-4 (*T helper 2 cells*)

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

Treg: Células T CD4⁺ regulatorias o supresoras (*Regulatory T-cells*)

VEGF: Factor de crecimiento del endotelio vascular (*Vascular endothelial growth factor*)

VI A: Actividad de supresión de la replicación viral (*Viral inhibitory activity*)

vs.: versus

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). Los primeros casos documentados y la descripción clínica de la enfermedad datan de 1981 en Estados Unidos^{1,2}. En los años subsiguientes se dio la intensa búsqueda del agente etiológico de la enfermedad, siendo el grupo francés liderado por *Luc Montagnier* y *Françoise Barré-Sinoussi* el primero en aislar un retrovirus a partir de una muestra proveniente de un varón homosexual con SIDA en 1983³, hallazgo que les valió el Premio Nobel en 2008. Posteriormente, se describieron otros aislamientos virales⁴⁻⁶ y estudios de microscopía electrónica revelaron que la morfología de los virus era muy similar entre sí y con un género particular de la familia *Retroviridae*, los Lentivirus⁷. Finalmente se determinó que los aislamientos correspondían al mismo agente viral y, en 1986, el Comité Internacional de Taxonomía Viral nombró al virus de la manera que hoy se lo conoce: HIV. Ese mismo año, *Clavel*, *Montagnier* y colaboradores^{8,9} 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 morbilidad¹⁰.

A pesar de los esfuerzos médicos y científicos realizados durante los 34 años que han transcurrido desde la descripción de los primeros casos hasta la actualidad, la problemática HIV/SIDA ha afectado a más de 75 millones de personas y continúa siendo una gran problemática de Salud Pública a nivel mundial.

I. 2. EPIDEMIOLOGÍA

Se estima que desde el inicio de la pandemia, más de 70 millones de personas han sido infectadas con HIV-1. Datos provenientes del Programa Conjunto de las Naciones Unidas sobre el HIV/SIDA¹¹ indican que, a fines del año 2014, 36,9 millones de personas vivían con HIV en todo el mundo, mientras que 2 millones de nuevas infecciones y 1,2 millones de muertes habrían ocurrido durante ese mismo año a causa de la enfermedad. Cabe destacar

que el 70% de las personas afectadas por el HIV/SIDA se concentra en África Subsahariana, donde la prevalencia en personas entre 15 y 49 años es del 4,8% (4,5%-5,1%), mientras que en otras regiones geográficas como América Latina la prevalencia es del 0,4% (0,4%-0,5%).

Los últimos datos epidemiológicos globales, en relación a lo reportado en años anteriores, indicarían una estabilización de la pandemia. El número de casos de nuevas infecciones por HIV ha disminuido en todo el mundo (35% desde el 2000 al 2014), y este descenso es más marcado en el caso de los niños (caída del 58% del 2000 al 2014). Asimismo, los casos de muertes por SIDA disminuyeron en un 42% desde su pico en el 2004. Sin dudas, el mayor acceso al tratamiento antirretroviral (TARV) ha sido un factor determinante para mejorar la situación actual de la epidemia de HIV (se estima que un 42% del total de adultos viviendo con HIV se encontraban bajo tratamiento en 2014), siendo clave la administración del mismo desde etapas tempranas de la infección y en embarazadas (reduciendo la probabilidad de transmisión vertical).

En nuestro país, según el boletín del Ministerio de Salud sobre HIV/SIDA y Enfermedades de Transmisión Sexual¹² de diciembre de 2014, se calcula que alrededor de 110 mil personas viven con HIV-1, de las cuales el 30% desconoce su diagnóstico. Cada año se notifican alrededor de 6.000 nuevos casos, en una relación de 2,1 varones por cada mujer diagnosticada. En cuanto a la transmisión vertical, los porcentajes han disminuido notoriamente pero aún se reporta que el 6% de los niños expuestos adquieren HIV.

I. 2. 1. EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR

Según la base de datos de HIV de *Los Alamos National Laboratory*¹³, los Lentivirus que infectan a primates incluyen: (i) Virus de Inmunodeficiencia de Simio (SIV, *Simian Immunodeficiency Virus*), (ii) HIV-2 y (iii) HIV-1, siendo aceptado que la presencia de los dos últimos 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*, responsable del mayor número de infecciones) el grupo O (*outlier*), el N (*new*) y el P¹⁴. El grupo M se ha diversificado, a su vez, en al menos 9 subtipos y 61 formas

recombinantes circulantes (CRF, *circulating recombinant forms*)¹⁵. 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 recombinación¹⁶. Los subtipos presentan entre sí algunas diferencias en su distribución geográfica¹⁷ (Figura 1), siendo el subtipo B y la CRF_BF las variantes más prevalentes en Argentina y en nuestra región.

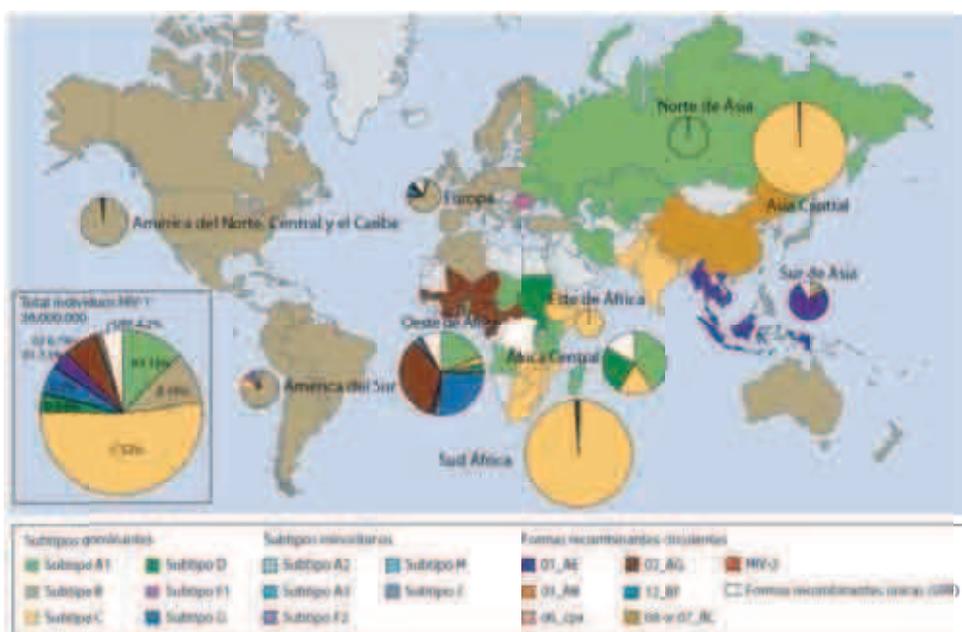


Figura 1: Esquema general de la distribución mundial de subtipos y formas recombinantes más prevalentes de cada región¹⁷. En Europa predomina el subtipo B. En África se encuentran todos los subtipos del grupo M y se han informado casos pertenecientes al grupo O, N y P. América del Sur está caracterizada por la circulación del subtipo B en la región noroeste (al igual de lo que se observa en América Central y América del Norte). En el Cono Sur pueden hallarse variantes pertenecientes a los subtipos B, C y F y recombinantes CRF_BF.

I. 3. EL VIRIÓN: MORFOLOGÍA, GENOMA Y CICLO DE REPLICACIÓN

Según el Comité Internacional de Taxonomía de Virus, el HIV pertenece a la familia *Retroviridae*, subfamilia *Orthoretrovirinae* del género *Lentivirus*. Es un virus complejo, caracterizado por la morfología del virión con núcleo (o *core*) cilíndrico o cónico. La partícula viral madura es esférica, envuelta por una membrana lipídica de origen celular, de aproximadamente 100 a 120 nm de diámetro¹⁸. Su genoma está compuesto por dos moléculas lineales de ácido ribonucleico simple cadena de sentido positivo (ARNsc⁺), cada una de 9,5 kilobases (kb) aproximadamente, con secuencias casi idénticas que funcionan

como un genoma diploide. La partícula viral se encuentra conformada por la envoltura, una matriz proteica y la cápside que contiene los ácidos nucleicos en su interior (Figura 2).

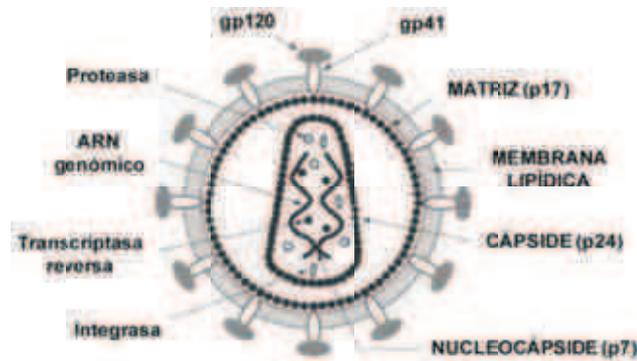


Figura 2: Esquema de la partícula viral madura. Se indican algunas de las proteínas estructurales.

La envoltura es una bicapa lipídica proveniente de la célula huésped que presenta espículas altamente glicosiladas que consisten en trímeros del complejo formado por la glicoproteína de superficie gp120 y la glicoproteína transmembrana gp41¹⁹. Por debajo se encuentran la matriz, compuesta por la proteína p17, y la cápside, una estructura icosaédrica constituida por la proteína p24. Finalmente, dentro de la cápside, se alojan las dos copias idénticas del ARNsc⁺ viral formando la nucleocápside con la proteína estructural p7 y las enzimas necesarias para la replicación viral: la transcriptasa inversa, la integrasa y la proteasa^{18,19}.

El ciclo de replicación del virus inicia típicamente cuando una partícula de HIV se une a la molécula CD4 en la superficie de una célula T activada, mediante la interacción con la glicoproteína viral gp120. Esta unión induce un cambio conformacional en gp120 que induce la interacción de la glicoproteína gp41 con una segunda molécula en la superficie celular o correceptor²⁰. Los 2 correceptores de HIV-1 son: el receptor de quimioquinas tipo 5 (CCR5, *C-C chemokine receptor type 5*) y el receptor de quimioquinas tipo 4 (CXCR4, *C-X-C motif chemokine 12*), los cuales determinan el tropismo viral (variantes R5-trópicas y X4-trópicas, respectivamente)²¹⁻²³. Tras la interacción entre gp41 y el correceptor, la envoltura del virus se fusiona con la membrana celular, permitiendo la entrada del virus a la célula²⁴. Una vez

que el virus se encuentra en el citoplasma celular, la transcriptasa reversa viral cataliza la generación de ADN doble cadena a partir del ARN viral, el cual es translocado al núcleo y se integra al genoma celular (provirus)²⁰. En la *Figura 3* se muestra en forma resumida el genoma proviral del HIV.



Figura 3: Genoma proviral del HIV-1 (9,2 Kb)²⁵. Contiene marcos de lectura abiertos (ORFs, *open reading frames*) para 16 proteínas que son sintetizadas a partir de al menos 10 transcritos. Existen 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*). La región *gag* codifica las proteínas estructurales a través de dos precursores que, luego de ser post-traduccionamente procesados mediante clivaje proteolítico, producen las proteínas maduras de matriz, nucleocápside, p24, p1, p2 y p6. La región *pol* codifica la enzima transcriptasa reversa, la integrasa y la proteasa. La región *env* codifica las glicoproteínas gp41 y gp120, las cuales forman el complejo que interacciona específicamente con el receptor celular. 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, que son responsables de regular, al menos en parte, la expresión de los genes virales.

Una vez que el genoma viral se ha integrado, los genes virales se transcriben a ARN mensajero (ARNm) y luego son transportados al citoplasma y traducidos a proteínas (*Figura 4*).

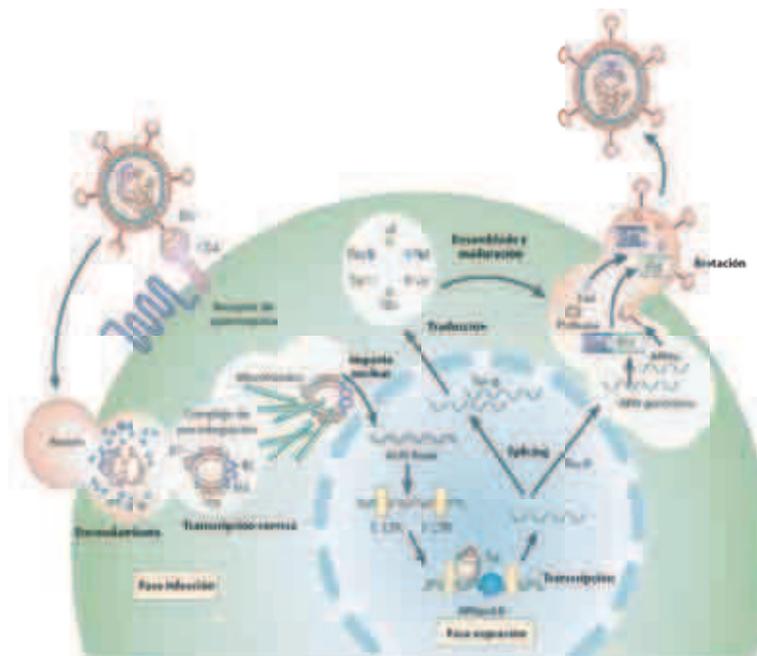


Figura 4: Esquema simplificado del ciclo de replicación del HIV-1²⁵. Se resaltan los eventos más sobresalientes.

Por último, el virus se ensambla y brota de la célula como una partícula viral inmadura, adquiriendo una envoltura que incluye proteínas celulares y del HIV. Esto permite la liberación del virus y su posterior maduración que resulta en una partícula viral infecciosa²⁰ (Figura 4).

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 efectoros $CD4^+$ $CCR5^{+26}$, macrófagos y células dendríticas (DCs, *dendritic cells*) ubicadas en la lámina propia²⁷ (Figura 5).

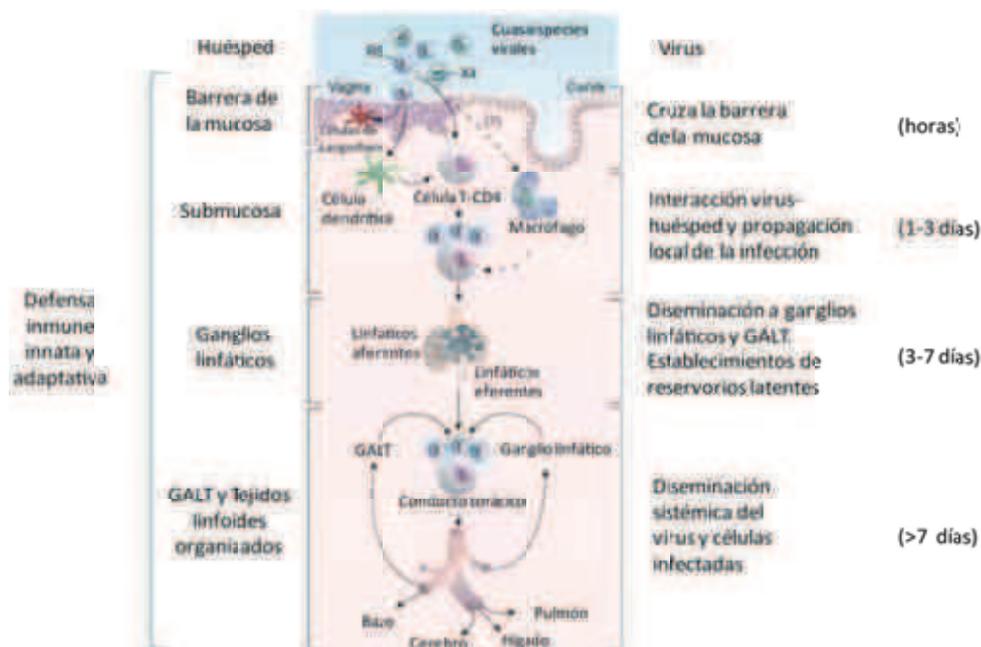


Figura 5: Modelo de infección cervico-vaginal²⁸. En primer lugar, el HIV cruza la barrera de la mucosa genital femenina a través de microabrasiones, lesiones de mayor magnitud (úlceras) o transcitosis. A las pocas horas, en la submucosa, el virus puede infectar una o unas pocas células en forma productiva (linfocitos T $CD4^+$, macrófagos o DCs). Una vez que el virus replica da lugar a una pequeña población fundadora y la propagación local temprana de la infección. Luego se disemina a los ganglios linfáticos y al tejido linfoide asociado a intestino (GALT, *gut-associated lymphoid tissue*) dentro del tercer y séptimo día post-infección (p.i), cuando ocurre además el establecimiento de los reservorios latentes. En última instancia, linfocitos infectados o viriones migran desde los ganglios linfáticos a diferentes órganos, y en particular, al GALT, donde ocurre una severa y rápida depleción, en la mayor parte de los casos irreversible, de linfocitos T $CD4^+$. Se indican cada una de las etapas propuestas de la infección por HIV (derecha) y el tejido del huésped en donde ocurre (izquierda). Entre paréntesis: el tiempo estimado en el que sucede cada evento una vez que el virus se encuentra en la mucosa del tracto genital.

Las variantes virales con tropismo R5 son las responsables de las nuevas infecciones en la mayoría de los casos. Las DCs residentes en las submucosas no sólo son sensibles a la infección sino que también facilitan la diseminación viral²⁹. La primera amplificación viral es modesta y ocurre en órganos linfáticos regionales drenantes. A partir de allí, los linfocitos T infectados y los viriones libres son volcados al torrente sanguíneo, permitiendo la colonización de otros órganos y la infección masiva de células susceptibles³⁰ (Figura 5). 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 otros³¹ (Figura 6). El descenso del pico de viremia y la reversión de los síntomas agudos son atribuidos a la acción de linfocitos T CD8⁺ citotóxicos HIV-específicos y, en menor medida, al agotamiento de células blanco.

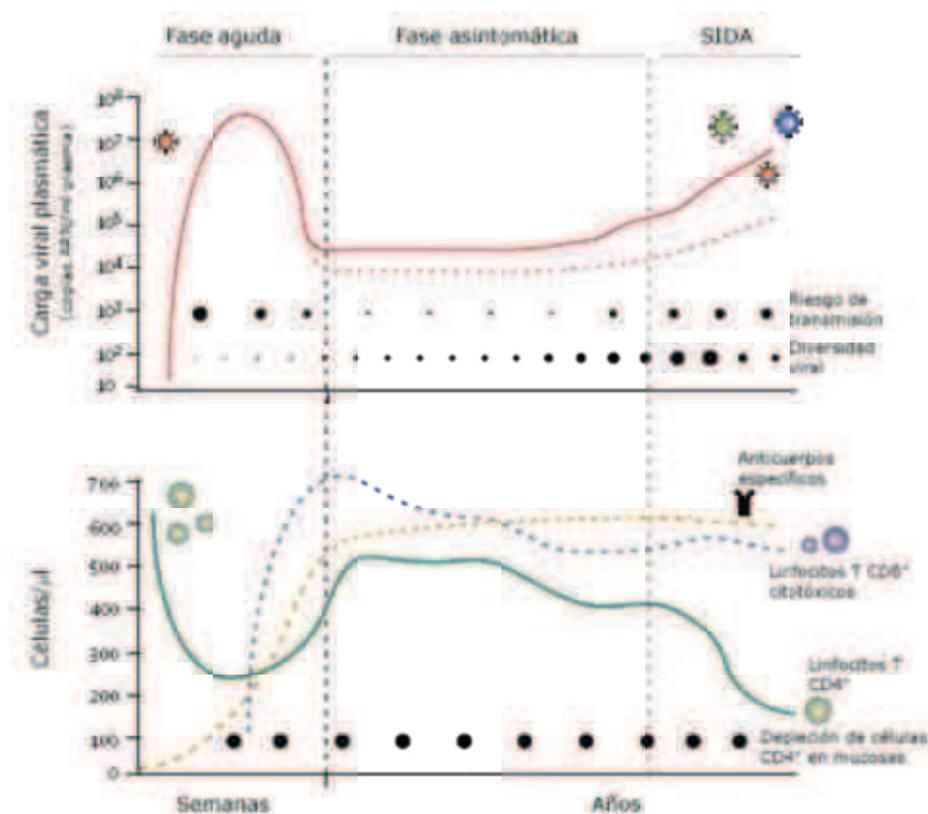


Figura 6: Curso natural de la infección por HIV-1³². La etapa aguda se caracteriza por una alta carga viral (CV, línea roja), descenso en el recuento de células T CD4⁺ y ausencia de anticuerpos específicos. Luego de la infección aguda, la CV se estabiliza en distintos niveles en diferentes pacientes (*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⁺ específicos. Los anticuerpos específicos aparecen posteriormente. La depleción de células T CD4⁺ que ocurre a nivel de mucosas, en la mayoría de los casos, no se recupera a lo largo del tiempo.

Esto es seguido por el establecimiento del *set point* viral, definido como el valor estable en el que se mantiene la carga viral (CV) plasmática cuando la misma desciende, luego de su pico máximo durante la infección aguda³³. El *set point* viral varía de persona en persona y es un potente predictor de la progresión a la enfermedad, hallándose una relación directa entre los niveles de CV plasmática en el pico máximo y el *set point* viral y una mayor tasa de progresión a enfermedad³⁴. La aparición de anticuerpos específicos en el suero de los pacientes es posterior al control inicial de la replicación viral (*Figura 6*) por lo que se cree que no desempeñarían un papel fundamental en este proceso de respuesta antiviral que ocurre a tiempos tempranos post-infección (p.i). A su vez, se ha descrito que los anticuerpos ampliamente neutralizantes (capaces de neutralizar diversos subtipos de HIV) son producidos por aproximadamente un 20% de los pacientes y son detectados a tiempos tardíos p.i en estos individuos³⁵. A tiempos tempranos p.i, la población viral es homogénea pero luego se diversifica generando una innumerable cantidad de cuasiespecies virales y dando origen a variantes de escape a la neutralización³⁶, a la acción de los linfocitos T CD8⁺ citotóxicos y también surgen variantes virales resistentes a drogas antirretrovirales.

Lo que distingue a la infección por HIV es la depleción progresiva de las células T CD4⁺³⁷ 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⁺ circulantes, seguida por una recuperación que alcanza valores cercanos a los normales, que luego disminuyen lentamente hasta llegar al 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 ha sido ampliamente descrito que ocurre una depleción masiva de células T CD4⁺ activadas³⁸. A lo largo del tiempo, esta población no se recupera ni siquiera en el marco del tratamiento antirretroviral de alta eficacia (HAART, *highly active antiretroviral treatment*) en la mayoría de los individuos, lo que se contrapone a lo observado para células T CD4⁺ circulantes en sangre periférica. Finalmente, la gran depleción de células en el tejido linfoide asociado a intestino (GALT, *gut-associated lymphoid tissue*) y el aumento de su permeabilidad, junto con la apoptosis de enterocitos,

conlleva a un aumento de la concentración en plasma de productos microbianos, como los lipopolisacáridos³⁹; esto 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 CV plasmática. Esta activación inmune generalizada y crónica está caracterizada por un incremento en la tasa de activación de células T CD4⁺ y CD8⁺ 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 proinflamatorias⁴⁰. En relación a la activación de células T CD8⁺, ha sido descrito que la expresión de las moléculas CD38 y HLA-DR se encuentra aumentada tras la infección con HIV y esta población activada incluye a las células T CD8⁺ HIV-específicas⁴¹.

A pesar de los grandes avances en torno al esclarecimiento de los distintos eventos que suceden durante la historia natural de la infección por HIV-1, los mecanismos y componentes del sistema inmune que contribuyen al control natural de la infección y progresión a SIDA en algunas personas infectadas, en contraste con la gran mayoría de los individuos que sufren una rápida progresión a la enfermedad, aún no han sido totalmente elucidados. La descripción de estos componentes claves y las interacciones entre ellos durante la infección por HIV-1 aún constituyen interrogantes cuyo esclarecimiento podría permitir el diseño de nuevas estrategias de control e incluso de erradicación de la enfermedad.

I. 5. RESPUESTA CITOTÓXICA T CD8⁺ ESPECÍFICA FRENTE A HIV-1

Durante la infección aguda por HIV-1, la respuesta por parte de los linfocitos T CD8⁺ se correlaciona con el declive inicial en la replicación del virus (ver *Figura 6*). Sin embargo, 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 TARV. Está bien establecido que aquellos individuos infectados que mantienen altos recuentos de linfocitos T CD4⁺ y se encuentran clínicamente sanos por largos períodos de tiempo (denominados no progresores

a largo plazo [LTNP, *Long-term non progressors*])^{42,43} son aquellos que presentan una respuesta T CD8⁺ robusta comparados con aquellos sujetos que progresan a la enfermedad; mostrando claras asociaciones entre la respuesta celular T CD8⁺ y el control viral. Dentro del grupo de LTNP, que representan de un 2 a un 5 % del total de individuos HIV⁺⁴⁴, se diferencian a aquellos que controlan la replicación viral hasta alcanzar niveles bajos (controladores virémicos) o indetectables (controladores elite, [EC, *Elite controllers*])^{45,46}. Los primeros reportes provenientes de macacos infectados con SIV, donde se eliminaron de manera temprana las células T CD8⁺, 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⁺^{47,48}, demostrando que esta población celular juega un rol crítico en el control de la replicación viral *in vivo*. Por lo tanto, una vez que la infección ya se ha establecido, la respuesta T CD8⁺ es crítica para el control de la replicación tanto de HIV como de SIV. En este contexto, los estudios en cohortes de individuos con infección aguda/temprana por HIV (PHI, *Primary HIV infection*) resultan de gran importancia para entender más acabadamente los procesos que tienen lugar durante la infección natural por HIV e identificar los procesos patogénicos tempranos que podrían influenciar la posterior progresión a enfermedad.

I. 5. 1. IMPORTANCIA DEL FENOTIPO Y FUNCIONALIDAD DE LA RESPUESTA T CD8⁺ ANTIVIRAL EN EL CONTROL DE LA PROGRESIÓN A SIDA

Diversos estudios que han analizado en profundidad la población de células T CD8⁺ durante la infección por HIV, sugieren que la habilidad de estas células de mediar control viral es multifactorial. Uno de estos factores es el fenotipo celular, en términos de las subpoblaciones de memoria involucradas y la expresión de marcadores de agotamiento celular⁴⁹⁻⁵². Las células T CD8⁺ comprenden una población celular que, en el contexto de la infección por HIV, presentan una complicada ruta de diferenciación. En este sentido, en un trabajo recientemente publicado por nuestro grupo se demostró que la maduración de células T CD8⁺ totales y HIV-específicas a diferentes subpoblaciones de memoria se encuentra alterada en individuos recientemente infectados, aunque en niveles menos

dramáticos a los observados durante la etapa crónica de la infección. Y, más importante aún, la magnitud de estas alteraciones en la maduración se tradujo en una menor capacidad de mediar mecanismos antivirales por parte de las células T CD8⁺, lo cual se asoció con una progresión temprana a enfermedad⁵³. Por otro lado, la expresión aumentada del marcador de muerte celular programada 1 (PD-1, *programmed cell death 1*) en células T CD8⁺ específicas para HIV ha sido consistentemente asociada con el agotamiento celular⁵⁴⁻⁵⁶. El análisis de la expresión de PD-1 en células T CD8⁺ totales y HIV-específicas en individuos recientemente infectados reveló una asociación no sólo con la progresión a enfermedad sino también con la diferenciación de células T CD8⁺ de memoria⁵³.

Otro factor involucrado en el control viral por parte de células T CD8⁺ es su especificidad, en términos de los antígenos virales que son blanco de la respuesta. A pesar de que la respuesta TCD8⁺ se caracteriza por ser sumamente amplia, la predominancia de la respuesta frente a una u otra proteína viral varía dependiendo de la etapa de la infección⁵⁷⁻⁵⁹. Reportes recientes muestran que aquellos individuos capaces de reconocer ciertos epítopes presentan *set points* virales más bajos. Más aún, la preservación de esta respuesta temprana ha sido asociada con una progresión lenta a la enfermedad y con un recuento de células T CD4⁺ estable⁵⁹. Los individuos EC presentan una respuesta T CD8⁺ dirigida ampliamente contra Gag y con una gran capacidad de mediar actividad antiviral^{58,60}. En este sentido, un trabajo recientemente publicado por nuestro grupo demostró que, durante la infección aguda/temprana, la presencia de mayores proporciones de células T CD8⁺ que reconocen el antígeno Gag (inmunodominancia temprana frente a Gag) se asociaba con la preservación del recuento de células T CD4⁺, en consonancia con una inmunodominancia de células T CD8⁺ Gag-específicas en individuos ECs y controladores virémicos⁶¹, relacionando de este modo la respuesta T CD8⁺ antiviral con el control natural de la progresión a enfermedad.

Finalmente, la calidad y funcionalidad de la respuesta T CD8⁺ HIV-específica constituyen factores determinantes en la capacidad de estas células de mediar control viral. Las propiedades mayormente asociadas con capacidad antiviral incluyen tanto la avidéz de la

respuesta como su capacidad de mediar la supresión de la replicación viral, de proliferar y secretar un amplio espectro de citoquinas y quimioquinas^{42,62-65}. Una forma de evaluar la potencia global de la respuesta antiviral consiste en medir la capacidad de células T CD8⁺ de suprimir la replicación viral en células T CD4⁺ autólogas *in vitro* (VIA, *Viral Inhibitory Activity*). Trabajos previos han evaluado VIA en células T CD8⁺ provenientes de individuos ECs, pacientes crónicamente infectados^{62,64-66} e incluso en estudios de vacunas en humanos y en simios^{65,67}. En esos estudios se demostró que VIA se correlaciona, por un lado, con la magnitud de la respuesta T CD8⁺ HIV-específica^{62,68} y, por otra parte, con mayores frecuencias de células T CD8⁺ capaces de degranular y producir simultáneamente mediadores como IFN- γ y MIP-1 β ^{65,67,68}. En concordancia con lo reportado por otros autores, nuestro grupo de trabajo demostró que las células T CD8⁺ de individuos EC son capaces de mediar una respuesta VIA de mayor magnitud en comparación a lo observado en pacientes crónicamente infectados. A su vez, se demostró que es posible detectar VIA a tiempos muy tempranos p.i en pacientes PHI y que esta actividad persiste en el tiempo⁶¹.

Las células T CD8⁺ poseen una gran capacidad de ejercer múltiples funciones, produciendo un amplio espectro de moléculas efectoras las cuales pueden afectar la replicación del virus. La polifuncionalidad se define como la habilidad de una célula de producir simultáneamente dos o más moléculas efectoras y ha sido asociada con la capacidad de células T CD8⁺ de mediar control viral^{42,69,70}. También ha sido demostrado que los individuos que poseen altos porcentajes de células polifuncionales presentan altos niveles de perforinas y un mayor recuento de células T CD4⁺⁷¹. En otros importantes estudios, se observó que la capacidad de células T CD8⁺ de degranular (evaluado mediante citometría de flujo por la movilización de las moléculas CD107_A y CD107_B) se asociaba con su actividad antiviral^{61,69}. Los marcadores CD107_{A/B} se expresan en la superficie celular cuando se produce la descarga de gránulos líticos durante la lisis de células blanco, y su detección en células T CD8⁺ se correlaciona fuertemente con su actividad citotóxica⁷². Notablemente, en un trabajo previo de nuestro grupo, una mayor capacidad de células T CD8⁺ Gag-específicas de expresar los marcadores CD107_{A/B} y secretar IFN- γ simultáneamente, se correlacionó con una mayor magnitud de VIA⁶¹.

I. 6. CÉLULAS TH17 Y T REGULATORIAS EN LA INFECCIÓN POR HIV-1

I. 6. 1. CÉLULAS TH17

La subpoblación de linfocitos T CD4⁺ Th17 (*T helper 17 cells*) se caracteriza por producir predominante IL-17A e IL-17F. En humanos, la generación de células Th17 a partir de linfocitos T *naïve* requiere de la estimulación con IL-6, IL-1 β e IL-21 en presencia de TGF- β ^{73,74}, y su posterior expansión y estabilización se encuentran mediadas por IL-23⁷⁵⁻⁷⁸, todo ello en virtud de la expresión de los factores de transcripción “huérfanos” relacionados a RAR (ROR γ t y ROR α , *RAR-related orphan receptors γ t and α*) que caracterizan a este linaje celular⁷⁹ (Figura 7).

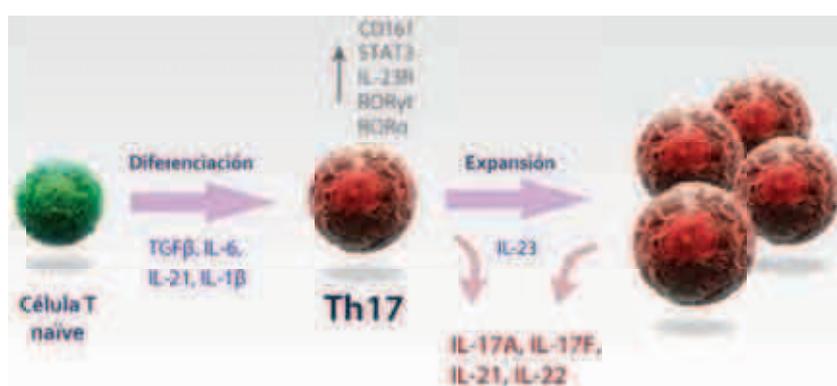


Figura 7. Esquema general de la diferenciación y fenotipo de células Th17. Se indica el proceso de diferenciación a partir de una célula T CD4⁺ *naïve* y su posterior expansión y estabilización. Se indican las citoquinas requeridas para la generación de estas células a partir de linfocitos T CD4⁺ *naïve* (azul) y las mayormente secretadas por la subpoblación Th17 (rojo). Adicionalmente se indican los marcadores moleculares que caracterizan a esta subpoblación (gris). Adaptado del sitio oficial de *BioLegend*.

Mediante la producción de IL-17, las células Th17 participan de la respuesta proinflamatoria en mucosas frente a infecciones bacterianas y fúngicas. Por un lado contribuyen al mantenimiento de las barreras de mucosas (ya que migran hacia tejido intestinal⁸⁰), donde promueven el reclutamiento de neutrófilos, el incremento en la expresión de quimioquinas^{81,82} y el fortalecimiento de las uniones estrechas entre las células epiteliales de la mucosa⁸³. Asimismo, son capaces de inducir la producción de metaloproteinasas de matriz y péptidos antimicrobianos⁸⁴.

I. 6. 2. CÉLULAS T REGULATORIAS (TREG)

La subpoblación particular de células T, conocidas como Treg, poseen una capacidad regulatoria/supresora “profesional”, la cual previene la activación y la función efectora de células T autorreactivas que han escapado a otros mecanismos de tolerancia⁸⁵⁻⁸⁷. Las Treg se caracterizan por la expresión de los marcadores de superficie CD4⁺ CD25⁺ y el factor de transcripción característico FoxP3 (*Forkhead box P3*), el cual es crítico para la diferenciación y desarrollo de este linaje y para su función regulatoria/supresora^{88,89}. A grandes rasgos, pueden diferenciarse dos tipos de Treg que expresan FoxP3: las Treg naturales que derivan del timo, de donde emigran expresando el factor de transcripción, y las Treg inducibles que son inducidas en periferia⁹⁰ (*Figura 8*). Las citoquinas TGF- β e IL-2 son cruciales tanto para la diferenciación de células T *naïve* hacia el perfil Treg como para su posterior expansión^{91,92}. Numerosos estudios han identificado a las células Treg como importantes inmunomoduladores en enfermedades autoinmunes e inflamación⁹³⁻⁹⁵. Los mecanismos supresores identificados incluyen: la secreción de citoquinas anti-inflamatorias, la expresión de receptores inhibitorios y la privación de citoquinas⁹⁶. Las dos citoquinas comúnmente asociadas al perfil Treg son IL-10 y TGF- β ^{96,97}.

TGF- β participa, principalmente, en la generación y mantenimiento de las Treg^{98,99}. La IL-10 posee efectos inmunosupresores mediados por su influencia sobre células presentadoras de antígeno, en las cuales regula negativamente la expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) tipo II¹⁰⁰ y de las moléculas co-estimuladoras CD80/CD86 y CD28¹⁰¹. Adicionalmente, reduce la liberación de citoquinas proinflamatorias por parte de mastocitos y macrófagos, y suprime su funcionalidad y activación¹⁰¹⁻¹⁰³. Mediante la utilización de todos los mecanismos de supresión mencionados, las Treg juegan un rol preponderante en la recuperación de la homeostasis inmune tras la eliminación de los patógenos, protegiendo al hospedador de inmunopatologías causadas por infecciones crónicas.

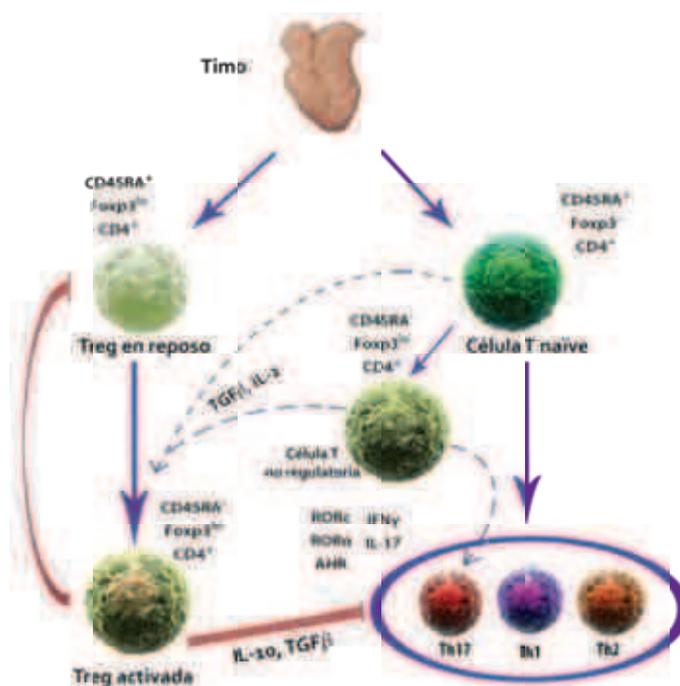


Figura 8. Esquema general de la diferenciación, fenotipo y función de células Treg. Hacia la izquierda se indican los marcadores de los fenotipos de "reposo" y "activación" de células Treg naturales, y las citoquinas más importantes involucradas en su función supresora. Hacia la derecha se indican los marcadores del fenotipo de células Treg inducidas en periferia y las moléculas involucradas en su diferenciación y funcionalidad. Adaptado del sitio oficial de *BioLegend*

I. 6. 3. RELACIÓN TH17/ TREG

Las subpoblaciones de linfocitos Th17 y Treg han ido reemplazando al paradigma Th1/Th2 que dominó el campo de la inmunología durante más de 20 años. Las células Th17 y Treg desempeñan roles opuestos en la respuesta frente a patógenos y sus caminos de diferenciación se encuentran recíprocamente modulados. TGF- β es una citoquina crítica para la diferenciación de ambos perfiles ya que, por sí sola, induce FoxP3^{75,104} y ROR γ t¹⁰⁵. En presencia de señales de infección para cuya eliminación se requiere de la subpoblación Th17, las citoquinas IL-6 o IL-21 se encontrarían presentes. En este escenario, se ha descrito que la expresión de FoxP3 inducida por TGF- β se reduce y la expresión de ROR γ t es aumentada^{75,105}. En el escenario opuesto, en ausencia de estímulos inflamatorios adecuados, TGF- β promueve la diferenciación de Treg capaces de mantener la tolerancia inmune. Este efecto se debe a la inhibición de ROR γ t mediada por FoxP3, que resulta en la inhibición de la expresión de IL-17 e IL-23¹⁰⁶ (Figura 9).

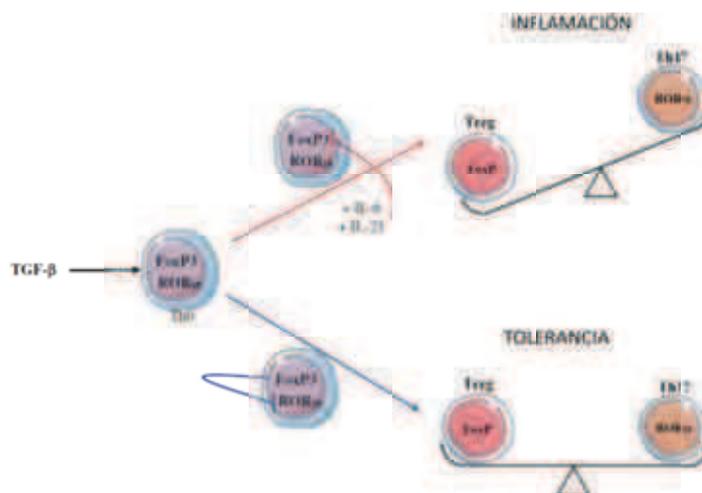


Figura 9. Esquema ilustrativo de la regulación del balance Th17/Treg¹⁰⁷.

Estos mecanismos cruzados de control de la diferenciación celular tienen como consecuencia el establecimiento de un balance entre ambas subpoblaciones que influye de forma determinante la respuesta inmune resultante. La relación Th17/Treg provee la base para esclarecer mecanismos inmunológicos que inducen y regulan procesos de autoinmunidad e inflamación crónica, así como también la resolución/contención de infecciones^{108,109}.

I. 6. 4. ROL DE LAS CÉLULAS TH17 Y DE LA RELACIÓN TH17/ TREG EN LA PROGRESIÓN A ENFERMEDAD DURANTE LA INFECCIÓN POR HIV-1

Estudios recientes han demostrado que las infecciones con SIV y HIV conducen a una depleción de las células Th17, y que ésta disminución es predictiva de progresión a enfermedad. Por un lado se ha reportado la depleción selectiva de esta subpoblación de células T tanto en GALT como en sangre periférica, en individuos infectados con HIV^{110,111}. A su vez, en modelos de infección de simios con SIV, tanto en las especies de monos con infecciones no patogénicas como en aquellos con infección patogénica pero con un buen control de la replicación viral, se ha descrito que mantienen valores normales de Th17 en mucosa intestinal y en sangre periférica^{112,113}. Se postula que la depleción de las células Th17 de la mucosa intestinal atentaría contra la integridad de la mucosa favoreciendo la translocación de productos microbianos al torrente sanguíneo generando la activación

inmune sistémica característica, observada en la inmunodeficiencia asociada a HIV¹¹⁴. En publicaciones recientes se describe que individuos LTNP poseen poblaciones normales de linfocitos T CD4⁺ en mucosa intestinal, incluyendo la subpoblación Th17¹¹⁵, y que, en contraste, existen relaciones inversas entre CV y la proporción de células Th17 o la expresión del receptor de IL-17 en sangre periférica¹¹⁶ en los individuos que muestran una progresión típica a enfermedad. Estos hallazgos avalan una asociación entre la preservación de la subpoblación Th17 tanto en mucosa intestinal como en periferia con la no progresión a enfermedad.

A su vez, diferentes trabajos recientes destacan la importancia del balance relativo entre las subpoblaciones Th17 y Treg en la inmunopatología de la enfermedad progresiva causada por HIV y SIV¹¹⁷. Estudios realizados en distintas cohortes de individuos con infección crónica, demuestran que la pérdida del balance entre Th17 y Treg está asociada con la progresión a enfermedad, en contraste a lo observado en individuos ECs en los cuales el mantenimiento de dicho balance a lo largo del tiempo y un bajo nivel de células Treg¹¹⁸ estuvieron asociados con el control natural de la infección. Cabe destacar que la mayor parte de los estudios descritos hasta el momento en los que se ha analizado la relación existente entre la inmunopatogénesis de HIV y la subpoblación celular Th17, se han llevado a cabo en grupos de pacientes con infección crónica ya sea virémicos o ECs¹¹⁹. Sin embargo es escasa la información en relación a éstos parámetros [Th17 versus (vs.) CV y recuento de células T CD4⁺] evaluados a tiempos cortos p.i con HIV (durante infección aguda).

I. 6. 5. RELACIÓN ENTRE LA SUBPOBLACIÓN DE CÉLULAS TH17 Y EL BALANCE TH17/ TREG Y LA RESPUESTA CELULAR T ADAPTATIVA ANTIVIRAL

Recientemente se ha demostrado, en el modelo de infección de macacos con SIV, la estrecha relación que existe entre el tamaño de la población celular Th17 pre-existente (en sangre y tejido intestinal) y el grado de replicación viral post-desafío¹²⁰. Los autores de ese trabajo muestran que aquellos animales que poseían mayores niveles de Th17 previos a la infección, mostraban una menor CV en el período de *set point* en comparación con los animales que tenían menores proporciones de Th17 inicialmente. Otro hallazgo interesante

descrito en ese estudio es la correlación que observan entre la inmunidad adaptativa antiviral y los niveles de Th17, observando una correlación directa entre mayores niveles de ésta subpoblación y la inducción de respuestas T CD8⁺ y CD4⁺ específicas más potentes. Incluso detectan una mayor polifuncionalidad en las células T CD4⁺ específicas en los animales con mayor proporción de Th17.

Otro estudio demostró que, tras el inicio de TARV, sólo en aquellos casos en los que la terapia lograba la efectiva restauración de los niveles de células T CD4⁺ en GALT, esto se asociaba con un aumento tanto en la subpoblación de células Th17 como en la polifuncionalidad de la respuesta T adaptativa específica frente a HIV¹²¹.

Sin embargo aún no existen reportes en los que se haya hecho un estudio en profundidad analizando la posible relación entre la población Th17 y el balance Th17/Treg con la respuesta T adaptativa antiviral en la infección por HIV. A su vez, el análisis de estos aspectos durante la infección aguda/temprana, resulta fundamental para evaluar el grado de influencia de la respuesta Th17 sobre la respuesta adaptativa antiviral.

I. 6. 6. EFECTO DE LA TERAPIA ANTIRRETROVIRAL SOBRE EL REESTABLECIMIENTO DE LAS SUBPOBLACIONES DE CÉLULAS TH17 Y TREG

Dada la importancia que poseen las interacciones entre las subpoblaciones celulares Th17 y Treg en el desarrollo de la infección por HIV, resulta relevante la evaluación del restablecimiento de la proporción de células Th17 y la normalización de la relación Th17/Treg tras el inicio del TARV. Se ha reportado que aún luego de conseguir una inhibición total de la CV tras el tratamiento, la restauración de la respuesta Th17 no se consigue en todos los pacientes^{121,122}. En un estudio publicado recientemente, los autores encuentran que la relación Th17/Treg está significativamente disminuida en las pacientes HIV antes de iniciar tratamiento mientras que luego de la terapia dicha proporción se normaliza parcialmente¹²³. Un trabajo realizado recientemente con un modelo *in vitro*¹²⁴ demuestra que, durante la infección con HIV permanecen células T CD4⁺ capaces de generar una respuesta Th17, proponiendo el uso de potenciales terapias inmunoterapéuticas en conjunto con el TARV para ayudar a restaurar la respuesta Th17 en

los pacientes HIV⁺ crónicamente infectados. Cabe destacar que la mayoría de los estudios se han centrado en la evaluación del grado de restauración de células Th17 y de la relación Th17/Treg alcanzado tras el inicio de TARV en periferia y GALT, mientras que aún no se ha estudiado lo que sucede con estas subpoblaciones en el tracto genital femenino (sitio donde ocurre el primer contacto con el virus tras su transmisión heterosexual).

I. 7. INMUNIDAD EN EL TRACTO GENITAL FEMENINO

El tracto genital (TG) femenino está compuesto por el tracto reproductivo superior, que incluye trompas de falopio, útero y endocervix, y el tracto reproductivo inferior, compuesto por el exocervix y el tracto vaginal (*Figura 10*). El tracto superior se encuentra delimitado por una capa simple de células epiteliales columnares unidas entre sí mediante uniones estrechas mientras que el tracto inferior está compuesto de un epitelio escamoso estratificado¹²⁵, y ambos constituyen barreras de protección frente a la invasión microbiana. La lámina propia, que se encuentra por debajo del epitelio, tanto en tracto inferior como superior, está compuesta principalmente de fibroblastos, vasos endoteliales y una variedad de células inmunes. El sistema inmune del TG femenino forma parte del sistema inmune común de mucosas y, como tal, posee muchas características en común con otros sitios, como la expresión de marcadores de reclutamiento o *homing*, inmunoglobulinas secretorias y células de la inmunidad innata residentes en los tejidos¹²⁶. Pero, adicionalmente, posee adaptaciones únicas y ha desarrollado mecanismos de protección del feto semi-alógeno del reconocimiento por parte del sistema inmune confiriendo, al mismo tiempo, protección contra patógenos transmitidos por vía sexual durante todo el ciclo menstrual. Las hormonas sexuales son los reguladores clave de las células inmunes y de las respuestas generadas en el TG femenino y son las responsables de los cambios cíclicos de la inmunidad en este sitio^{127,128}. Adicionalmente al microbioma de la mucosa, el TG cuenta con la secreción de péptidos antimicrobianos e IFN de tipo I¹²⁹.

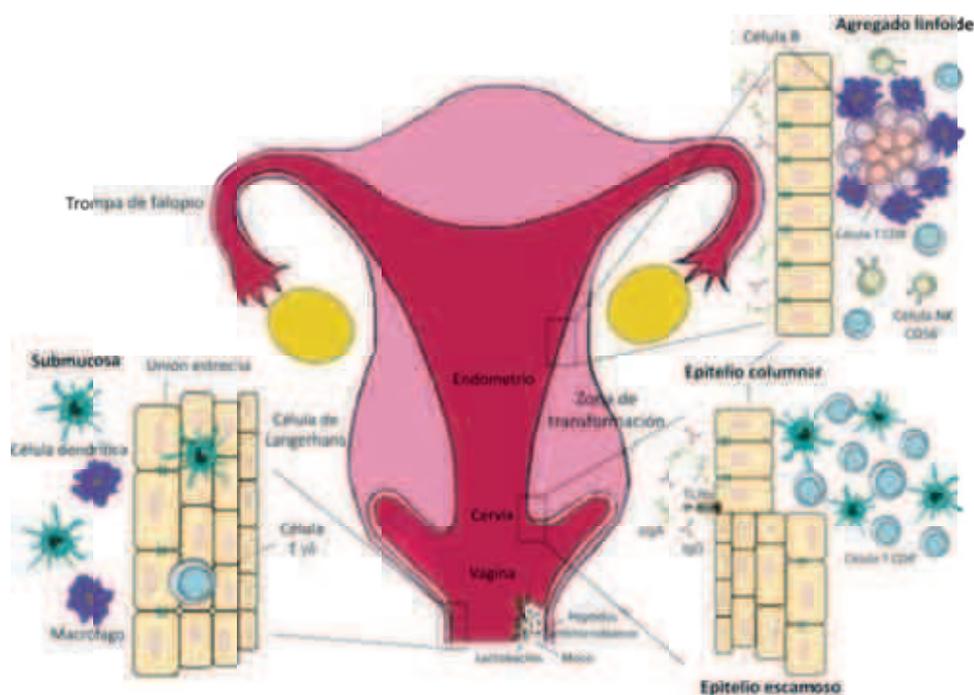


Figura 10. Componentes anatómicos e inmunológicos del tracto genital femenino¹³⁰.

Las células T CD4⁺ y CD8⁺ se encuentran a lo largo de todo el tracto genital. El endometrio uterino contiene agregados linfoides organizados que se localizan en el estrato de la capa basal (Figura 10)¹³¹. Estudios inmunohistológicos han permitido determinar que la mayoría de las células T se encuentran en el tracto inferior en la interfase estroma/epitelio (llamada “zona de transformación”) mientras que números significativos de células T CD8⁺ se encuentran esparcidas en el epitelio escamoso de la vagina y el exocervix¹³². El hallazgo de que existe una mayor cantidad de células T en la zona de transformación es importante a la luz de que esta zona es particularmente susceptible a la infección por HIV. Estudios recientes han demostrado la presencia tanto de células Treg como Th17 en el TG femenino¹³².

I. 7. 1. INFECCIÓN POR HIV-1 EN EL TRACTO GENITAL FEMENINO

Las mujeres representan un 50% del total de individuos infectados por HIV-1 a nivel mundial. A pesar de que la vía de transmisión vaginal tiene una tasa baja de riesgo de exposición por cada evento de riesgo, estimaciones recientes muestran que un 40% de las infecciones por HIV se inician en el TG femenino¹³³, la cual puede ocurrir tanto en el tracto

superior como inferior^{134,135}. En modelos experimentales con macacos se ha visto que, tras la inoculación del virus, se genera una respuesta proinflamatoria con producción de citoquinas y reclutamiento de linfocitos T CD4⁺, necesarios para la expansión del virus localmente y la posterior diseminación hacia el compartimiento sistémico^{136,137} (Figura 5). Asimismo, se ha sugerido que existe una relación entre la proporción de las distintas subpoblaciones de linfocitos T CD4⁺ presentes en el TG femenino, y que la interacción entre estos podría jugar un rol importante influyendo sobre la susceptibilidad a la infección. La adquisición de HIV-1 luego de la transmisión sexual podría aumentar debido a una mayor proporción de células Th17 susceptibles y/o a una mayor proporción de células T activadas en mucosas^{138,139}. Por todo esto, resulta de interés el poder analizar la proporción de células Th17 y/o la producción de la citoquina IL-17 en el TG femenino y su impacto sobre la infección con HIV y la progresión a enfermedad. A pesar de existir algunas evidencias, la caracterización de la población Th17 en mucosa cervical y su implicancia en la inmunopatogénesis de HIV es un tópico en el que aún queda mucho por dilucidar.

Por otro lado, muchas de las citoquinas y quimioquinas halladas en el tracto genital pueden interferir en la infección viral, como la quimioquina CXCL12 (capaz de inhibir cepas X4 de HIV) y las β -quimioquinas MIP-1 α y MIP-1 β (ligandos naturales del co-receptor viral CCR5 que pueden prevenir la infección por cepas R5). Mientras que se ha reportado que las concentraciones plasmáticas de citoquinas durante la infección aguda pueden predecir los valores de *set point*¹⁴⁰, otros estudios recientes indican que un ambiente inflamatorio a nivel de mucosa genital durante la infección aguda está asociado con valores de CV plasmática más altos y menores recuentos de células T CD4⁺¹⁴¹. En este sentido, se ha descrito que en mujeres altamente expuestas no infectadas (HESN, *HIV-1-exposed seronegative*), hay menores niveles de IL-17/IL-22 y de citoquinas proinflamatorias en mucosa cervical¹⁴². Dado que la mayoría de los estudios mencionados han utilizado muestras de cohortes de pacientes de Sudáfrica, la realización de estudios con pacientes pertenecientes a nuestra región (de distintas etnias y que poseen un *background* genético diferente al de las cohortes ya reportadas) aportará datos relevantes al conocimiento de la inmunopatogénesis de HIV-1 en el entorno de la mucosa genital.

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

A pesar de la relevancia de las subpoblaciones de células Th17 y Treg en la infección por HIV-1 y la progresión a SIDA, aún quedan ineludibles interrogantes. En este contexto se plantean la hipótesis y objetivos de este trabajo de tesis:

II. 1. HIPÓTESIS GENERAL DE TRABAJO

La preservación de la población celular Th17, tanto en mucosas como en periferia, y también de la relación Th17/Treg, constituyen factores inmunes determinantes en la funcionalidad de la respuesta inmune antiviral específica mediada por células T y en el desarrollo de una menor tasa de progresión de la enfermedad.

II. 2. OBJETIVO GENERAL I

Analizar la proporción de células Th17 y el balance Th17/Treg en individuos que se encuentran cursando diferentes estadios de la infección por HIV-1 y su potencial relación tanto con la funcionalidad de la respuesta celular T HIV-específica como con los niveles de activación inmune. En particular, establecer la asociación de estos parámetros en el contexto de la infección aguda/temprana por HIV-1 y el curso del primer año de infección.

II. 2. 1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS I

-  **OE1:** Cuantificar las subpoblaciones celulares Th17 y Treg en células mononucleares de sangre periférica (PBMCs, *peripheral blood mononuclear cells*) y caracterizar la relación Th17/Treg.
-  **OE2:** Evaluar el nivel de activación celular en PBMCs y el perfil inflamatorio de citoquinas/quimioquinas en plasma y analizar la relación de estos parámetros con los niveles de las subpoblaciones Th17, Treg y su balance.
-  **OE3:** Estudiar la relación entre los niveles de las subpoblaciones Th17 y Treg con parámetros de seguimiento de la infección y progresión a SIDA.
-  **OE4:** Analizar la relación de los niveles de las subpoblaciones Th17, Treg y su balance durante la infección aguda/temprana por HIV-1 con parámetros asociados a la calidad de la respuesta T CD8⁺ antiviral: (i) la proporción de células T CD8⁺ bifuncionales

capaces de degranular ($CD107_{A/B}^+$) y secretar IFN- γ simultáneamente, y (ii) la capacidad de células T $CD8^+$ de inhibir la replicación viral en células T $CD4^+$ autólogas (ensayo de VIA).

 **OE5:** Analizar la relación entre los niveles de la subpoblación de células Th17 durante el primer año de la infección por HIV-1 y las proporciones de células T efectoras de los perfiles Th1 ($CD4^+$ IFN- γ^+), Tc1 ($CD8^+$ IFN- γ^+) y Tc17 ($CD8^+$ IL-17 $^+$).

II. 3. OBJETIVO GENERAL II

Evaluar el impacto del TARV en el restablecimiento y funcionalidad de las subpoblaciones de células Th17, Treg y la relación Th17/Treg en sangre periférica y en mucosa del tracto genital femenino. Asimismo, analizar la relación de estos parámetros con los niveles de inflamación del tracto genital y de activación inmune celular a nivel sistémico.

II. 3. 1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS II

 **OE1:** Cuantificar las subpoblaciones celulares Th17 y Treg y su balance en PBMCs en el contexto de la infección crónica por HIV-1 en presencia y ausencia de TARV.

 **OE2:** Evaluar el impacto del TARV sobre el nivel de activación celular en PBMCs y analizar su relación con los niveles de las subpoblaciones Th17, Treg y su balance.

 **OE3:** Analizar el impacto del TARV en los niveles de células T precursoras de la subpoblación Th17 que migran a intestino (T $CD4^+$ $CD161^+$) en muestras de sangre periférica.

 **OE4:** Evaluar el impacto del TARV sobre la capacidad de células mononucleares de cérvix (CMCs) de secretar moléculas efectoras asociadas a los perfiles Th17 y Treg.

 **OE5:** Evaluar el perfil inflamatorio de citoquinas en mucosa del TG y analizar su relación con los niveles sistémicos de activación inmune celular y de las subpoblaciones Th17 y Treg en individuos bajo TARV.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III. 1. POBLACIÓN EN ESTUDIO

Un total de 132 individuos participaron de los estudios presentados en las Partes I y II de este trabajo de tesis: 34 dadores sanos seronegativos para la infección por HIV-1 (DSs) y 98 pacientes infectados por HIV-1, de los cuales 40 se encontraban cursando la etapa aguda/temprana de la infección (PHI), 26 eran individuos crónicamente infectados *naïve* de TARV (Crónicos o TARV⁻), 19 eran pacientes crónicamente infectados bajo TARV (TARV⁺) y 13 eran individuos definidos como ECs. Una parte de las muestras de los DSs fueron obtenidas del banco de sangre del Sanatorio Dr. Julio Méndez (Buenos Aires, Argentina), y todas provenían de individuos mayores de 18 años que completaron una encuesta sobre donación de sangre y fueron examinados para marcadores serológicos previo a su aceptación como donantes. La otra parte de las muestras fue obtenida en el Hospital General de Agudos “Dr. Juan A. Fernández” (Buenos Aires, Argentina) y su serología negativa para HIV-1 fue confirmada mediante dos técnicas de acuerdo al algoritmo aprobado para diagnóstico [prueba rápida *VIKIA HIV1/2 (bioMérieux SA)* seguida de la técnica de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA, *enzyme-linked immunosorbent assay*) *Genscreen ULTRA HIV Ag-Ab (BIO-RAD)* para la detección de anticuerpos y antígenos específicos de HIV-1 y HIV-2]. Los pacientes del grupo PHI fueron reclutados por el Grupo Argentino de Seroconversión bajo los siguientes criterios de inclusión¹⁴³: (i) una serología negativa seguida por una serología positiva para HIV-1, 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. Para algunos análisis, los individuos de la cohorte PHI fueron divididos en 2 subgrupos de acuerdo a si sus recuentos de células T CD4⁺ decaían, o no, por debajo de 350 células/ μ l en cualquier momento durante el primer año de infección, y fueron denominados progresores rápidos (PRs) y típicos (PTs), respectivamente. Los Crónicos fueron definidos como individuos con infección por HIV-1 establecida por más de 3 años, CV plasmática detectable (entre 500 y 500.000 copias de ARN/ml plasma), y *naïve* de TARV al momento de ser reclutados. Los pacientes del grupo TARV⁺ se definieron como individuos con infección por HIV-1 establecida por más de 3 años,

y que se encuentran desde hace al menos 2 años bajo algún régimen de terapia HAART, con supresión efectiva de la CV plasmática (menor a 50 copias de ARN/ml plasma). Los ECs se definieron como personas con infección por HIV-1 establecida por más de 5 años capaces de controlar la viremia en ausencia de intervención terapéutica con CV indetectable (menor a 50 copias de ARN/ml plasma), *naïve* de TARV, recuento de células T CD4⁺ mayor a 450 células/ μ l y sin historial de infecciones oportunistas y/o enfermedades marcadoras relacionadas a HIV/SIDA. En la *Tabla 1* se detallan las características más importantes de cada uno de los individuos HIV⁺.

Tabla 1: Características de los individuos HIV⁺ incluidos en este trabajo de tesis

Paciente	Sexo	Edad (años)	Estadio de la infección ^a	Días post-infección ^b	Carga Viral (CV) ^c		Recuento de células T CD4 ⁺ / μ l ^d	TARV ^e
					Copias de ARN viral/ml de plasma	Log ₁₀		
Infección aguda/temprana por HIV (PHI; n=40)								
PT 01	F	25	V	90	1810	3,26	499	NO
PT 02	F	21	VI	120	9018	3,96	587	NO
PT 03	M	ND	VI	180	<50	<1,70	786	NO
PT 04	M	41	VI	60	236570	5,37	496	NO
PT 05	M	23	V	30	>500000	>5,70	734	NO
PT 06	M	23	VI	60	37169	4,57	505	NO
PT 07	M	26	VI	150	256051	5,41	797	NO
PT 08	M	34	VI	60	>500000	>5,70	851	NO
PT 09	M	19	VI	90	67660	4,83	387	NO
PT 10	M	ND	VI	ND	46211	4,66	633	NO
PT 11	M	22	V	30	32918	4,52	748	NO
PT 12	M	31	VI	90	318838	5,50	655	NO
PT 13	M	35	VI	120	32473	4,51	500	NO
PT 14	M	33	VI	150	53303	4,73	393	NO
PT 15	M	24	V	60	16926	4,23	801	NO
PT 16	M	41	VI	120	61045	4,79	595	NO
PT 17	M	67	VI	120	13962	4,14	577	NO
PT 18	M	39	V	90	<50	<1,70	902	NO
PT 19	M	34	VI	90	8613	3,94	778	NO
PT 20	M	41	V	60	104	2,02	602	NO
PT 21	M	37	V	30	19522	4,29	525	NO
PT 22	F	29	V	30	>500000	>5,70	603	NO
PT 23	F	36	VI	150	28260	4,45	670	NO
PT 24	M	25	V	45	455417	5,66	698	NO

PT 25	F	20	VI	60	17420	4,24	685	NO
PT 26	F	31	V	75	9532	3,98	590	NO
PT 27	F	23	VI	60	116129	5,06	671	NO
PT 28	F	30	VI	90	64454	4,81	391	NO
PT 29	M	ND	VI	90	412	2,61	577	NO
PR 01	F	ND	VI	ND	199754	5,30	252	NO
PR 02	M	38	VI	150	255240	5,41	399	NO
PR 03	M	ND	VI	120	283825	5,45	282	NO
PR 04	M	34	ND	60	1315	3,12	504	NO
PR 05	F	36	VI	90	3662	3,56	303	NO
PR 06	M	44	VI	50	145002	5,16	308	NO
PR 07	M	48	III	30	>500000	>5,70	117	NO
PR 08	M	37	VI	50	98684	4,99	256	NO
PR 09	M	21	VI	60	242199	5,38	161	NO
PR 10	F	41	IV	30	>500000	>5,70	379	NO
PR 11	F	24	VI	30	102297	5,01	222	NO
Crónicos naïve de tratamiento antirretroviral (Crónicos o TARV; n=26)								
C 01	F	37	Crónico	-	22475	4,35	143	NO
C 02	F	28	Crónico	-	14784	4,17	139	NO
C 03	F	23	Crónico	-	253164	5,40	5	NO
C 04	F	43	Crónico	-	36399	4,56	555	NO
C 05	M	35	Crónico	-	4718	3,67	441	NO
C 06	F	34	Crónico	-	>500000	>5,70	4	NO
C 07	M	22	Crónico	-	2889	3,46	606	NO
C 08	M	26	Crónico	-	34395	4,54	4	NO
C 09	M	34	Crónico	-	>500000	>5,70	13	NO
C 10	M	46	Crónico	-	72888	4,86	29	NO
C 11	M	32	Crónico	-	139439	5,14	348	NO
C 12	M	48	Crónico	-	>500000	>5,70	44	NO
C 13	M	42	Crónico	-	23643	4,37	ND	NO
C 14	F	44	Crónico	-	159858	5,20	ND	NO
C 15	M	28	Crónico	-	2002	3,30	353	NO
C 16	M	ND	Crónico	-	21260	4,33	380	NO
C 17	F	ND	Crónico	-	477541	5,68	ND	NO
C 18*	F	36	Crónico	-	3887	3,59	222	NO
C 19*	F	36	Crónico	-	650	2,81	820	NO
C 20*	F	49	Crónico	-	1576	3,20	429	NO
C 21*	F	19	Crónico	-	10576	4,02	341	NO
C 22*	F	ND	Crónico	-	2372	3,38	793	NO
C 23	M	ND	Crónico	-	140288	5,15	341	NO
C 24	M	45	Crónico	-	15874	4,20	465	NO
C 25	M	30	Crónico	-	228020	5,36	698	NO

C 26	M	37	Crónico	-	>500000	>5,70	952	NO
Controladores Elite (EC; n=13)								
EC 01	M	48	Crónico	-	<50	<1,70	566	NO
EC 02	F	35	Crónico	-	<50	<1,70	912	NO
EC 03	M	30	Crónico	-	<50	<1,70	456	NO
EC 04	F	43	Crónico	-	<50	<1,70	602	NO
EC 05	F	54	Crónico	-	<50	<1,70	570	NO
EC 06	F	37	Crónico	-	<50	<1,70	817	NO
EC 07	M	38	Crónico	-	<50	<1,70	549	NO
EC 08	M	33	Crónico	-	<50	<1,70	595	NO
EC 09	F	50	Crónico	-	<50	<1,70	612	NO
EC 10	F	32	Crónico	-	<50	<1,70	562	NO
EC 11	F	43	Crónico	-	<50	<1,70	1261	NO
EC 12	F	28	Crónico	-	<50	<1,70	888	NO
EC 13	F	37	Crónico	-	<50	<1,70	1100	NO
Crónicos bajo tratamiento antirretroviral (TARV⁺; n=19)								
TARV ⁺ 01*	F	32	Crónico	-	<50	<1,70	479	SI
TARV ⁺ 02*	F	ND	Crónico	-	<50	<1,70	376	SI
TARV ⁺ 03*	F	37	Crónico	-	<50	<1,70	553	SI
TARV ⁺ 04*	F	23	Crónico	-	<50	<1,70	568	SI
TARV ⁺ 05*	F	37	Crónico	-	<50	<1,70	595	SI
TARV ⁺ 06*	F	26	Crónico	-	<50	<1,70	570	SI
TARV ⁺ 07*	F	42	Crónico	-	<50	<1,70	1199	SI
TARV ⁺ 08*	F	48	Crónico	-	<50	<1,70	141	SI
TARV ⁺ 09*	F	45	Crónico	-	<50	<1,70	292	SI
TARV ⁺ 10*	F	38	Crónico	-	<50	<1,70	220	SI
TARV ⁺ 11*	F	49	Crónico	-	<50	<1,70	389	SI
TARV ⁺ 12*	F	35	Crónico	-	<50	<1,70	564	SI
TARV ⁺ 13*	F	46	Crónico	-	<50	<1,70	596	SI
TARV ⁺ 14*	F	40	Crónico	-	<50	<1,70	643	SI
TARV ⁺ 15*	F	53	Crónico	-	<50	<1,70	917	SI
TARV ⁺ 16*	F	47	Crónico	-	<50	<1,70	534	SI
TARV ⁺ 17*	F	43	Crónico	-	<50	<1,70	758	SI
TARV ⁺ 18*	F	69	Crónico	-	<50	<1,70	556	SI
TARV ⁺ 19*	F	37	Crónico	-	<50	<1,70	564	SI
<p>^a: Los individuos de la cohorte PHI fueron clasificados de acuerdo a los estadios de Fiebig¹⁴⁴. Las siglas PR y PT distinguen a los individuos de la cohorte PHI que experimentaron, o no, una caída en sus recuentos de células T CD4⁺ por debajo de las 350 células/μl en cualquier momento durante el primer año p.i.</p> <p>^b: Sólo aplicable al grupo de individuos de la cohorte PHI.</p> <p>^c: <i>Versant HIV-1 RNA 3.0 assay</i>, Siemens. Los límites de detección negativo y positivo son 50 y 500.000 copias de ARN viral/ml de plasma, respectivamente (1.7 y 5.7 log₁₀).</p> <p>^d: Para los individuos de la cohorte PHI los datos corresponden a las muestras basales. Para los pacientes de los grupos C, TARV⁺ y EC, los datos corresponden a los obtenidos al momento de la toma de muestra.</p> <p>^e: Respecto a los individuos de la cohorte PHI, se refiere a la ausencia de tratamiento durante el primer año de infección. En relación a los pacientes de los grupos C y EC, los datos representan si los pacientes recibieron tratamiento alguna vez. Para los individuos TARV⁺, los datos indican si los pacientes se encuentran hace al menos 2 años bajo tratamiento antirretroviral con supresión efectiva de la CV plasmática.</p> <p>*: Indican pacientes de las que fueron obtenidas muestras de tracto genital femenino. F: femenino. M: masculino. ND: Datos no disponibles.</p>								

Los resultados presentados en las Partes I y II del presente trabajo de tesis forman parte de un estudio que fue evaluado y aprobado por los comités de ética de las siguientes instituciones: el Comité de Bioética y Docencia e Investigación del Hospital General de Agudos “Dr. Juan A. Fernández” (Buenos Aires, Argentina; protocolo CODEI 201115, 22/09/2014) y el Comité de Bioética de Fundación Huésped (Buenos Aires, Argentina). Todos los pacientes infectados por HIV-1, y los DSs reclutados en el Hospital General de Agudos “Dr. Juan A. Fernández”, firmaron un consentimiento informado aceptando participar del estudio, y las metodologías fueron aplicadas de acuerdo a las guías aprobadas.

III. 2. PROCESAMIENTO DE MUESTRAS DE SANGRE PERIFÉRICA

De cada individuo, al momento del reclutamiento, se obtuvo una muestra de sangre periférica (entre 20 y 80 ml) en tubos conteniendo ácido etilendiaminotetraacético (EDTA, *ethylenediaminetetraacetic acid*). Luego se obtuvieron muestras adicionales a una mediana de 330 días p.i de aquellos individuos del grupo PHI que aún no habían iniciado TARV. Las muestras de sangre se centrifugaron a 2500 revoluciones por minuto (rpm) durante 10 minutos. El plasma así obtenido se separó y conservó a -80°C hasta su utilización. Luego, PBMCs fueron aisladas mediante una centrifugación en gradiente de densidad en *Ficoll-Hypaque* (*GE Healthcare*) y posteriormente criopreservadas 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.

A todos los individuos HIV⁺ y los DSs reclutados en el Hospital General de Agudos “Dr. Juan A. Fernández”, se les determinó de forma rutinaria 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, *FACSCanto*, *BD Biosciences*).

Para la realización de los ensayos funcionales, PBMCs de cada individuo fueron descongeladas y lavadas 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 µg/ml estreptomina (*Gibco BRL*), 10 mM ácido 2-[4-(2-hidroxiethyl)piperazin-1-il]etansulfónico (HEPES, *Gibco BRL*) (en adelante, medio RPMI completo) con el agregado de 50 U/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 atmosfera húmeda con 5% de CO₂ durante toda la noche. La viabilidad celular se evaluó mediante el método de exclusión de las células muertas por tinción con azul tripán tanto luego del descongelado como de la incubación durante toda la noche. Solamente las muestras con un 95% de viabilidad celular fueron utilizadas para los ensayos.

III. 3. ESTÍMULOS UTILIZADOS EN LOS DIFERENTES ENSAYOS

III. 3. 1. ANTICUERPOS

Para la estimulación policlonal de PBMCs descongeladas y la posterior identificación por citometría de flujo de: (i) las subpoblaciones de linfocitos T CD4⁺ y T CD8⁺ productores de IL-17A e IFN- γ y (ii) células T CD4⁺ CD161⁺, se utilizó una mezcla de los anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 (*BD Biosciences*) a una concentración final de 10 ng/ml cada uno. El objetivo de la utilización de estos anticuerpos es que se realice una activación policlonal por entrecruzamiento del receptor de células T (TCR, *T-cell receptor*) en condiciones que se asemejan a lo que ocurre fisiológicamente, a diferencia de los mecanismos de activación celular inducidos por mitógenos tales como el forbol 12-miristato 13-acetato (PMA, *phorbol myristate acetate*) que estimula a las células T mediante la activación directa de la proteína C quinasa (PKC, *protein kinase C*)¹⁴⁵.

La estimulación de células T CD8⁺ se realizó en presencia de péptidos específicos (ver sección III.3.2 a continuación) y de los anticuerpos co-estimulatorios anti-CD28 y anti-CD49d (*BD Biosciences*) a una concentración final de 1 µg/ml cada uno, a fin de potenciar la respuesta HIV-específica.

III. 3. 2. PÉPTIDOS

Todos los péptidos empleados 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*). En aquellos ensayos cuyo objetivo consistió en la identificación de células T CD8⁺ específicas frente a HIV, se utilizaron como estímulos péptidos correspondientes a las proteínas Gag, Env y Nef de HIV-1. Los péptidos que se utilizaron [HIV-1 PTE (*potential T-cell epitopes*)] presentan 15 aminoácidos (aa) cada uno 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 positivas¹⁴⁶. Los péptidos se agruparon 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= 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). Estos *pools* de péptidos y las mezclas de los mismos se utilizaron para la estimulación de PBMCs descongeladas a una concentración final de 2 µg/ml.

También, se utilizó el *pool* de péptidos virales CEF (Citomegalovirus, Epstein Barr e Influenza; *Cytomegalovirus, Epstein Barr and Flu*), el cual es una mezcla de péptidos derivados de los mencionados virus¹⁴⁷ que se utilizó como control positivo a una concentración final de 2 µg/ml. Este *pool* de péptidos es utilizado como control positivo, ya que permite maximizar la detección de células virus-específicas presentes en las muestras, debido a que la mayoría de las personas poseen clones reactivos para al menos uno de los tres patógenos (y una buena parte para dos o incluso los tres).

Todos los péptidos liofilizados fueron cuidadosamente resuspendidos en DMSO en una concentración final de 40 µg/µl, alicuotados y mantenidos a -20°C hasta su utilización.

III. 3. 3. MITÓGENOS

Dos mitógenos “tradicionales” fueron utilizados en este trabajo para generar una fuerte y rápida activación de linfocitos requerida en tres ensayos. Uno de ellos, que permitió evaluar la capacidad de las células T CD8⁺ de suprimir la replicación viral en células T CD4⁺ autólogas (VIA), requiere de la activación de las células T CD4⁺ para optimizar su posterior infección con cepas de laboratorio de HIV-1. Para ello se utilizó 1 µg/ml de fitohemaglutinina (PHA, *phytohemagglutinin*, *Sigma-Aldrich*). Además, la estimulación combinada con 10 ng/ml de PMA (*Sigma-Aldrich*) y 500 ng/ml de ionomicina (*Sigma-Aldrich*) se utilizó como segundo control positivo en los ensayos de estimulación de PBMCs para la detección de células HIV-específicas mediante citometría de flujo, a fin de observar la máxima producción de citoquinas. Este estímulo también fue utilizado para conseguir una fuerte y rápida activación de CMCs extraídas de citocepillos endocervicales, a fin de maximizar su producción de citoquinas las cuales serían posteriormente cuantificadas en el sobrenadante de los cultivos.

III. 4. MARCACIONES CELULARES Y ANÁLISIS POR CITOMETRÍA DE FLUJO

III. 4. 1. PROCEDIMIENTO GENERAL Y REACTIVOS UTILIZADOS

El fenotipo y la funcionalidad de las diferentes subpoblaciones de células T evaluadas en el presente trabajo fueron caracterizadas mediante el marcado de moléculas de superficie, intracelulares e intranucleares, por citometría de flujo. Para ello, PBMCs descongeladas (como se describió en la sección III.2) se dispensaron en placas de 96 pocillos con fondo en U a una densidad de 5×10^5 a 10^6 células/pocillo dependiendo del ensayo y la disponibilidad de muestra. Luego de los períodos de estimulación, en los casos en los que correspondía, las células fueron traspasadas a placas de 96 pocillos de fondo en V para la realización de las marcaciones. Todos los anticuerpos utilizados en el trabajo, tanto los específicos conjugados a fluorocromos, como los isotipos y los co-estimuladores, fueron obtenidos de la empresa *BD Biosciences*. Los fluoróforos utilizados fueron los siguientes: isotiocianato de fluoresceína (FITC, *fluorescein isothiocyanate*), ficoeritrina (PE, *phycoerythrin*), proteína

pteridininclorofila (PerCP, *peridininchlorophyll protein*), alofocianina (APC, *allophycocyanin*), PE-cianina 7 (PE-Cy7, *phycoerythrin cyanine 7*) y APC-Cy7.

III. 4. 2. ANÁLISIS INICIAL COMÚN A TODOS LOS ENSAYOS

Tras las marcaciones, todas las muestras fueron adquiridas en un citómetro de flujo *FACSCanto I* (BD Biosciences) de 2 láser y 6 colores, y para los análisis se utilizó el *software FACSDiva versión 6.1.3* (BD Biosciences). La calibración del instrumento y la compensación de la fluorescencia se realizaron para cada día de ensayo utilizando muestras marcadas con los fluorocromos individuales y muestras sin marca. En todos los ensayos se aplicó inicialmente la misma estrategia de selección de poblaciones (en adelante *gating*) la cual se ilustra en la *Figura 11*. Primero, se seleccionaron los linfocitos en un gráfico (en adelante *dot plot*) que representa los valores de dispersión frontal y refracción del láser [*forward* (FSC) vs. *side* (SSC) *scatter*], adquiriendo entre 80.000 y 250.000 eventos por muestra a fin de robustecer las frecuencias obtenidas de las subpoblaciones de interés. Luego, un *dot plot* del área y la altura de la dispersión de la luz frontal (FSC-A, *forward scatter area* vs. FSC-H, *forward scatter height*) fue construido para excluir del análisis a los “dobletes” (células que pasan juntas por el punto de interrogación del láser). Las células muertas fueron excluidas del análisis por su fluorescencia en el canal del APC-Cy7 dada por el marcador de exclusión vital *LIVE/DEAD Fixable NEAR-IR* (*Invitrogen*). A continuación, los eventos $CD3^+CD4^+$ y $CD3^+CD8^+$ fueron seleccionados en *dot plots* de CD3 vs. CD4 ó CD8.



Figura 11: Estrategia inicial utilizada para la selección y análisis por citometría de flujo de las poblaciones linfocitarias T $CD4^+$ y T $CD8^+$.

III. 4. 3. ENSAYOS REALIZADOS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE LAS DIFERENTES SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS DE INTERÉS

A continuación se describen detalladamente los protocolos y análisis de datos particulares de cada uno de los ensayos realizados en este trabajo de tesis.

III.4.3.1. Identificación de células T CD4⁺ y T CD8⁺ productoras de IL-17A e IFN- γ tras una estimulación policlonal

Las células Th17 (definidas como CD4⁺ IL-17⁺) fueron identificadas mediante una marcación intracitoplasmática luego de 6 horas de incubación a 37°C en atmosfera húmeda con 5% de CO₂ en presencia de una mezcla de los anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 (10 ng/ml cada uno) junto al inhibidor del transporte intracelular monensina (0.7 μ l/ml; *GolgiStop*, *BD Biosciences*). Este ensayo permitió, adicionalmente, la detección simultánea de las siguientes subpoblaciones de células T efectoras: Th1 (CD4⁺ IFN- γ ⁺), Tc17 (CD8⁺ IL-17⁺) y Tc1 (CD8⁺ IFN- γ ⁺). La marcación de superficie consistió en la incubación durante 30 minutos a 4°C en oscuridad con una mezcla conteniendo el marcador de exclusión vital, anti-CD3-PE-Cy7, anti-CD4-PerCP y anti-CD8-APC. Luego de realizar dos lavados con solución tamponada de fosfato (PBS, *phosphate buffer saline*) se procedió a la fijación y permeabilización simultánea, mediante la utilización de la solución comercial provista en el *kit Cytotfix/Cytoperm* (*BD Biosciences*), incubando 20 minutos a 4°C en oscuridad. Finalmente, se realizaron dos lavados con la solución comercial de lavado *Perm Wash*, la cual preserva la permeabilidad de las células, para la posterior marcación intracitoplasmática de citoquinas con una mezcla conteniendo anti-IL-17A-PE y anti-IFN- γ -FITC, durante 30 minutos a 4°C en oscuridad. Finalmente, las células fueron lavadas dos veces, fijadas en paraformaldehído (PFA) al 0,5% y guardadas a 4°C (por no más de 24 horas) hasta su adquisición en el citómetro de flujo.

Durante la etapa de análisis, en primer lugar se aplicó la estrategia de *gating* inicial, común a todos los ensayos, descrita detalladamente en la sección III.4.2. (*Figura 11*). Finalmente, para la selección de las células Th17 (así como también de las subpoblaciones Th1, Tc17 y Tc1) se construyeron los correspondientes *dot blots* [CD4 (o CD8) vs. IL-17 (o

IFN- γ]]. Ejemplos del análisis realizado se ilustran en la *Figura 12*. En estos ensayos se incluyeron controles de PBMCs no estimuladas (cultivadas en medio completo con monensina) y las frecuencias reportadas en las figuras corresponden a los resultados obtenidos para cada paciente luego de la sustracción del valor inespecífico (en adelante *background*) obtenido del pocillo control. Las muestras con un *background* mayor al 0.05% fueron re-ensayadas utilizando un nuevo vial de células congeladas, cuando fue posible.

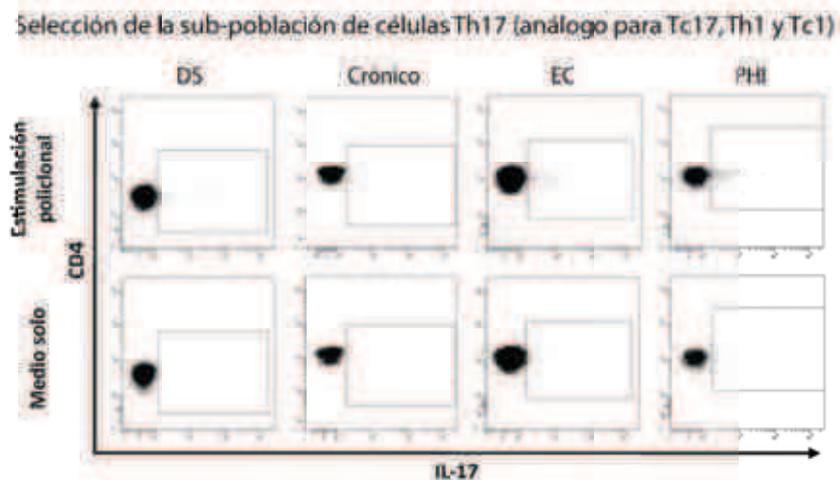


Figura 12: Estrategia de selección utilizada para la detección de células Th17. Se muestran gráficos representativos obtenidos de un paciente de cada uno de los grupos analizados en la Parte I de este trabajo de tesis a modo de ejemplo. *DS*: dador sano. *EC*: controlador elite. *PHI*: individuo del grupo de infección aguda/temprana.

Durante la etapa de análisis, adicionalmente, se obtuvo una medida indicativa de la funcionalidad de las células Th17. Se evaluó la expresión de IL-17A en células Th17 [valores de intensidad media de fluorescencia (IMF) en una escala logarítmica] relativa a la IMF de IL-17A en la población total de células T CD4⁺ para cada muestra, utilizándose la siguiente fórmula: $IMFr \text{ de IL-17} = PE \text{ IMF}_{Th17} / PE \text{ IMF}_{TCD4+ \text{ totales}}$.

III.4.3.2. Identificación de células Treg

Las células Treg (definidas como CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺) fueron evaluadas en PBMCs sin estimular. Para ello 10⁶ células fueron lavadas (todos los lavados fueron realizados con una solución de PBS suplementado con 2% SFB) y posteriormente marcadas durante 30 minutos

a temperatura ambiente en oscuridad con una mezcla conteniendo el marcador de exclusión vital, anti-CD3-PerCP, anti-CD4-FITC y anti-CD25-APC. Luego de realizar dos lavados, se utilizó el *kit* para tinción de FoxP3 Humano (*Human FoxP3 Staining Kit, BD Biosciences*) para la marcación intranuclear, de acuerdo a las instrucciones del fabricante. En primer lugar se procedió a la fijación durante 10 minutos a temperatura ambiente con la solución A provista en el *kit*. Luego se realizaron dos lavados y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad con la solución comercial C. Luego de los pasos de fijación y permeabilización, las células se incubaron 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad con anti-FoxP3-PE. Finalmente, las células fueron lavadas dos veces, fijadas en PFA al 0,5% y guardadas a 4°C (p or no más de 24 horas) hasta su adquisición en el citómetro de flujo.

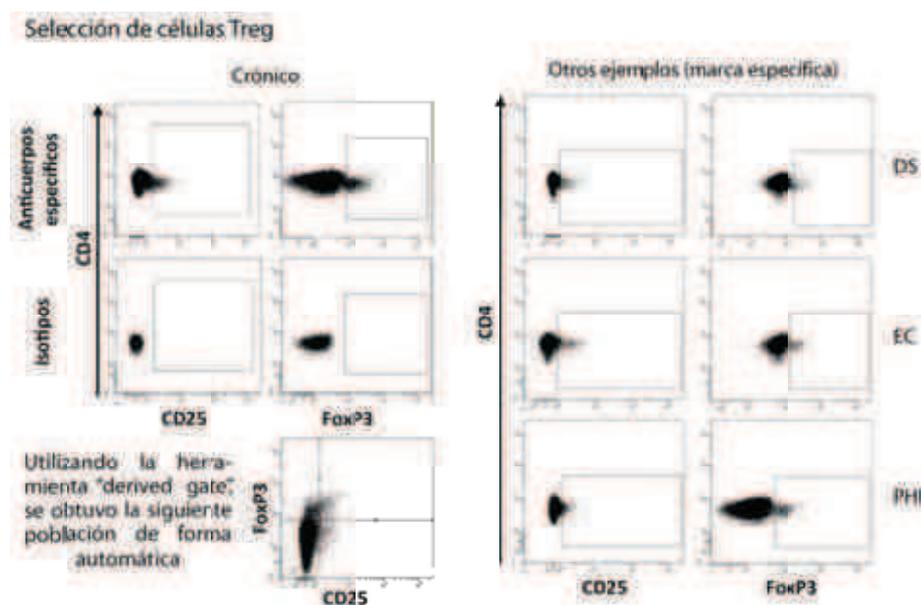


Figura 13: Estrategia de selección utilizada para la detección de células Treg. Hacia la derecha se muestran gráficos representativos obtenidos de un paciente de cada uno de los grupos estudiados en la Parte I de esta tesis a modo de ejemplo. *DS*: dador sano. *EC*: controlador elite. *PHI*: paciente de infección aguda/temprana. La herramienta "derived gate" disponible en el software *FACSDiva* fue utilizada para determinar precisa y automáticamente la población doble positiva $CD25^+ FoxP3^+$, en contraste a la selección manual/visual, ilustrada en la figura.

Para el análisis, nuevamente se aplicó la estrategia de *gating* inicial, común a todos los ensayos, descrita detalladamente en la sección III.4.2. Para la evaluación específica de la subpoblación de Treg, se armaron *dot plots* de CD4 vs. CD25 y CD4 vs. FoxP3 y posteriormente se utilizó la herramienta "derived gate" disponible en el software *FACSDiva*

que permite realizar la intersección matemática de los *gates* seleccionados, determinando de forma precisa y automática la población doble positiva CD25⁺ FoxP3⁺. Para cada muestra se utilizaron los isotipos conjugados a APC y PE con el fin de identificar de forma precisa las poblaciones negativas para los marcadores CD25 y FoxP3, respectivamente (*Figura 13*).

III.4.3.3. Evaluación de los niveles de activación inmune celular

Los niveles de activación inmune se definieron como el porcentaje de células T CD4⁺ o CD8⁺ dobles positivas para los marcadores CD38 y HLA-DR. Para ello, alícuotas de PBMCs fueron marcadas durante 30 minutos a 4°C en oscuridad con una mezcla conteniendo el marcador de exclusión vital, anti-HLA-DR-FITC, anti-CD4-PerCP, anti-CD38-APC, anti-CD3-PE-Cy7 y anti-CD8-PE. Luego de la incubación, las células se lavaron dos veces con PBS, se fijaron con PFA al 0,5% y se guardaron a 4°C en oscuridad (por un máximo de 24 horas) hasta su adquisición en el citómetro de flujo.

Para el análisis, nuevamente se aplicó la estrategia de *gating* inicial mencionada en las secciones previas, seguida de la confección de *dot plots* de CD4 o CD8 vs. CD38 y HLA-DR. Para cada muestra se incluyó un control de isotipos utilizando anticuerpos inespecíficos conjugados a los fluorocromos FITC y APC para determinar de forma fehaciente las poblaciones negativas para los marcadores HLA-DR y CD38, respectivamente. Asimismo, se utilizó la herramienta “*derived gate*” disponible en el *software FACSDiva* para determinar automáticamente las poblaciones doble positivas CD38⁺ HLA-DR⁺ (de modo similar a lo ilustrado para la detección de células Treg).

III.4.3.4. Identificación de la subpoblación de células T CD4⁺ CD161⁺, precursoras de células Th17 que migran a intestino, tras una estimulación policlonal

En la Parte II de este trabajo de tesis, en función de la cantidad máxima de fluoróforos que podían ser evaluados simultáneamente y de la disponibilidad de muestra, una parte de las células estimuladas para la determinación de células Th17 se utilizaron para la identificación de células T CD4⁺ CD161⁺ mediante una marcación de superficie tras una estimulación policlonal idéntica a la descrita en la sección III.4.3.1. La marcación de superficie consistió en la incubación durante 30 minutos a 4°C en oscuridad con una mezcla

conteniendo el marcador de exclusión vital, anti-CD3-PE-Cy7, anti-CD4-PerCP y anti-CD161-APC. Luego, las células fueron lavadas dos veces, fijadas en PFA al 0,5% y guardadas a 4°C (por no más de 24 horas) hasta su adquisición en el citómetro de flujo.

Para el análisis, luego de aplicar la estrategia de *gating* inicial, se realizó un *dot plot* de CD4 vs. CD161. Para cada muestra se incluyó un control de isotipo utilizando un anticuerpo inespecífico conjugado al fluorocromo APC para determinar de forma fehaciente la población negativa para el marcador CD161.

III.4.3.5. Evaluación de la polifuncionalidad de la población celular T CD8⁺ específica frente a HIV-1: capacidad de degranulación (expresión de los marcadores CD107_{A/B} en membrana) y secreción simultánea de IFN- γ

Se evaluó la capacidad de células T CD8⁺ HIV-específicas de secretar IFN- γ y degranular (evidenciado por la movilización de los marcadores de gránulos citotóxicos CD107_{A/B}) simultáneamente, luego de su estimulación con péptidos de HIV como ha sido previamente publicado⁶¹. Brevemente, a fin de proceder con la estimulación de las células, en cada pocillo se agregaron anticuerpos co-estimuladores (anti-CD28 y anti-CD49d, 1 μ g/ml), monensina (0,7 μ l/ml), brefeldina A (10 μ g/ml; *Sigma-Aldrich*) y una mezcla de los *pools* de péptidos de HIV (2 μ g/ml). Luego se agregó una mezcla de anticuerpos anti-CD107_A-FITC y anti-CD107_B-FITC. Se procedió a incubar las células durante 6 horas a 37°C en atmosfera húmeda con 5% de CO₂. Luego de interrumpir la estimulación mediante el lavado de las células, se procedió al marcado de las moléculas de superficie con una mezcla conteniendo el marcador de exclusión vital, anti-CD3-PerCP y anti-CD8-APC. El marcado se realizó durante 30 minutos en oscuridad a 4°C. Luego, las células se lavaron dos veces con PBS, se fijaron y permeabilizaron utilizando las soluciones comerciales contenidas en el *kit Cytotfix/Cytoperm* previamente descriptas. Finalizada la fijación y permeabilización, las células se lavaron 2 veces utilizando la solución comercial *Perm Wash* y se procedió al marcado intracelular con IFN- γ -PE-Cy7 (30 minutos, 4°C, en oscuridad). Luego, las células se lavaron 2 veces con *Perm Wash*, se fijaron con PFA al 0,5% y se guardaron a 4°C (por no más de 24 horas) hasta su adquisición en el citómetro de flujo.

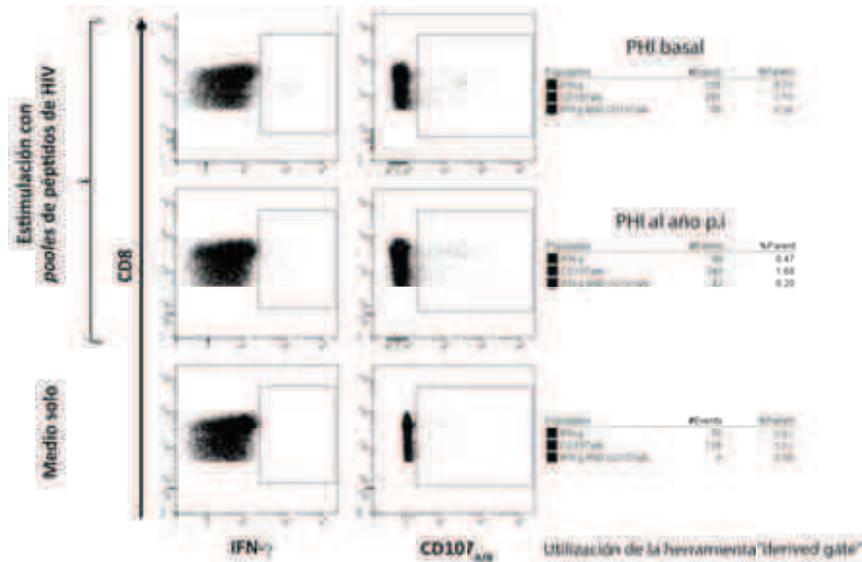


Figura 14: Ejemplos de la estrategia de selección utilizada para la evaluación de la población T CD8⁺ HIV-específica bifuncional IFN- γ ⁺ CD107_{A/B}⁺. Se muestran gráficos representativos obtenidos de un paciente de infección aguda/temprana (PHI) a nivel basal y al año p.i. La herramienta “*derived gate*” disponible en el *software FACSDiva* fue utilizada para determinar automáticamente la población doble positiva IFN- γ ⁺ CD107_{A/B}⁺.

La *Figura 14* esquematiza la estrategia utilizada para la selección y análisis de las poblaciones. Luego de aplicar la estrategia de *gating* inicial (ver *sección III.1.4.2.*), a fin de identificar las células T CD8⁺ HIV-específicas, se estudió la expresión de la citoquina IFN- γ y la degranulación (CD107_{A/B}) mediante la construcción de los *dot plots* CD8 vs. IFN- γ y CD8 vs. CD107_{A/B}. Luego, se utilizó la herramienta “*derived gate*” disponible en el *software FACSDiva* para determinar automáticamente la población doble positiva. Para cada individuo evaluado, se incluyó un control negativo (medio RPMI completo más DMSO y los anticuerpos co-estimuladores) y dos controles positivos (10 ng/ml de PMA más 500 ng/ml de ionomicina y 2 μ g/ml del *pool* de péptidos CEF). Las muestras que mostraron un *background* inespecífico (valor en el control negativo) mayor al 0,05% para cualquiera de las funciones estudiadas, fueron re-analizadas a partir de una nueva alícuota de PBMCs, cuando fue posible.

III.4.3.6. Evaluación del fenotipo de agotamiento (evidenciado por la presencia del marcador de superficie PD-1) en la población T CD8⁺ HIV-específica

Se evaluó la expresión del marcador agotamiento celular PD-1 en la población de células T CD8⁺ HIV-específicas mediante una estimulación idéntica a la detallada en la *sección*

anterior (ver sección III.4.3.5.⁵³), luego de lo cual se procedió en primera instancia al marcado de superficie con una mezcla conteniendo el marcador de exclusión vital, anti-CD3-PE-Cy7, anti-CD8-APC y anti-PD-1-PE. Se incubó durante 30 minutos a 4°C en oscuridad. Luego, las células se lavaron dos veces con PBS, se fijaron y se permeabilizaron utilizando las soluciones *Cytofix/Cytoperm* como ha sido previamente descrito. Luego, se procedió con el marcado intracelular de las moléculas IFN- γ , IL-2 y TNF- α mediante tres anticuerpos específicos todos conjugados a FITC, durante 30 minutos a 4°C en oscuridad. Luego del marcado, las células se lavaron dos veces con la solución *Perm Wash*, se fijaron con PFA al 0,5% y se guardaron a 4°C (por no más de 24 horas) hasta su adquisición en el citómetro de flujo.

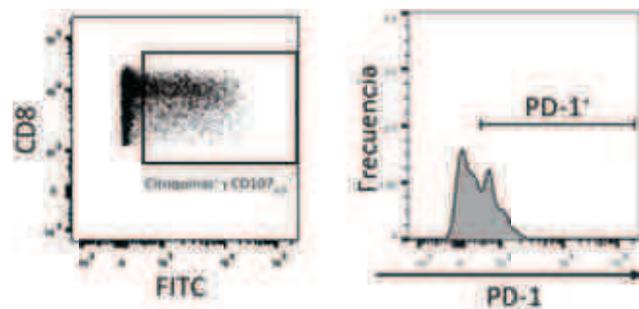


Figura 15: Estrategia de selección utilizada para la identificación de células T CD8⁺ HIV-específicas (productoras de citoquinas y con actividad citotóxica) que expresan el marcador de agotamiento PD-1.

En este caso, luego de aplicar la estrategia de *gating* inicial, se identificaron las células T CD8⁺ HIV-específicas (células con capacidad citotóxica y productoras de citoquinas en respuesta a la estimulación con el antígeno) mediante un *dot plot* de CD8 vs. fluorescencia en el canal que detecta FITC. Cabe destacar que tanto las citoquinas como los marcadores de degranulación CD107_{A/B} se marcaron con el mismo fluorocromo para optimizar la detección de las células T CD8⁺ HIV-específicas, independientemente de su función. Se consideró una respuesta positiva cuando la población FITC⁺ en los pocillos estimulados con péptidos fue al menos el doble que el *background*, mayor a un 0,05%. Finalmente, el análisis de la expresión de PD-1 se realizó mediante un histograma sobre la población CD8⁺ FITC⁺ (Figura 15).

III. 5. ENSAYO DE SUPRESIÓN VIRAL (VIA, *VIRAL INHIBITORY ACTIVITY*)

Con el objetivo de evaluar la capacidad de las células T CD8⁺ de suprimir la replicación viral en células primarias T CD4⁺ autólogas, se puso a punto la metodología basada en el trabajo de Saenz-Cirion y colaboradores¹⁴⁸, con algunas modificaciones menores (Figura 16). Luego de la incubación a 37°C post-descongelación, se procedió a la separación de las células CD4⁺ y CD8⁺ a partir de PBMCs mediante el uso de un *kit* de separación magnética (*BD Biosciences*) por selección positiva. En primer lugar, se lavaron las células con una solución de PBS suplementado con 0,5% de seroalbúmina bovina (BSA, *bovine serum albumine*), 2mM EDTA y 0,09% azida (en adelante, solución S). Luego, se procedió a la separación de las células CD4⁺ 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 3 ml apropiados para la separación magnética. Se mezclaron 50 µl de nanopartículas por cada 10⁷ 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 interactuaron de forma específica con las nanopartículas.

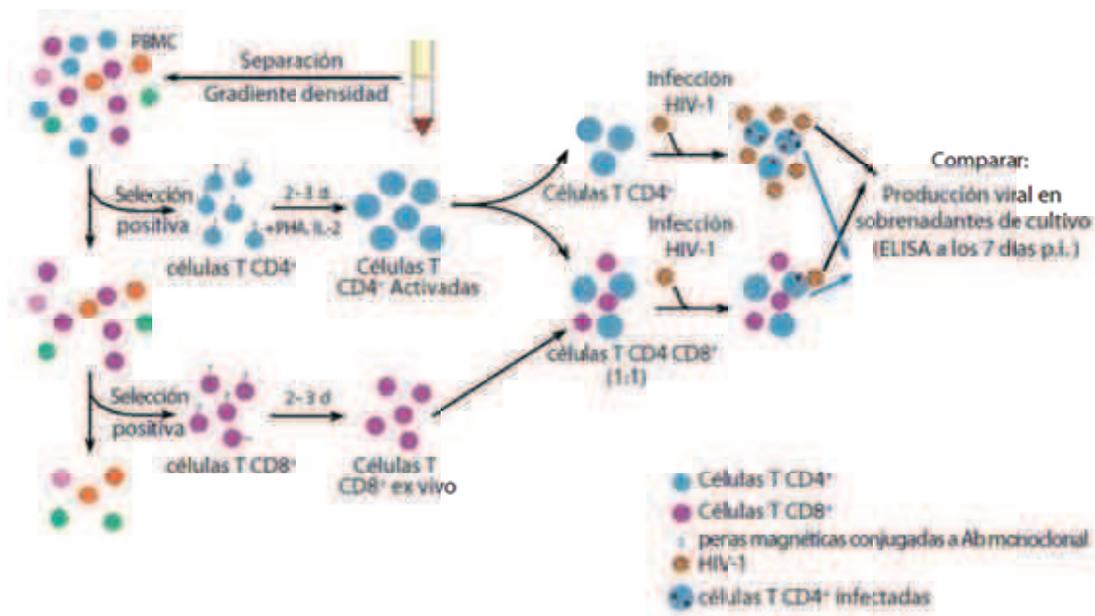


Figura 16: Esquema del ensayo de supresión viral¹⁴⁸.

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⁺), 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⁺ fue nuevamente sometida a separación magnética para recuperar las células CD8⁺. Para ello, se procedió de la misma manera mencionada para las células CD4⁺ 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⁺ se resuspendió a una densidad de 10⁶ células/ml en medio RPMI completo suplementado con 1 µg/ml de PHA (*Sigma-Aldrich*) y se cultivaron durante 3 días a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂. Las células CD8⁺ 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 multiplicidad de infección (moi) de 0,001 y en un volumen final de 100 µl. 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 atmósfera húmeda con 5% de CO₂. Finalizada la adsorción, se realizaron dos lavados y se cultivaron las células en medio RPMI completo suplementado con 10 U/ml de IL-2 (*BD Biosciences*) durante 7 días a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂. Al tercer día p.i, se reemplazó la mitad del sobrenadante de los co-cultivos por medio fresco. Al día siete p.i, se recolectaron los sobrenadantes y se evaluó la replicación viral mediante la cuantificación de antígeno p24 en sobrenadante por la técnica de ELISA (*Vironostika kit* de antígeno p24 para HIV-1; *bioMérieux*), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para cada sujeto se incluyó un control negativo (células CD4⁺ sin infectar) y un control de 100% de producción viral (células CD4⁺ infectadas sin el agregado de células efectoras

CD8⁺). Todas las condiciones se ensayaron por triplicado. La inhibición de la replicación viral (VIA) se calculó con la siguiente fórmula:

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

VIA se expresa como el logaritmo en base 10 del porcentaje de antígeno p24 que se pierde cuando las células T CD8⁺ están presentes en el cultivo.

III. 6. CUANTIFICACIÓN DE FACTORES SOLUBLES EN PLASMA

La determinación de la concentración plasmática de 39 citoquinas y quimioquinas se llevó a cabo mediante la técnica de *Luminex (MILLIPLEX MAP Human Cytokine/Chemokine; Millipore)* en el *Southwest National Primate Research Center (Texas, USA)* por el grupo de trabajo del *Dr. Luis Giavedoni*. La técnica de *Luminex* permite la determinación simultánea de todos los factores a partir de un pequeño volumen de muestra. Las 39 moléculas evaluadas fueron: EGF, eotaxina, FGF-2, Flt-3, fractaquina, G-CSF, GM-CSF, CXCL1-3/GRO, IFN- α 2, IFN- γ , IL-1 α , IL-1 β , IL-1R α , 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, CXCL10/IP-10, MCP-1, MCP-3, MDC/CCL22, MIP-1 α , MIP-1 β , sCD40L, sIL-2R α , TGF- α , TNF- α , TNF- β , VEGF (el listado de nombres completos se detalla en la sección de *Abreviaturas*). Las muestras fueron procesadas y analizadas como ha sido descrito previamente por *Giavedoni* y colaboradores¹⁴⁹.

III. 7. OBTENCIÓN Y PROCESAMIENTO DE MUESTRAS DE TRACTO GENITAL FEMENINO

Para la realización de la Parte II de este trabajo de tesis, se obtuvieron dos tipos de muestras de tracto genital femenino: un hisopado de exocervix y dos cepillos endocervicales, siguiendo la metodología previamente descrita^{150,151}. Ambos tipos de muestra fueron tomadas por médicos ginecólogos durante las consultas anuales de control de las pacientes. Todas las muestras fueron mantenidas en hielo hasta su procesamiento en el laboratorio, dentro de las 4 horas. El esquema general de toma de muestras de tracto genital femenino se ilustra en la *Figura 17*.

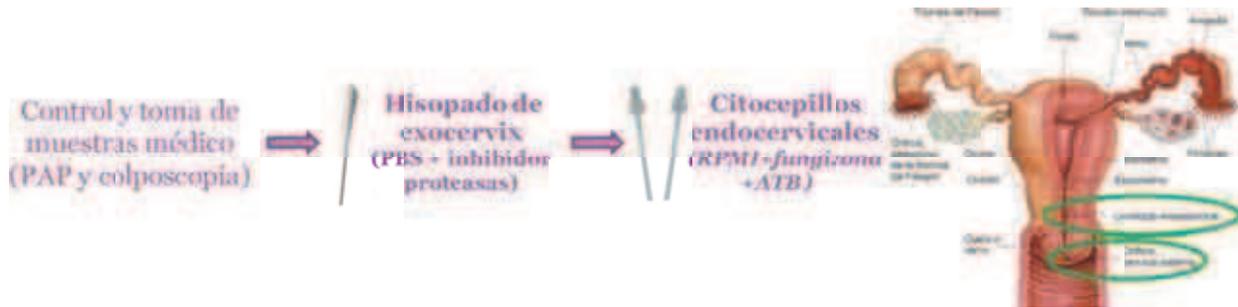


Figura 17. Esquema general de toma de muestras de cérvix.

III. 7. 1. OBTENCIÓN DE MEDIADORES SOLUBLES DE INFLAMACIÓN MEDIANTE LA TOMA DE UN HISOPADO DE EXOCERVIX

Con la ayuda de un espéculo, el hisopo se introdujo en la zona de fórnix o fondo del saco vaginal y se rotó 360°, para ser depositado inmediatamente en un tubo de 15 ml conteniendo 3 ml de PBS estéril suplementado con un *cocktail* de inhibidor de proteasas (*Sigma-Aldrich*; 30 μ l del inhibidor de proteasas cada 3 ml de PBS) frío. Para la obtención de los mediadores solubles, el hisopo fue sometido a una agitación extensiva (30 segundos de agitación en *vortex* seguidos de 30 segundos de agitación manual) en el medio de transporte y luego fue descartado. A continuación se centrifugó el tubo 10 minutos a 1500 rpm a fin de clarificar el sobrenadante de restos celulares, mucus y células epiteliales, el cual fue guardado a -80°C hasta su utilización.

III. 7. 2. OBTENCIÓN DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE CÉRVIX (CMCs) MEDIANTE LA TOMA DE DOS CITOCEPILLOS ENDOCERVICALES

Para la obtención de CMCs se siguió la metodología previamente utilizada^{150,151}. Cada uno de los citocepillos se introdujo, secuencialmente, en el canal endocervical hasta la zona de transformación, se rotaron una vez 360° y ambos se depositaron inmediatamente en el mismo tubo de 15 ml conteniendo 3 ml de medio de transporte frío, [RPMI-1640 suplementado con 1% de ATB, 1% de glutamina, 1% de HEPES y 2 mg/ml de fungizona (*Invitrogen*)]. Una vez en el laboratorio, las CMCs se recuperaron mediante agitación manual y lavado extensivo de los citocepillos endocervicales con una pipeta *pasteur* en el medio de transporte, teniendo particular cuidado de evitar la formación de espuma y

disgregando el mucus presente. En caso de contener cantidades excesivas de mucus, células epiteliales y/o restos de tejido, fueron adicionalmente filtradas con un filtro de 100 μm (*BD Biosciences*). Finalmente, se descartaron los citocepillos y se realizó una centrifugación durante 10 minutos a 1500 rpm para obtener el *pellet* de CMCs. Las células fueron resuspendidas en medio de transporte suplementado con 10% de SFB (medio completo), contadas mediante la utilización del colorante de exclusión vital azul tripán y ajustada su concentración a $1-2 \times 10^5$ CMCs/200 μl (según la disponibilidad de células) para su inmediata utilización.^{138,152}

III. 7. 3. DETECCIÓN DE CITOQUINAS CARACTERÍSTICAS DE LOS PERFILES CELULARES TH17 Y TREG EN SOBRENADANTES DE CMCs ESTIMULADAS

Se midieron los niveles de las citoquinas características de cada perfil a fin de tener una estimación de la funcionalidad de las células Th17 y Treg presentes entre las CMCs aisladas de los citocepillos. Para ello, las CMCs obtenidas y resuspendidas fueron plaqueadas en placas de 96 pocillos de fondo en U, en una cantidad de 2×10^5 a 10^5 CMCs por pocillo en 200 μl , dependiendo de la disponibilidad de células. Posteriormente se les agregó 5 μl de una mezcla concentrada 40 veces de PMA/Ionomicina (concentración final en el pocillo 10 ng/ml y 500 ng/ml, respectivamente) y fueron incubadas durante 8 horas a 37°C en atmosfera húmeda con 5% de CO₂. Una vez finalizado el período de incubación, la placa fue centrifugada 3 minutos a 4000 rpm y los 200 μl de sobrenadante así separados se guardaron a -80°C hasta su utilización.

III.7.3.1. Cuantificación de IL-17A, IL-17F, IL-21 e IL-10 mediante una matriz de nanopartículas fluorescentes acopladas a anticuerpos específicos (CBA, *cytokine bead array*, *BD Biosciences*)

El ensayo de CBA permite el análisis de múltiples analitos en una misma muestra, resultando de gran utilidad cuando se dispone de una cantidad pequeña o limitada de sobrenadante, maximizando la cantidad de proteínas que pueden ser detectadas en un volumen mínimo (entre 25 y 50 μl). El principio del ensayo (ilustrado en la *Figura 18*) se basa en: **1)** la propiedad de las nanopartículas que pueden ser individualizadas mediante

citometría de flujo por su intensidad de fluorescencia en canales predeterminados y su tamaño; **2)** la capacidad de individualizar analitos de una mezcla mediante la utilización de anticuerpos monoclonales específicos acoplados a cada tipo de nanopartícula (anticuerpo de captura) y **3)** la cuantificación de las proteínas, utilizando anticuerpos monoclonales conjugados a un fluorocromo (anticuerpos de detección) que es detectado en un canal diferente al de las nanopartículas, y que interactúan de modo específico con los analitos capturados: así se hace posible la determinación de la IMF de cada proteína de la matriz la cual, al ser interpolada en las curvas *standard*, permite obtener las concentraciones.

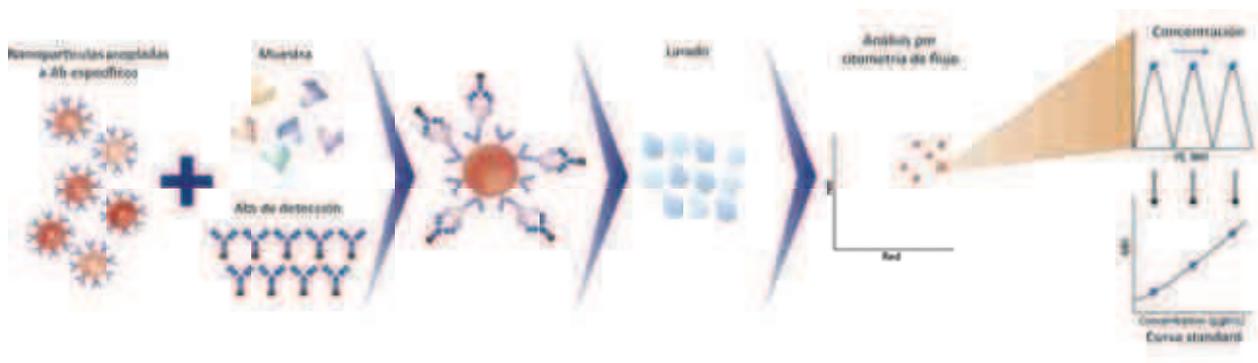


Figura 18. Esquema general de los pasos del ensayo de CBA. El último paso ilustra el tipo de análisis automático que realiza el *software FCAP Array (BD Biosciences)*. Ab/s: anticuerpo/s. Adaptado del sitio oficial de *BD Biosciences*.

En este trabajo se utilizó la combinación de los siguientes *sets* conteniendo las nanopartículas, los anticuerpos de captura y detección y los *standards* liofilizados (*CBA Human Flex Set, BD Biosciences*) específicos para la detección de cada una de las siguientes cuatro citoquinas: IL-17A, IL-17F, IL-21 (características del perfil Th17) e IL-10 (característica del perfil Treg).

En primer lugar se procedió a preparar las mezclas de los reactivos: **1)** se mezclaron los cuatro *standards* liofilizados en un tubo de 15 ml y se reconstituyeron y homogeneizaron en 4 ml del diluyente comercial provisto en los *sets*. Luego se realizaron diluciones seriadas de la mezcla *standard* y se conservaron los tubos en oscuridad a temperatura ambiente hasta su utilización (los rangos de cada una de las curvas fueron los siguientes: 2500 a 9.8 pg/ml para IL-17A, IL-17F e IL-10 y 10000 a 39.1 pg/ml para IL-21); **2)** los sobrenadantes de

CMCs fueron descongelados, clarificados de posibles remanentes de *debris* celular mediante una centrifugación a 14000 rpm durante 30 segundos, traspasados a tubos nuevos y conservados en oscuridad a temperatura ambiente hasta su utilización; **3)** se realizó la dilución y mezcla de las nanopartículas de captura (concentración inicial 50X), utilizando el diluyente comercial. Se mezclaron 25 μ l de nanopartículas de captura 1X de cada uno de los *sets* por cada muestra a analizar y la mezcla se dejó reposar 15 minutos a temperatura ambiente en oscuridad; **4)** se realizó la dilución y mezcla de los anticuerpos de detección (concentración inicial 50X), utilizando el diluyente comercial. Se mezclaron 25 μ l de los anticuerpos de detección 1X de cada uno de los *sets* por cada muestra a analizar y se conservó esa mezcla a temperatura ambiente en oscuridad hasta su utilización.

Una vez preparadas todas las mezclas de reactivos, *standards* y las muestras, se sembraron 25 μ l de las diluciones de la mezcla de *standards* y de cada sobrenadante en pocillos de una placa de 96 pocillos de fondo en U. A continuación se agregaron 25 μ l de la mezcla de nanopartículas de captura a cada pocillo, se homogeneizó e incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente se agregaron 25 μ l de la mezcla de anticuerpos de detección a cada pocillo, se homogeneizó y se incubó por 2 horas más a temperatura ambiente. Finalmente, se realizó un lavado mediante el agregado de 125 μ l de la solución de lavado comercial, posterior centrifugación de la placa durante 3 minutos a 4000 rpm y descarte del sobrenadante. Una vez resuspendidas en 300 μ l de solución de lavado, las muestras fueron adquiridas en un citómetro de flujo *FACSCanto 1* (*BD Biosciences*) y posteriormente analizadas mediante la utilización del software específico *FCAP Array* (*BD Biosciences*). Este *software* utiliza los archivos exportados del citómetro de flujo y realiza automáticamente las curvas de calibración de cada analito, arrojando los valores finales de concentración de cada citoquina en tablas. La calibración del instrumento se realizó en cada día de determinación mediante la utilización de nanopartículas destinadas a tal fin siguiendo las instrucciones del fabricante.

III. 7. 4. DETECCIÓN DE CITOQUINAS PROINFLAMATORIAS EN SOBRENADANTE DE HISOPADOS EXOCERVICALES

III.7.4.1. Cuantificación simultánea de seis mediadores solubles en muestras de exocervix mediante la técnica de CBA

Con el fin de obtener el perfil inflamatorio en mucosa cervical de las pacientes incluidas en la Parte II de la tesis, se cuantificaron citoquinas proinflamatorias en los sobrenadantes obtenidos a partir del procesamiento de los hisopados exocervicales. Para ello se recurrió a la técnica de CBA previamente descrita (ver sección III.7.3.1) que permitió determinar múltiples analitos en cada muestra mediante un solo ensayo. Para ello se utilizó un *kit* comercial (*CBA Human Inflammatory Cytokines Kit, BD Biosciences*) especialmente diseñado para detectar la combinación de las siguientes seis citoquinas: IL-8, IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF y la subunidad p70 de IL-12. Tanto el protocolo para la cuantificación de estos mediadores inflamatorios como la metodología de análisis y la calibración del citómetro de flujo, son idénticos a lo detallado en la sección anterior.

III.7.4.2. Cuantificación de proteínas totales en muestras de hisopado de exocervix mediante el ensayo de ácido bicinonínico (BCA, *bicinchoninic acid*)

Con el fin de determinar la concentración de proteínas totales en los sobrenadantes obtenidos a partir del procesamiento de los hisopados exocervicales de las pacientes incluidas en la Parte II de la tesis, se utilizó el *kit* comercial *Micro BCA Protein Assay (Thermo Scientific)* de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Brevemente, los sobrenadantes de hisopados exocervicales fueron descongelados y clarificados de posibles remanentes de *debris* mediante una centrifugación durante 15 segundos a 14000 rpm, y se prepararon las diluciones apropiadas. Se realizó la curva estándar mediante diluciones seriadas a partir de una solución madre de la proteína BSA contenida en el *kit* (rango de la curva: 0.5-200 $\mu\text{g/ml}$). Luego se preparó la mezcla de solución de trabajo con BCA de la siguiente forma: 25 partes de reactivo A, 24 partes de reactivo B y 1 parte de reactivo C (todas soluciones comerciales). Finalmente se dispusieron 150 μl de las muestras y las diluciones de *standard* por duplicado en placas de 96 pocillos de fondo plano, se les agregó

150 μ l por pocillo de la solución de trabajo con BCA y se incubó durante 60 minutos a 60°C en un incubador ET 5 (*Werfen Medical*). Al finalizar este período se dejó que la placa llegara a temperatura ambiente durante 10 minutos en oscuridad y posteriormente fue leída en un lector *Multiskan GO* (*Thermo Scientific*) a 562 nm.

III. 8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los análisis estadísticos fueron realizados utilizando el programa *Graph-Pad Prism 5* (*Graph-Pad Software*). Todos los datos excepto el Log_{10} de la CV se analizaron utilizando test estadísticos no paramétricos. Se utilizaron las pruebas de *Kruskal-Wallis* seguida de la prueba *a posteriori de Dunn, Mann-Whitney y Wilcoxon* de dos colas para realizar las comparaciones de las variables entre y dentro de los grupos, respectivamente. Para todas las correlaciones se aplicó la prueba de correlación de *Spearman*. Todas las pruebas fueron consideradas estadísticamente significativas cuando el valor de p obtenido era menor a 0.05.

IV. RESULTADOS

IV. 1. **PARTE I: ESTUDIO DE LAS SUBPOBLACIONES TH17, T_{REG} Y SU BALANCE EN MUESTRAS DE SANGRE PERIFÉRICA DURANTE LA INFECCIÓN AGUDA/TEMPRANA POR HIV-1 Y SU RELACIÓN CON LA RESPUESTA T ANTIVIRAL PROTECTIVA**

IV. 1. 1. **CARACTERÍSTICAS DE LOS INDIVIDUOS HIV⁺ SELECCIONADOS**

Los diferentes grupos de individuos HIV⁺ seleccionados para realizar esta parte del estudio fueron: un grupo de 40 personas diagnosticadas durante la infección aguda/temprana o PHI (durante la seroconversión o dentro de los primeros 6 meses desde la fecha estimada de infección, el 95% de ellos corresponden a los estadios de Fiebig V y VI¹⁴⁴), 17 individuos crónicamente infectados que se encontraban en estadios avanzados de la enfermedad (Crónicos), y un grupo de 13 pacientes infectados definidos como ECs. Los dos últimos grupos mencionados se incluyeron como grupos control con el objetivo de comparar los diferentes parámetros evaluados en relación a lo que ocurre en la cohorte de PHI. Todos los individuos reclutados eran *naïve* de TARV al momento de recolección de la muestra, lo cual permitió evaluar lo que ocurre durante la historia natural de la infección (una descripción detallada de los criterios de inclusión de los pacientes de cada grupo se puede consultar en la *sección III.1* de Materiales y Métodos).

Una descripción de las características de los diferentes grupos de individuos infectados se resume en la *Tabla 2*. Dentro de la cohorte de PHI, la mediana (IQ, rango intercuartil o *interquartile range*) del tiempo estimado p.i fue de 75 días [(50-120) días; momento en el cual se obtuvo la muestra basal], mientras que la mediana del tiempo de toma de la muestra de seguimiento al año fue de 330 días [(300-360) días]. Para algunos análisis, los individuos PHI fueron divididos en dos sub-grupos considerando si sus recuentos de células T CD4⁺ caían, o no, por debajo de las 350 células/ μ l, en cualquier momento durante el primer año p.i, llamados progresores rápidos (PRs) y típicos (PTs), respectivamente. Al comparar estos sub-grupos, se hallaron diferencias a nivel basal: los progresores típicos evidenciaron tanto mayores recuentos de células T CD4⁺ ($p < 0.0001$) como relación CD4/CD8 ($p < 0.0001$). Ambas determinaciones constituyen parámetros bien establecidos de

seguimiento de la enfermedad, y por lo tanto mayores valores se relacionan directamente con un mejor estado clínico del paciente.

Tabla 2. Características de los individuos infectados por HIV-1 reclutados para la Parte I

Grupo	Muestra (nº de individuos)	Estimación de los dpi ^a , mediana (IQ)	Edad (años), mediana (IQ)	Log ₁₀ CV ^b , media±DS	Recuento de células T CD4 ^c , mediana del nº de células/µl (IQ)	Recuento de células T CD8 ^c , mediana del nº de células/µl (IQ)	Relación CD4/CD8, mediana (IQ)
Cohorte PHI	Basal (n=40)	75 (50-120)	32 (23-37)	4.52±1.10	577 (388-681)	1099 (767-1593)	0.50 (0.27-0.79)
	Año (n=22)	330 (300-360)	---	4.27±0.84	480 (396-660)	845 (594-1200)	0.57 (0.35-0.91)
PHI PRs	Basal (n=11)	55 (30-98)	37 (27-40)	4.98±0.85	282 (222-379)	1324 (930-1771)	0.23 (0.12-0.33)
	Año (n=5)	300 (230-370)	---	4.01±1.14	316 (178-358)	961 (540-1219)	0.27 (0.25-0.41)
PHI PTs	Basal (n=29)	90 (60-120)	30 (23-36)	4.35±1.14	603 (515-741)	1021 (634-1420)	0.60 (0.40-0.87)
	Año (n=17)	330 (300-360)	---	4.34±0.63	575 (443-680)	769 (592-1217)	0.70 (0.44-0.94)
Ecs	≥ 5 años (n=13)	---	37 (33-44)	< 1.70	599 (559-894)	618 (287-802)	1.54 (0.61-2.38)
Crónicos	≥ 3 años (n=17)	---	34 (25-36)	4.71±0.70	141 (11-395)	1009 (540-1265)	0.19 (0.03-0.37)

PHI: cohorte de individuos de infección aguda/temprana. PRs: progresores rápidos. PTs: progresores típicos. Ecs: controladores elite. dpi: días post-infección. CV: carga viral. IQ: rango intercuartil. DS: desvío *standard*. PRs y PTs distinguen individuos de la cohorte PHI que tuvieron recuentos de células T CD4⁺ por debajo o encima de 350 células/µl durante el primer año post-infección, respectivamente.

^a: En pacientes sintomáticos, se estimó como 14 días anteriores a la aparición de los síntomas. En pacientes asintomáticos, se estimó como el punto medio entre la última determinación negativa y la primer determinación positiva o un mes anterior a la fecha de un WB indeterminado o negativo¹⁴³.

^b: *Versant HIV-1 RNA 3.0 assay, Siemens*. Los límites de detección negativo y positivo son 50 y 500.000 copias de ARN viral/ml de plasma, respectivamente (1.7 y 5.7 log₁₀).

^c: Citometría de flujo doble plataforma, *FACSCanto, BD Biosciences*.

Además, la media del Log₁₀ de la CV de los individuos con progresión rápida evidenció una tendencia a ser mayor a la observada en progresores típicos ($p=0.0713$). Al año p.i. se observaron las mismas tendencias, aunque en este caso los análisis deben ser interpretados con cautela debido a la limitación impuesta por el bajo número de muestras de progresores rápidos obtenidas al año p.i (debido a que la mayoría de los individuos de progresión rápida ya se encontraban bajo tratamiento, motivo por el cual fueron excluidas de estos análisis). Todos los individuos de la cohorte PHI (tanto a nivel basal como al año p.i), evidenciaron mayores recuentos de células T CD4⁺ y relación CD4/CD8 comparados con los Crónicos (valores de $p<0.001$). Tal como se esperaba, los ECs preservan sus recuentos de células T CD4⁺ en relación a los Crónicos ($p<0.001$) y poseen una mayor relación CD4/CD8

comparados tanto con los Crónicos ($p < 0.001$) como con los individuos de la cohorte PHI (tanto a nivel basal como al año p.i; valores de $p < 0.03$).

IV. 1. 2. LA RELACIÓN Th17/ TREG SE ENCUENTRA DISMINUIDA DESDE TIEMPOS TEMPRANOS POST-INFECCIÓN, MIENTRAS QUE LAS FRECUENCIAS DE CÉLULAS TREG Y Th17 SE ENCUENTRAN SEVERAMENTE ALTERADAS EN ESTADÍOS AVANZADOS DE LA INFECCIÓN POR HIV-1 EN COMPARACIÓN A LO OBSERVADO EN INDIVIDUOS HIV⁻

El primer objetivo del presente estudio consistió en analizar los cambios que ocurren tanto en la subpoblación de células Th17 como en la relación Th17/Treg durante la infección aguda/temprana, contrastando estas variaciones con las observadas en DSs y en pacientes crónicamente infectados en estadios avanzados de la enfermedad, definidos como Crónicos, e individuos capaces de controlar naturalmente la infección, catalogados como ECs.

La *Figura 19A* muestra que la mediana del porcentaje (IQ) de células Th17 presentes en los individuos de la cohorte PHI (tanto en la muestra basal como en la de seguimiento al año p.i.) resultó significativamente mayor en comparación a lo que se observa en el grupo de Crónicos [0.17% (0.06-0.35) a nivel basal y 0.07% (0.05-0.22) al año p.i en PHIs vs. 0.03% (0.01-0.07) en Crónicos; valores p 0.0002 y 0.0145, respectivamente]. Dentro de la cohorte de infección aguda/temprana, se observó una tendencia a la disminución de los niveles de Th17 a medida que la infección avanza [0.17% (0.06-0.35) a nivel basal vs. 0.07% (0.05-0.22) al año p.i; $p=0.11$]; sin embargo, estas diferencias no alcanzaron la significancia estadística debido, probablemente, a la gran dispersión de los datos obtenidos. Es interesante destacar que no fueron halladas diferencias significativas entre las muestras basales de los individuos PHI y lo observado tanto en DSs [0.14% (0.07-0.28)] como en ECs [0.11% (0.07-0.15)]. Como se esperaba, los Crónicos evidenciaron los niveles más bajos de células Th17. Cuando los mismos análisis fueron realizados utilizando los valores de recuentos absolutos de células Th17 (número de células/ μ l) los resultados hallados fueron similares a los descritos anteriormente.

En contraste a lo observado en la subpoblación de células Th17, en el compartimento de las células Treg se observó que el porcentaje resultó mayor en el grupo de individuos

Crónicos en comparación tanto con ECs como DSs [2.07% (0.97-2.52) en Crónicos vs. 0.96% (0.20-1.81) en ECs y 0.94% (0.41-1.70) en DSs; valores p 0.0356 y 0.0392, respectivamente; *Figura 19B*]. A pesar de que los individuos de la cohorte PHI mostraron frecuencias de células Treg similares a las observadas en DSs y ECs [1.13% (0.56-1.93) en las muestras basales de PHIs y 0.92% (0.59-1.68) al año p.i.], no se hallaron diferencias significativas al ser comparados con los Crónicos.

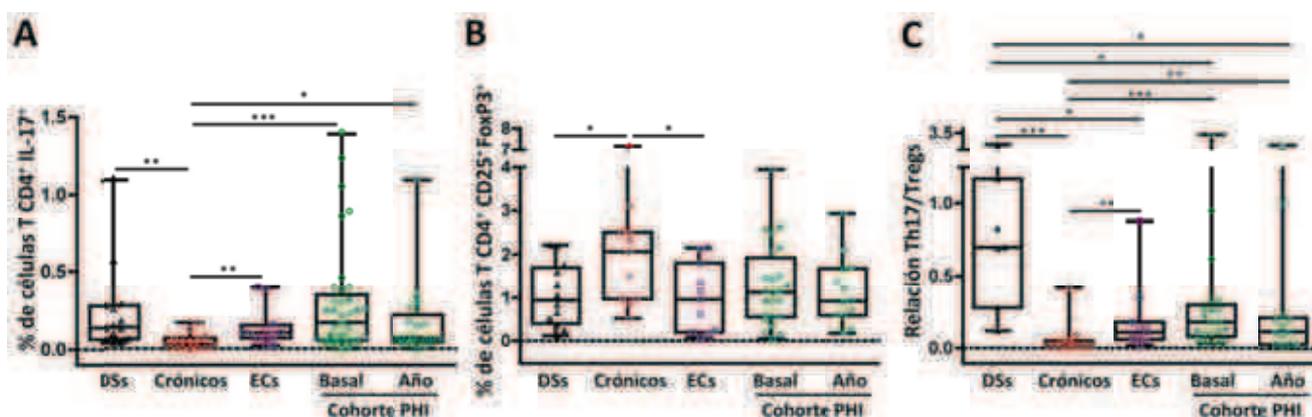


Figura 19: Alteraciones en las subpoblaciones de células Th17 y Treg y en la relación Th17/Treg en diferentes estadios de la infección por HIV-1. PBMCs fueron estimuladas durante 6 horas en presencia de una mezcla de anticuerpos anti-CD3/anti-CD28 o en medio completo solo (control de producción inespecífica de citoquinas o *background*) previo a su marcación intracelular. Se muestran los valores de frecuencia de células CD3⁺ CD4⁺ productoras de IL-17 (Th17) luego de sustraer el *background* (A). Tinción intranuclear para la detección de células CD3⁺ CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ (Tregs, B). La relación Th17/Treg fue calculada para cada individuo (C). La línea dentro de las cajas indica el valor de la mediana, mientras que sus límites delimitan los percentiles 25-75 y las barras indican los valores máximo y mínimo. Cada símbolo representa pacientes individuales: Dadores sanos (Δ , DSs), Crónicos (\diamond), controladores elite (\square , ECs) y cohorte de infección aguda/temprana por HIV (PHI) a nivel basal y al año p.i. (\circ , progresores típicos o PTs con recuentos de células T CD4⁺ mayores a 350 células/ μ l durante el primer año de infección; \bullet , progresores rápidos o PRs con recuentos de células T CD4⁺ por debajo de las 350 células/ μ l durante el primer año p.i.). Se indican los valores de p obtenidos: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$.

Cuando se analizó la relación Th17/Treg (*Figura 19C*), se observó que todos los individuos infectados por HIV evidenciaban diferencias significativas comparados con los valores normales hallados en DSs [0.70 (0.28-1.17); todos los valores $p < 0.02$], incluyendo a los individuos catalogados como ECs. Cabe destacar que son pocos los reportes que comparan la relación Th17/Treg entre ECs y DSs. La relación entre estas dos subpoblaciones de células T CD4⁺ se encontró severamente reducida en el grupo de pacientes Crónicos [0.02 (0.01-0.05)], no sólo en comparación a los valores normales hallados en el grupo de DSs como ha sido previamente descrito^{110,111}, sino también

respecto a lo observado en el grupo de ECs [0.11 (0.06-0.18); $p=0.0054$] y la cohorte PHI tanto a nivel basal [0.18 (0.08-0.30); $p=0.0004$] como al año p.i [0.12 (0.03-0.22); $p=0.0058$]. En relación a la cohorte de PHI, tanto a tiempos tempranos como tardíos p.i, la relación Th17/Treg resultó significativamente menor respecto a lo observado en DSs, evidenciando que la proporción entre estas dos subpoblaciones se ve afectada tempranamente en la infección por HIV.

En resumen, los resultados descriptos anteriormente indican que la infección por HIV tiene un impacto negativo sobre la relación Th17/Treg desde tiempos muy cortos p.i, incluso en individuos capaces de controlar naturalmente la infección (ECs). También se pudo corroborar que las frecuencias de células Th17 y Treg se encuentran severamente alteradas en pacientes crónicamente infectados que se encuentran en estadios avanzados de la enfermedad.

IV. 1. 3. LOS NIVELES BASALES DE CÉLULAS TH17 SE CORRELACIONAN TANTO CON LA ACTIVACIÓN INMUNE DE CÉLULAS T CD8⁺ COMO CON LA TASA DE PROGRESIÓN A LA ENFERMEDAD

La activación inmune constituye un evento característico en la infección por HIV, y ha sido reportado que ocurre desde tiempos tempranos p.i¹⁵³, por lo tanto el siguiente objetivo del presente trabajo consistió en analizar la relación entre la activación inmune y las subpoblaciones Th17 y Treg a tiempos tempranos (75 días p.i) de la infección por HIV, comparando individuos que evidencian distintas tasas de progresión y deterioro de su sistema inmunitario.

En primer lugar, se compararon tanto las proporciones como los recuentos de células Th17 presentes en las muestras basales de los individuos de la cohorte PHI con un rápido deterioro de su sistema inmune (PRs) en comparación con aquellos individuos cuyo patrón de progresión era típico (PTs). Así, se evidenció una tendencia a menores proporciones de células Th17 en progresores rápidos [0.13% (0.04-0.25) vs. 0.22% (0.06-0.40) en PTs; $p=0.13$; *Figura 20A* eje y izquierdo], para los cuales también se detectaron menores recuentos absolutos de células Th17 a nivel basal [0.33 (0.10-0.63) células/ μ l vs. 1.47 (0.40-3.14) células/ μ l en PTs; $p=0.0040$; *Figura 20A* eje y derecho].

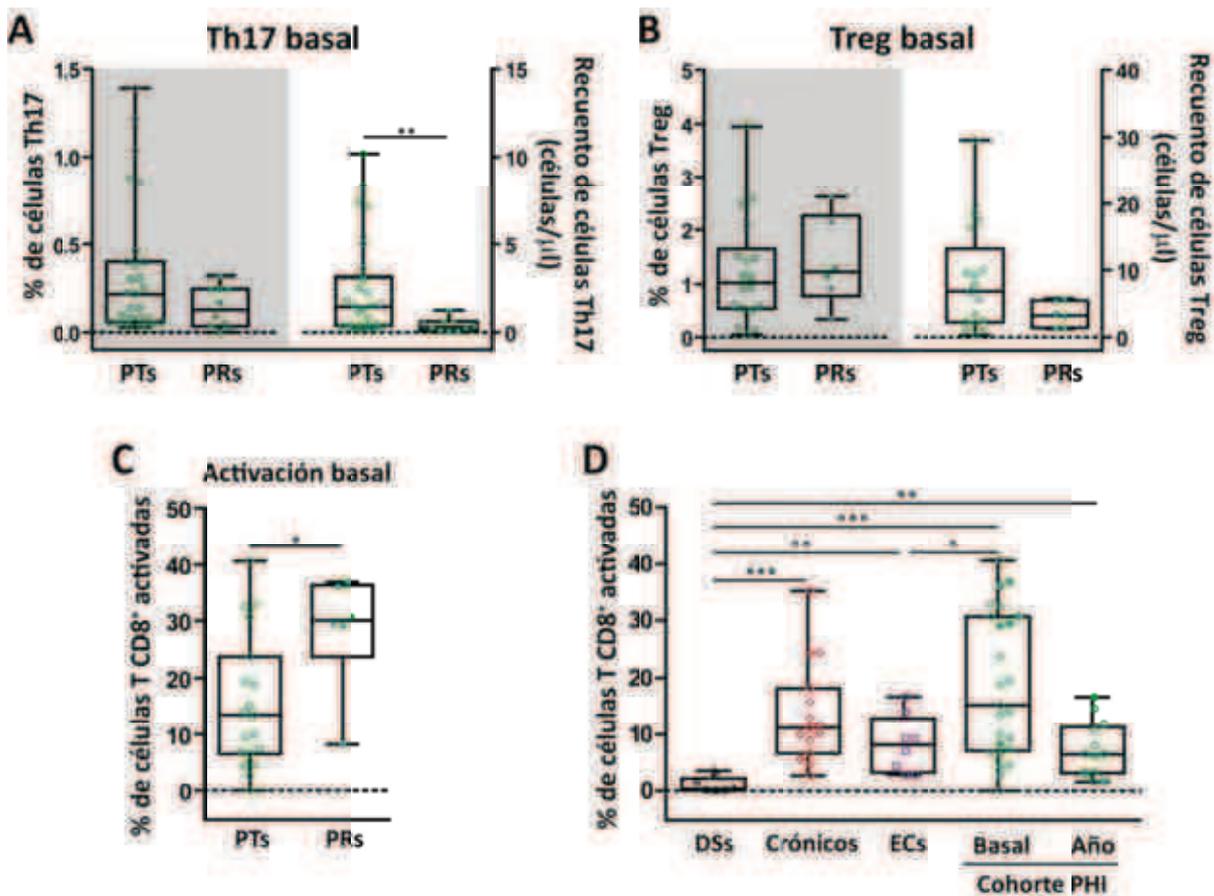


Figura 20: Evaluación de las subpoblaciones de células Th17 y Treg en pacientes de la cohorte de infección aguda/temprana que muestran distintos patrones de activación inmune y progresión a la enfermedad. Comparación de las frecuencias (ejes y derechos) y los recuentos absolutos (ejes y izquierdos) a nivel basal de células Th17 (A) y Treg (B) entre progresores típicos (PTs) y rápidos (PRs). La frecuencia basal de células T CD3⁺ CD8⁺ positivas para los marcadores de activación CD38⁺ y HLA-DR⁺ se determinó en los subgrupos PT y PR dentro de la cohorte de PHI mediante citometría de flujo (C). La frecuencia de células T CD8⁺ activadas fue determinada en todos los grupos de pacientes (D). La línea dentro de las cajas indica el valor de la mediana, mientras que sus límites delimitan los percentiles 25-75 y las barras indican los valores máximo y mínimo. Cada símbolo representa pacientes individuales. Se indican los valores de *p* obtenidos: * *p*<0.05, ** *p*<0.01 y *** *p*<0.001.

Cuando se extendieron los mismos análisis al compartimento de las células Treg, no fueron halladas diferencias significativas [ej., recuentos absolutos de células Treg: 6.92 (2.26-13.17) células/ μ l en PTs vs. 3.27 (1.43-5.53) células/ μ l en PRs; *p*=0.24; *Figura 20B*]. Es importante destacar que, cuando los niveles de activación de células T CD8⁺ fueron analizados en estos dos sub-grupos, se observaron mayores proporciones de células T CD8⁺ con un fenotipo de activación (presencia de las moléculas HLA-DR y CD38 en la superficie celular) en el sub-grupo de progresores rápidos [30.1% (23.8-36.3) vs. 13.5% (6.5-23.8) en PTs; *p*=0.0450; *Figura 20C*].

También se pudo corroborar que, como se esperaba, la infección por HIV resulta en altos niveles de activación de células T CD8⁺ desde tiempos tempranos p.i. [15.2% (7.1-30.6) en muestras basales de la cohorte PHI] en comparación tanto con ECs [8.2% (3.2-12.8); $p=0.0460$] como con los valores normales hallados en DSs [0.38% (0.18-2.19); $p=0.0007$; *Figura 20D*]. Al año p.i., aunque no se encontraron diferencias significativas, los niveles de activación inmune mostraron una tendencia a disminuir [6.5% (3.2-11.3) en muestras de un año p.i.].

Los resultados de esta sección indican que, no solo los individuos Crónicos sino también los ECs poseen mayores niveles de activación inmune en comparación a los DSs (*Figura 20D*), en concordancia con su disminución en la relación Th17/Treg (*Figura 19C*).

IV. 1. 4. LA PRESERVACIÓN DE LA SUBPOBLACIÓN DE CÉLULAS TH17 SE CORRELACIONA POSITIVAMENTE CON MEJORAS EN LOS PARÁMETROS DE SEGUIMIENTO DE LA INFECCIÓN Y PROGRESIÓN A LA ENFERMEDAD, MIENTRAS QUE LOS NIVELES DE CÉLULAS TREG SE CORRELACIONAN CON MAYORES CARGAS VIRALES Y ACTIVACIÓN DE CÉLULAS T CD8⁺

El siguiente objetivo consistió en analizar las correlaciones entre las subpoblaciones de células Th17 y Treg con variables de seguimiento de la infección y progresión a la enfermedad en los diferentes grupos de individuos. Con el fin de realizar un análisis más exhaustivo de la subpoblación Th17, no solo se determinaron su frecuencia y números absolutos, sino que adicionalmente se evaluó la IMF_r de IL-17 y los niveles de IL-17 plasmáticos (como parámetros de funcionalidad de la subpoblación de células Th17).

Al analizar las muestras basales de los individuos de la cohorte PHI, se observó una correlación positiva entre los niveles de células Th17 y los recuentos de células T CD4⁺ ($p=0.0091$ $r=0.4288$; *Figura 21A*), en concordancia con la correlación directa entre los niveles plasmáticos de IL-17 y los recuentos de células T CD4⁺ ($p=0.0308$ $r=0.4960$; *Figura 21B*). Es interesante destacar la correlación positiva hallada entre el porcentaje de células Th17 y los niveles plasmáticos de la β -quimioquina MDC (del inglés, *macrophage-derived chemokine*; $p=0.0101$ $r=0.5747$; *Figura 21C*), reforzada a su vez por otra correlación positiva entre esta quimioquina con la IMF_r de IL-17 ($p=0.0361$ $r=0.4964$; *Figura 21D*).

Cabe destacar que se ha descrito previamente que MDC posee una actividad supresora sobre la replicación de HIV¹⁵⁴. Por otro lado, el porcentaje de células T CD4⁺ activadas se correlacionó inversamente con la IMFr de IL-17 ($p=0.0304$ $r= -0.5780$; *Figura 21E*) y, por el contrario, se asoció directamente con el porcentaje de células Treg ($p=0.0246$ $r=0.595$; *Figura 21F*).

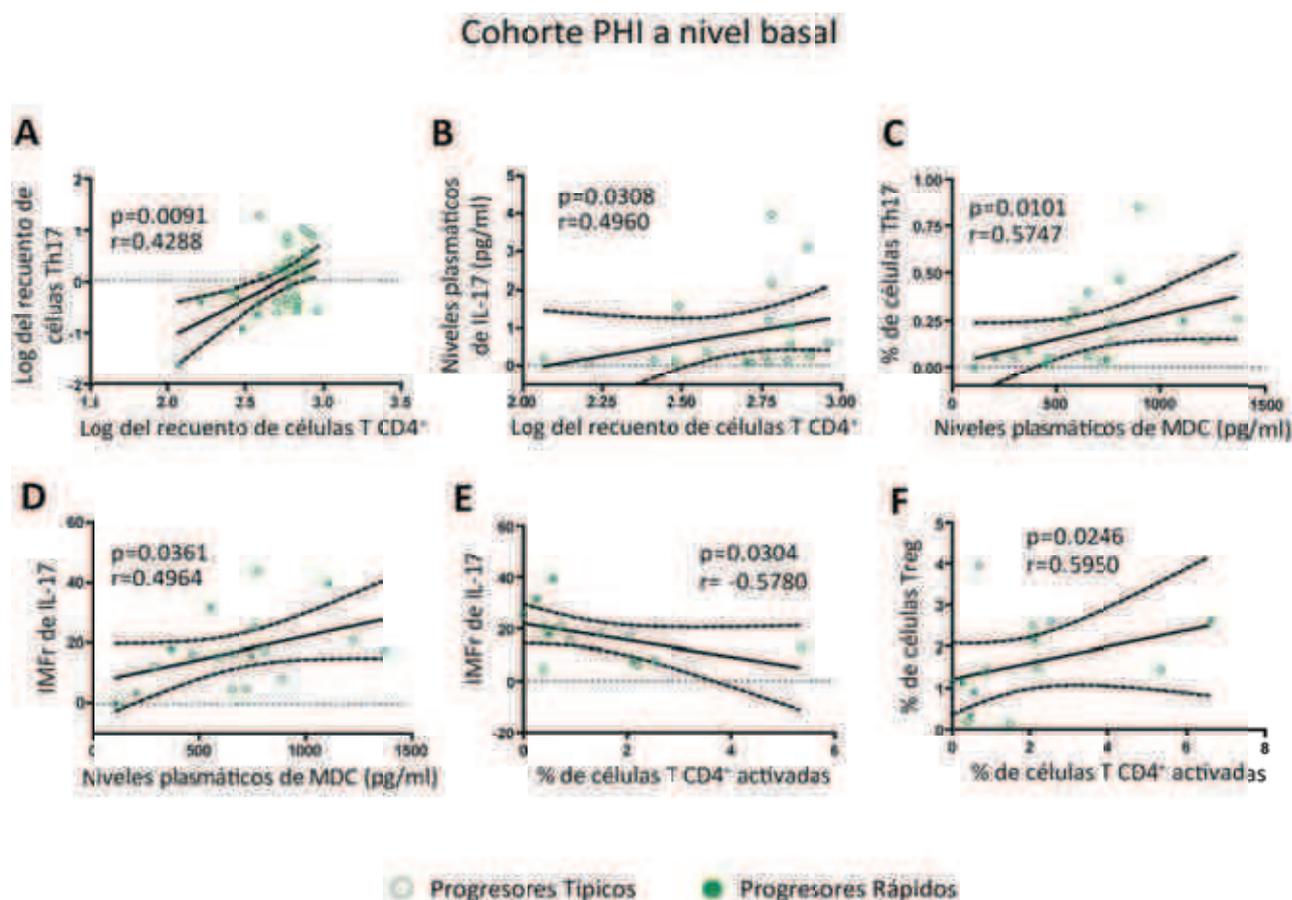


Figura 21: Correlaciones entre las subpoblaciones Th17 y Treg con parámetros de seguimiento de la infección halladas dentro de la cohorte de individuos PHI en muestras basales. Log del recuento de células T CD4⁺ vs. Log del recuento de células Th17 (**A**) y niveles plasmáticos de IL-17 (**B**); niveles plasmáticos de la quimioquina MDC (*macrophage-derived chemokine*) vs. % de células Th17 (**C**) e intensidad media de fluorescencia relativa (IMFr) de IL-17 (**D**); % de células T CD4⁺ activadas vs. IMFr de IL-17 (**E**) y % de células Treg (**F**). Los niveles de mediadores solubles en plasma fueron determinados mediante la técnica de *Luminex*, detallada en Materiales y Métodos. Los símbolos distinguen pacientes individuales de los subgrupos indicados en la figura. *PHI*: cohorte de infección aguda/temprana. Todos los valores de r y p indicados corresponden a correlaciones de *Spearman*.

Un escenario similar emergió al evaluar lo que ocurría al año p.i. dentro de la cohorte de individuos PHI, evidenciado por la asociación de altos niveles de células Th17 y un mejor estatus inmune de los pacientes (recuento de células T CD4⁺; $p=0.0070$ $r=0.5963$; *Figura 22A*), y la relación directa observada entre células Treg y la activación de células T CD8⁺

($p=0.0333$ $r=0.5914$; *Figura 22C*). Para destacar, los niveles de células Th17 presentes a tiempos tardíos p.i. se correlacionaron de forma inversa con los niveles plasmáticos basales del mediador inflamatorio llamado ligando de CD40 soluble (sCD40L, *soluble CD40 ligand*; $p=0.0165$ $r=-0.6484$; *Figura 22B*), un biomarcador asociado con progresión a la enfermedad en HIV/SIDA¹⁵⁵.

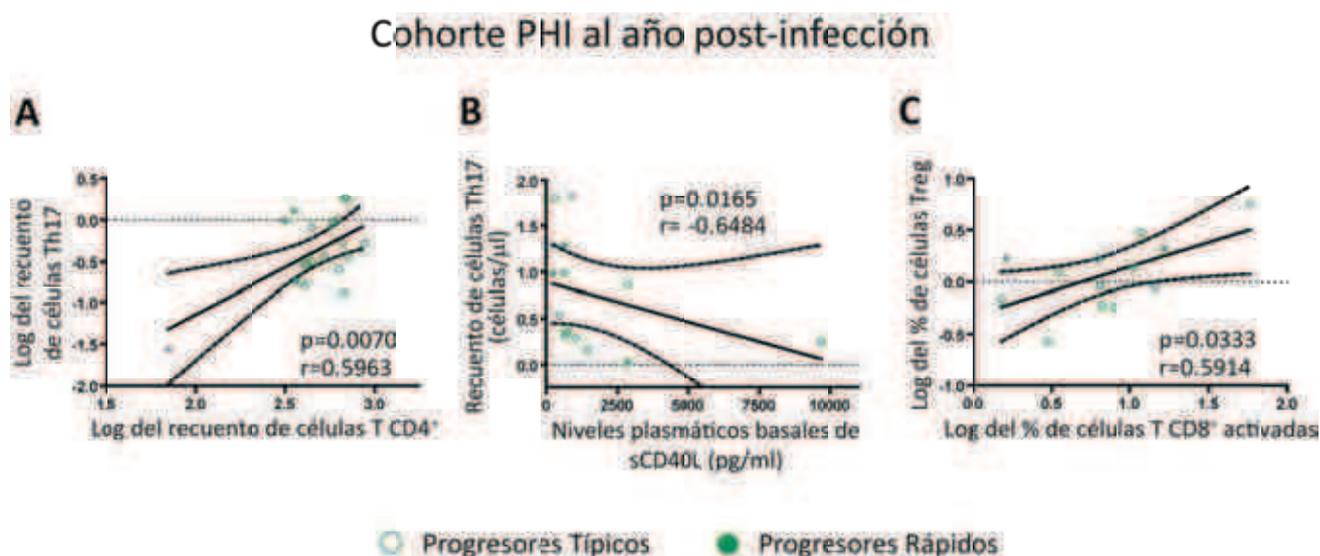


Figura 22: Correlaciones entre las subpoblaciones Th17 y Treg con parámetros de seguimiento de la infección halladas dentro de la cohorte de individuos PHI en muestras de seguimiento al año p.i. Log del recuento de células T CD4⁺ vs. Log del recuento de células Th17 (A); niveles plasmáticos basales del ligando de CD40 soluble (sCD40L, *soluble CD40 ligand*) vs. recuento de células Th17 al año p.i (B); Log del % de células T CD8⁺ activadas vs. Log del % de células Treg (C). Los niveles de mediadores solubles en plasma fueron determinados mediante la técnica de *Luminex*, detallada en Materiales y Métodos. Los símbolos distinguen pacientes individuales de los diferentes subgrupos indicados en la figura. *PHI*: cohorte de infección aguda/temprana. Todos los valores de r y p indicados corresponden a correlaciones de *Spearman*.

Cuando todos los individuos crónicamente infectados fueron incluidos en los análisis (Crónicos, ECs y muestras del año p.i. de la cohorte de individuos PHI), la CV se correlacionó negativamente con los recuentos de células Th17 ($p=0.0041$ $r=-0.4294$; *Figura 23A*) y positivamente con los niveles de células Treg ($p=0.0174$ $r=0.3995$; *Figura 23B*). Esta última observación concuerda con las asociaciones halladas entre altos niveles de Treg con menores recuentos de células T CD4⁺ ($p=0.0100$ $r=-0.4423$; *Figura 23C*).

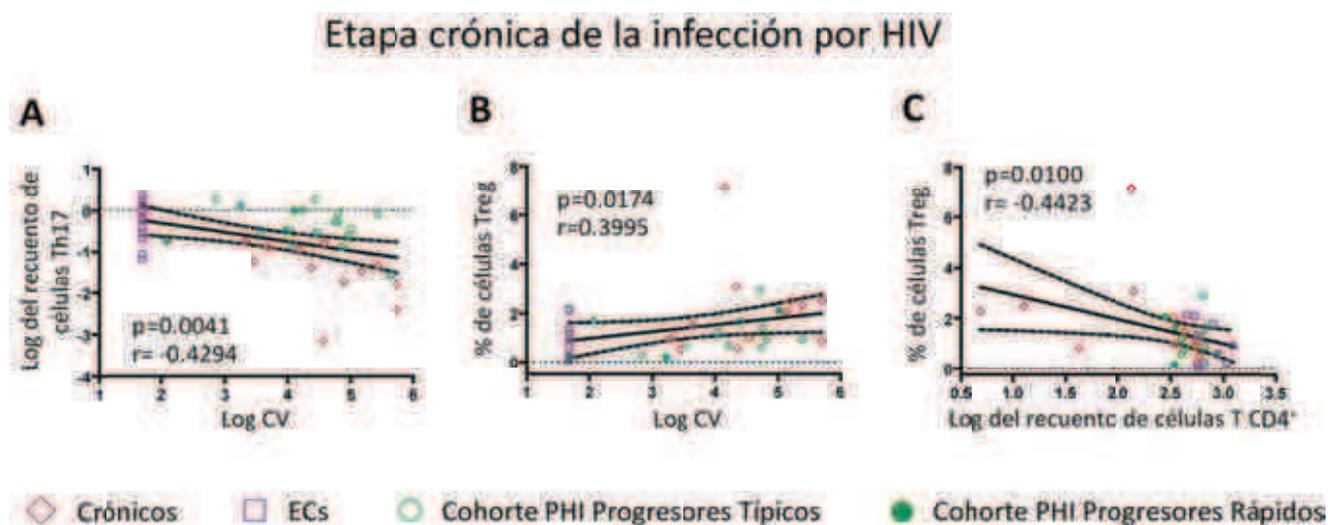


Figura 23: Correlaciones entre las subpoblaciones Th17 y Treg con parámetros de seguimiento de la infección halladas en etapas crónicas de la infección por HIV. Los análisis incluyen las muestras de pacientes de los grupos de Crónicos, ECs y PHIs al año p.i: Log de la CV vs. Log del recuento de células Th17 (A) y % de células Treg (B); Log del recuento de células T CD4⁺ vs. % de células Treg (C). Los símbolos distinguen pacientes individuales de los diferentes grupos indicados en la figura. ECs: controladores elite. PHI: cohorte de infección aguda/temprana. Todos los valores de r y p indicados corresponden a correlaciones de Spearman.

En suma, estos resultados sugieren que la preservación de la subpoblación de células Th17 se encuentra positivamente relacionada con una mejora en el estatus inmunológico y virológico de los pacientes (en base al análisis del recuento de células T CD4⁺, la CV plasmática, marcadores solubles de progresión a la enfermedad y los niveles de activación inmune). Por el contrario, la expansión de la subpoblación Treg se asoció directamente con niveles incrementados de activación inmune, replicación viral y menores recuentos de células T CD4⁺.

IV. 1. 5. MAYORES NIVELES BASALES DE CÉLULAS TH17 SE CORRELACIONAN CON UNA MAYOR FUNCIONALIDAD DE LA RESPUESTA T CD8⁺ ESPECÍFICA FRENTE A HIV-1

Uno de los principales y novedosos aportes del presente trabajo de tesis constituye el análisis del potencial impacto que pudieran tener las alteraciones en las proporciones y balance de células Th17 y Treg sobre las respuestas T CD8⁺ específicas con relevancia en la inmunidad antiviral protectora en la infección por HIV. En consecuencia, el siguiente objetivo consistió en analizar la relación entre los niveles basales de células Th17 con funciones de la

respuesta HIV-específica T CD8⁺ previamente asociadas con un mejor pronóstico clínico en la infección por HIV⁶¹.

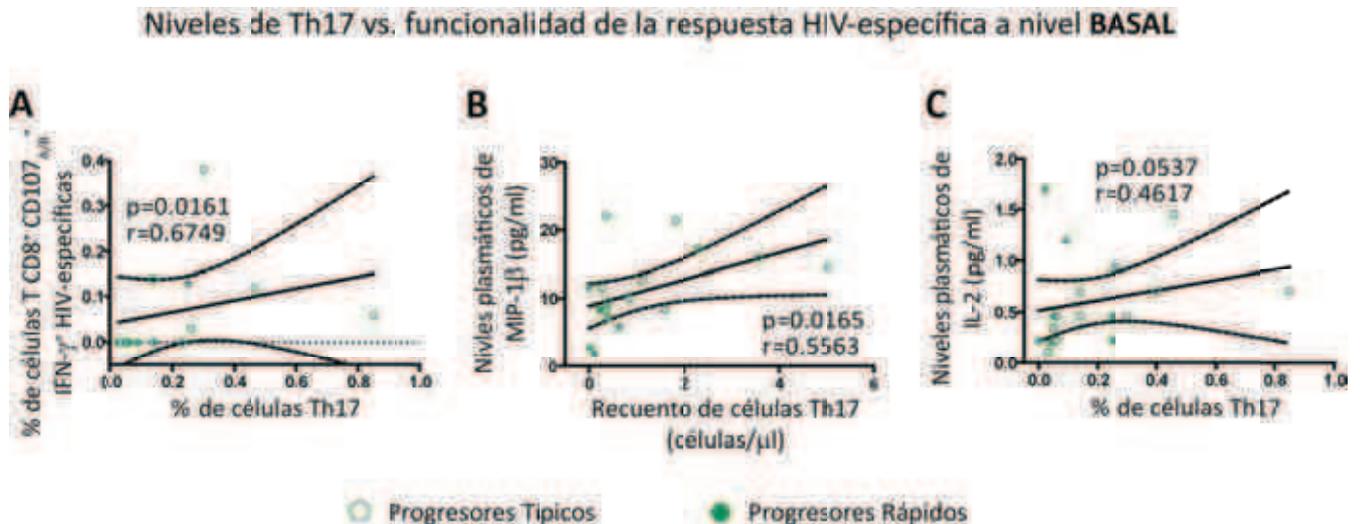


Figura 24: Correlaciones entre los niveles basales de células Th17 y respuestas T CD8⁺ HIV-específicas previamente asociadas con protección. Correlaciones positivas halladas dentro de la cohorte de individuos PHI en muestras basales: % de células Th17 vs. % de células T CD8⁺ HIV-específicas CD107_{A/B}⁺ IFN- γ ⁺ (A) y niveles plasmáticos de IL-2 (C); recuento de células Th17 vs. niveles plasmáticos de MIP-1 β (B). Los niveles de mediadores solubles en plasma fueron determinados mediante la técnica de *Luminex*. La funcionalidad de la respuesta T CD8⁺ específica frente a HIV fue determinada mediante un ensayo que permitió evaluar, por citometría de flujo, las células T CD8⁺ con la capacidad de degranular y secretar IFN- γ simultáneamente tras su estimulación con péptidos de HIV. El protocolo se encuentra descrito detalladamente en Materiales y Métodos^{53,61}. Los símbolos distinguen pacientes individuales de los diferentes subgrupos indicados en la figura. Todos los valores de r y p indicados corresponden a correlaciones de *Spearman*.

Se observó una correlación positiva con significancia estadística entre la frecuencia de células Th17 y la proporción de células T CD8⁺ HIV-específicas capaces de degranular y producir IFN- γ simultáneamente (células T CD8⁺ bifuncionales CD107_{A/B}⁺ IFN- γ ⁺; $p=0.0161$ $r=0.6749$; *Figura 24A*). Cabe destacar que, en concordancia con la hipótesis propuesta, que enuncia que se encontrará una mejor inmunidad celular en aquellos pacientes con mayores niveles basales de Th17, se observaron asociaciones entre la preservación de esta subpoblación con mayores niveles plasmáticos de MIP-1 β (β -quimioquina producida por células T asociada con propiedades antivirales; $p=0.0165$ $r=0.5563$; *Figura 24B*) y también se observó una tendencia a mayores niveles plasmáticos de IL-2 (citoquina involucrada en la homeostasis de células T; $p=0.0537$ $r=0.4617$; *Figura 24C*).

También se observó que los recuentos basales de células Th17 se correlacionan positivamente con la proporción de células T CD8⁺ HIV-específicas bifuncionales a tiempos tardíos ($p=0.0370$ $r=0.6055$; *Figura 25A*). Esto sugiere que los niveles basales de células Th17 podrían tener un valor pronóstico para la funcionalidad de la respuesta T antiviral detectada a tiempos tardíos p.i. Asimismo, aunque no resultó estadísticamente significativa, se observó una correlación positiva entre los recuentos basales de células Th17 y la capacidad de células T CD8⁺ de suprimir la replicación viral en células T CD4⁺ autólogas *in vitro* (VIA) en muestras de un año p.i. ($p=0.0655$ $r=0.5727$; *Figura 25B*). Notablemente, también se observó que los niveles basales de células Th17 se correlacionan negativamente con el porcentaje de células T CD8⁺ específicas contra HIV que expresan la molécula PD-1 a tiempos tardíos p.i. ($p=0.0440$ $r= -0.6150$; *Figura 25C*).

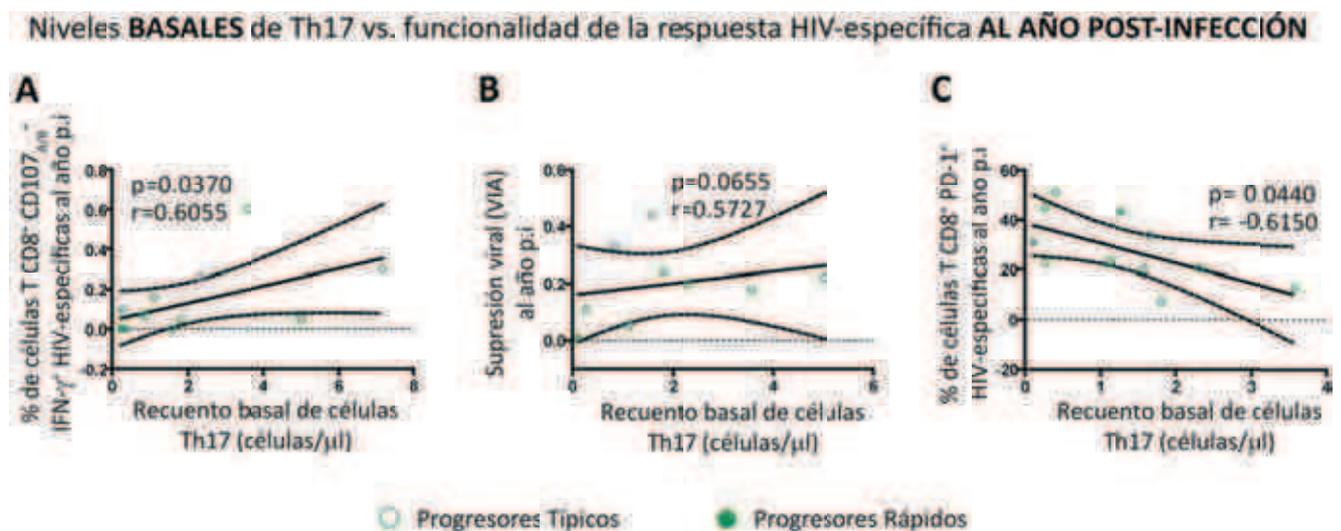


Figura 25: Correlaciones entre los niveles basales de células Th17 y respuestas T CD8⁺ HIV-específicas previamente asociadas con protección detectadas al año p.i. Correlaciones entre los niveles basales de células Th17 y las respuestas específicas frente a HIV detectadas a tiempo tardío p.i. dentro de la cohorte de individuos PHI: recuento basal de células Th17 vs. % de células T CD8⁺ HIV-específicas CD107_{A/B}⁺ IFN- γ ⁺ (A), VIA (B) y % de células T CD8⁺ HIV-específicas PD-1⁺ (C), todas funciones determinadas en muestras de un año p.i. La funcionalidad de la respuesta T CD8⁺ específica frente a HIV fue determinada mediante diferentes ensayos: uno de ellos permitió evaluar, mediante citometría de flujo, las proporciones de células T CD8⁺ con la capacidad de degranular y secretar IFN- γ simultáneamente tras su estimulación con péptidos de HIV; otro de los ensayos permitió medir la capacidad global de células T CD8⁺ de inhibir la replicación de HIV-1 en células T CD4⁺ autólogas *in vitro* (VIA); el último evaluó la expresión del marcador de agotamiento celular PD-1 en células T CD8⁺ HIV-específicas tras su estimulación con péptidos de HIV por citometría de flujo. Los protocolos se encuentran descritos detalladamente en la sección Materiales y Métodos^{53,61}. Los símbolos distinguen pacientes individuales de los diferentes subgrupos indicados en la figura. Todos los valores de r y p indicados corresponden a correlaciones de Spearman.

Es importante remarcar que todas las correlaciones mencionadas resultaron específicas de la subpoblación Th17, dado que no se observaron relaciones entre la respuesta T CD8⁺ antiviral y los niveles de células Th1 (*Figura 26*).

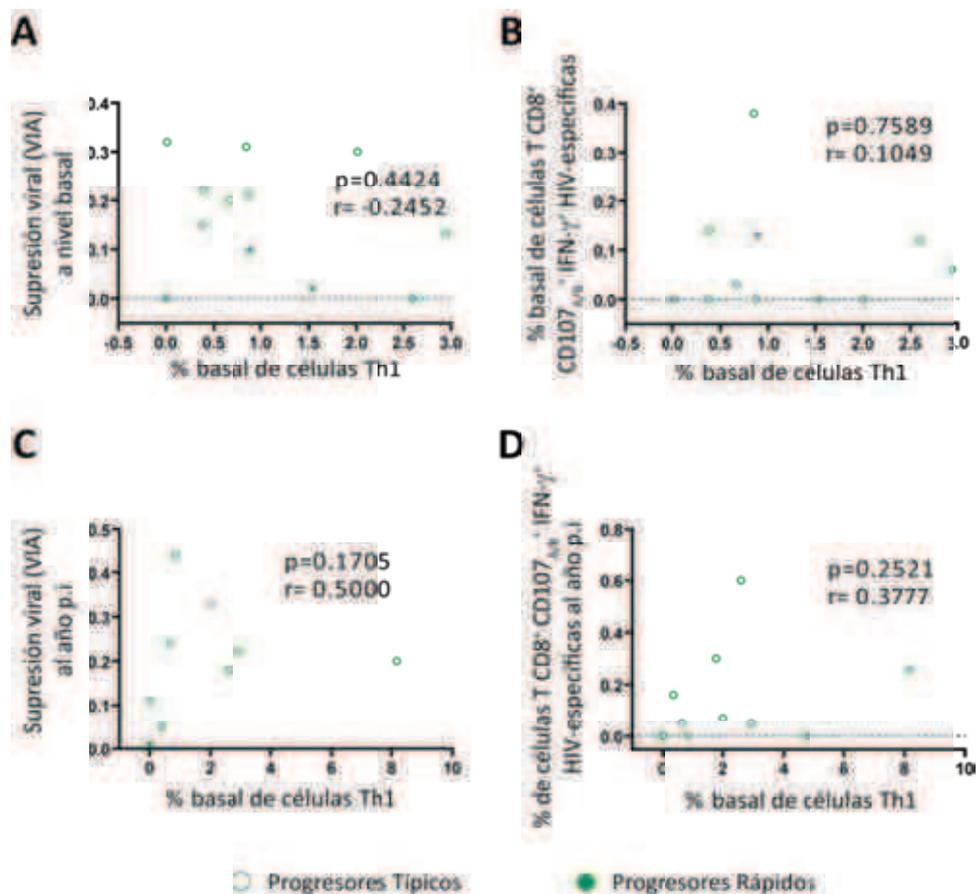


Figura 26: Los niveles de la subpoblación de células Th1 no se correlacionan con la respuesta T CD8⁺ HIV-específica. Células Th1 (definidas como CD4⁺ IFN- γ ⁺) fueron identificadas por citometría de flujo luego de una estimulación policonal, como se describe en Materiales y Métodos. Se muestra que no existen correlaciones entre las frecuencias de células Th1 y la respuesta T CD8⁺ HIV-específica, tanto a nivel basal (**A** y **B**) como al año p.i. (**C** y **D**) dentro de la cohorte PHI. En particular, se muestran a ambos tiempos tanto el % basal de células Th1 vs. la capacidad de supresión viral (VIA, **A** y **C**) como el % de células T CD8⁺ CD107_{A/B}⁺ IFN- γ ⁺ HIV-específicas (**B** y **D**). Lo mismo se observa cuando se analizan los recuentos absolutos, tanto basales como al año p.i., de células Th1. Los símbolos distinguen pacientes individuales de los diferentes subgrupos indicados en la figura. Todos los valores de r y p indicados corresponden a correlaciones de *Spearman*.

Los resultados descritos en esta sección sugieren que existe una relación directa entre los niveles basales de células Th17 y la funcionalidad de la respuesta T CD8⁺ antiviral protectora (tanto a tiempos tempranos como tardíos de la infección por HIV), resaltando el potencial impacto que la preservación de esta subpoblación podría tener sobre el desarrollo de una inmunidad antiviral efectiva.

IV. 1. 6. LA FUNCIONALIDAD DE LAS CÉLULAS TH17 Y LA RELACIÓN TH17/TREG DETECTADAS A TIEMPOS TARDÍOS POST-INFECCIÓN TAMBIÉN INFLUENCIAN LA CALIDAD DE LAS RESPUESTAS T CD8⁺ ESPECÍFICAS FRENTE A HIV-1

A continuación, se analizaron, dentro de la cohorte de individuos PHI, las posibles relaciones entre: los niveles de células Th17, su funcionalidad (IMFr de IL-17) y la relación Th17/Treg con la funcionalidad de las células T CD8⁺ HIV-específicas a tiempos tardíos p.i. La importancia de evaluar la actividad antiviral *ex vivo* mediante el ensayo de VIA se ve reflejado por reportes previos que han demostrado que este parámetro puede predecir la velocidad de decaimiento del recuento de células T CD4⁺ durante la infección por HIV¹⁵⁶.

Cuando los individuos de la cohorte PHI fueron sub-divididos en función de los niveles de su respuesta VIA, se observó que aquellos que poseían una mayor magnitud de VIA a nivel basal (>25%) mostraban también una relación CD4/CD8 significativamente mayor en comparación con individuos PHI cuyo VIA basal era más bajo (<25%) tanto a nivel basal como al año p.i. [0.57 (0.42-1.26) CD4/CD8 basal en VIA>25% vs. 0.25 (0.13-0.36) CD4/CD8 basal en VIA<25%, $p=0.0270$; 0.92 (0.66-1.07) CD4/CD8 al año p.i. en VIA>25% vs. 0.35 (0.26-0.52) CD4/CD8 al año p.i. en VIA<25%, $p=0.0159$; *Figura 27A*]. Estos resultados resaltan el valor pronóstico de esta función T CD8⁺ antiviral tal como ha sido reportado para otras cohortes de pacientes en las que VIA se correlaciona con mayores recuentos de células T CD4⁺¹⁵⁶ y con menores valores de CV¹⁵⁷. A continuación, resultó interesante la observación de que la funcionalidad de las células Th17 (evaluada como la IMFr de IL-17, indicador del nivel de producción de IL-17) se correlacionó positivamente con VIA ($p=0.0062$ $r=0.7636$; *Figura 27B*). Y en este caso, cuando las muestras fueron sub-divididas en función de sus niveles de VIA (>25% o <25%), se observaron diferencias significativas entre sub-grupos, encontrando mayor IMFr de IL-17 en aquellos pacientes con mayor VIA [25.8 (21.8-31.5) en VIA>25% vs. 17.9 (12.9-19.8) en VIA<25%; $p=0.0206$; *Figura 27C*]. Finalmente, también se encontró una correlación directa entre la relación Th17/Treg y VIA ($p=0.0120$ $r=0.8649$; *Figura 27D*). De este modo, individuos de la cohorte

PHI con una relación Th17/Treg más preservada mostraron poseer células T CD8⁺ específicas contra HIV con mayor capacidad de suprimir la replicación de HIV *in vitro*.

Relación Th17/Treg y funcionalidad de Th17 vs. funcionalidad de la respuesta T antiviral
AL AÑO POST-INFECCIÓN

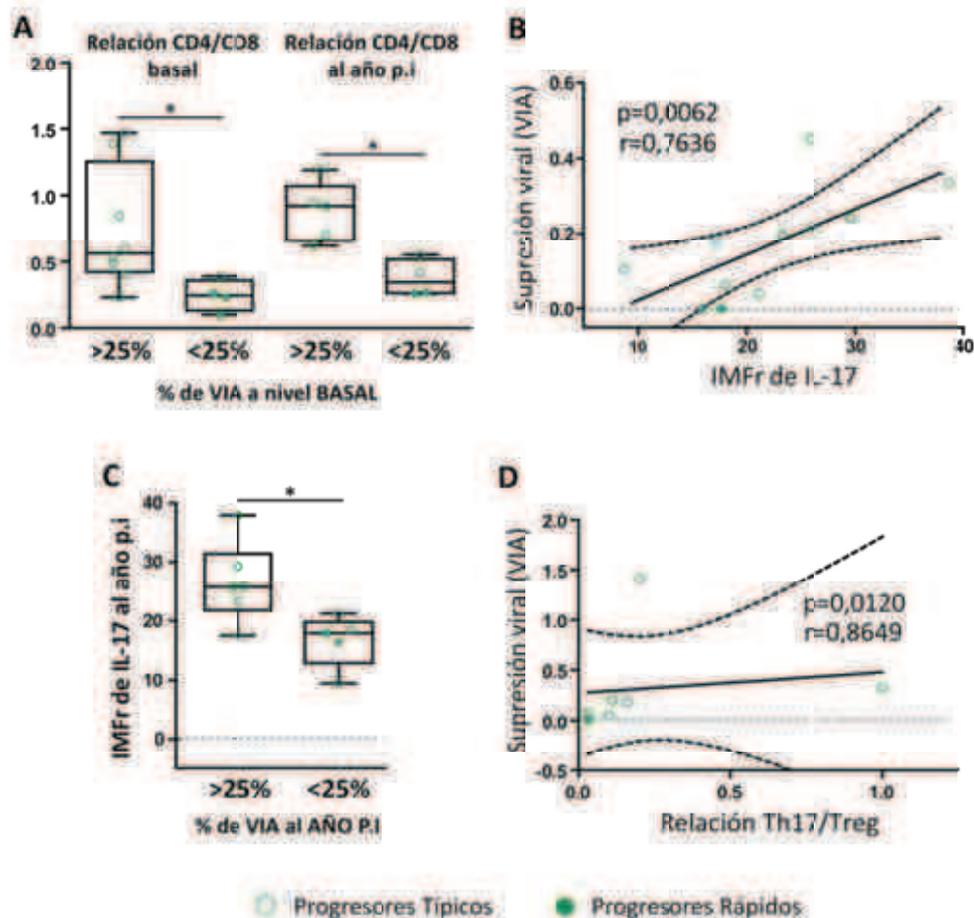


Figura 27: Influencia de los niveles de células Th17 y la relación Th17/Treg en la calidad de la respuesta T CD8⁺ específica frente a HIV a tiempos tardíos p.i. Diferencias entre individuos de la cohorte PHI que poseen una magnitud de VIA mayor o menor al 25% (> y <25%, respectivamente) en cuanto a su relación CD4/CD8 tanto a nivel basal como al año p.i (A). Correlación hallada entre VIA vs. la intensidad media de fluorescencia relativa (IMFr) de IL-17 dentro de individuos PHI al año p.i (B). Comparación entre pacientes de la cohorte PHI con un VIA > y <25% al año p.i en cuanto a su IMFr de IL-17 también evaluada al año p.i (C). Correlación hallada entre la actividad de VIA vs. la relación Th17/Treg dentro de la cohorte PHI en muestras de un año p.i (D). Los símbolos distinguen pacientes individuales de los diferentes subgrupos indicados en la figura. PHI: infección aguda/temprana por HIV. La línea dentro de las cajas indica el valor de la mediana, mientras que sus límites delimitan los percentiles 25-75 y las barras indican los valores máximo y mínimo. Se indican los valores de *p* obtenidos: * *p*<0.05 (A y C). Los valores de *r* y *p* indicados corresponden a correlaciones de Spearman (B y D).

Los resultados de esta sección muestran que, a tiempos tardíos p.i, tanto la funcionalidad de las células Th17 como la relación Th17/Treg se relacionaron con una mayor funcionalidad de las células T CD8⁺ HIV-específicas capaces de inhibir la replicación viral (VIA).

IV. 1. 7. LOS NIVELES DE CÉLULAS Th17 TAMBIÉN SE CORRELACIONAN CON OTRAS SUBPOBLACIONES DE CÉLULAS T EFECTORAS

A la luz de los resultados anteriormente expuestos, que señalan la existencia de una correlación entre la subpoblación de células Th17 y las células T CD8⁺ HIV-específicas, también se consideró interesante evaluar la posible relación entre los niveles de células Th17 y otras subpoblaciones de células T que ejercen diferentes funciones efectoras potencialmente protectoras frente a otros patógenos. Para ello, diferentes poblaciones de células T efectoras fueron fenotipificadas, luego de una estimulación policlonal de sus TCRs, como Th1 (CD4⁺ IFN- γ ⁺), Tc1 (CD8⁺ IFN- γ ⁺) y Tc17 (CD8⁺ IL-17⁺) siguiendo el protocolo descrito en Materiales y Métodos.

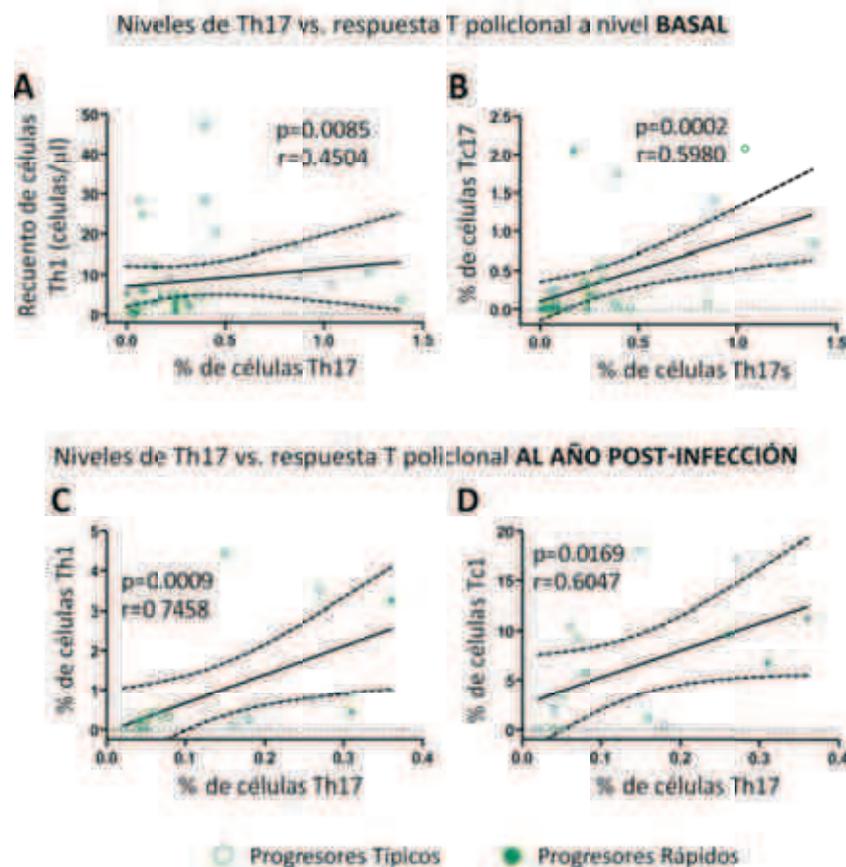


Figura 28: Correlaciones entre la subpoblación de células Th17 y otras poblaciones de células T efectoras evaluadas tras una estimulación policlonal. Correlaciones positivas halladas entre los niveles de células Th17 y otras poblaciones de células T efectoras dentro de la cohorte de individuos PHI: % de células Th17 vs. recuento de células Th1 (CD4⁺ IFN- γ ⁺; **A**) y % de células Tc17 (CD8⁺ IL-17⁺; **B**) ambos a nivel basal; % de células Th17 vs. % de células Th1 (**C**) y % de células Tc1 (CD8⁺ IFN- γ ⁺; **D**) ambos al año p.i. Las subpoblaciones de células T efectoras fueron determinadas mediante citometría de flujo tras una estimulación de 6 horas con una mezcla de anticuerpos anti-CD3/anti-CD28 como se describe en Materiales y Métodos. Los símbolos distinguen pacientes individuales de los diferentes subgrupos indicados en la figura. Todos los valores de r y p indicados corresponden a correlaciones de *Spearman*.

La *Figura 28* muestra que, dentro de la cohorte de infección aguda, la frecuencia de células Th17 a nivel basal se correlacionó directamente con los recuentos de células con un perfil Th1 ($p=0.0085$ $r=0.4504$; *Figura 28A*) y también con las proporciones de células Tc17 ($p=0.0002$ $r=0.5980$; *Figura 28B*) ambas en muestras basales. Cuando los mismos análisis se realizaron en las muestras de un año p.i, también se halló una correlación directa entre las células Th17 y la frecuencia de células Th1 ($p=0.0009$ $r=0.7458$; *Figura 28C*) y Tc1 ($p=0.0169$ $r=0.6047$; *Figura 28D*).

Un análisis más profundo, reveló que las proporciones de las subpoblaciones celulares Th1 y Tc17 tendían a sufrir una reducción durante el primer año de infección y que, en estos tiempos tardíos, los niveles se encontraban significativamente reducidos en comparación a los valores normales hallados en DSs [1.59 (0.94-2.73) % de células Th1 en DSs vs. 0.33 (0.12-1.56) % de células Th1 en PHIs al año p.i, $p=0.0192$, *Figura 29A*; 0.22 (0.02-0.49) % de células Tc17 en DSs vs. 0.02 (0.01-0.03) % de células Tc17 en PHIs al año p.i, $p=0.0104$, *Figura 29C*]. En contraste, la subpoblación Tc1 evaluada al año p.i, no se encontró disminuida ni en relación a lo observado en DSs ni frente a los valores basales (*Figura 29B*). Estos resultados refuerzan el concepto de que, durante la infección por HIV, no sólo la subpoblación de células Th17 sino otros perfiles de células T efectoras que ejercen importantes funciones se encuentran dañadas.

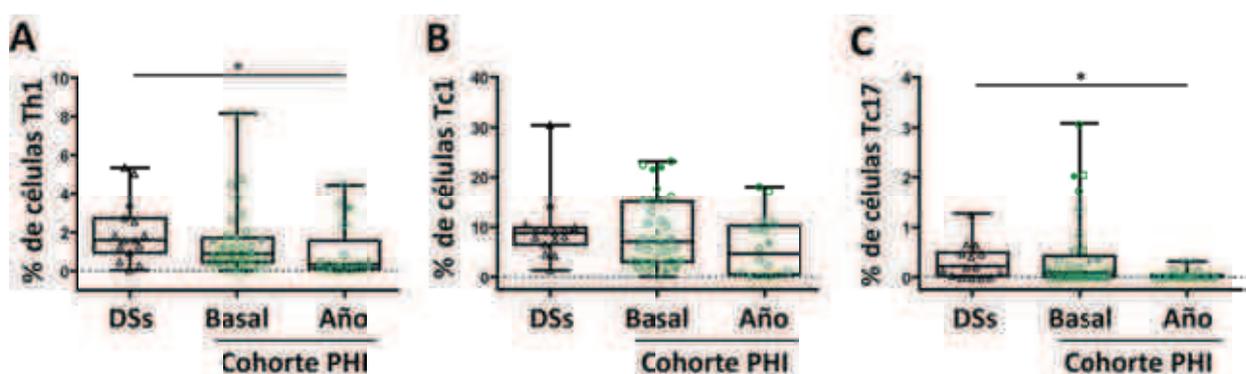


Figura 29: Evaluación de las subpoblaciones de células T efectoras Th1, Tc1 y Tc17 durante la infección aguda por HIV. PBMCs fueron estimuladas durante 6 horas con anti-CD3/anti-CD28 o medio solo (control de *background*) previo a su marcación intracelular. Se muestran los valores de la frecuencia obtenidos luego de sustraer el *background* para: células Th1 ($CD4^+$ $IFN-\gamma^+$; **A**), Tc1 ($CD8^+$ $IFN-\gamma^+$; **B**) y Tc17 ($CD8^+$ $IL-17^+$; **C**). La línea dentro de las cajas indica el valor de la mediana, mientras que sus límites delimitan los percentiles 25-75 y las barras indican los valores máximo y mínimo. Cada símbolo representa pacientes individuales de los grupos indicados en la figura. DSs: dadores sanos. PHI: cohorte de infección aguda/temprana a nivel basal y al año p.i. Se indican los valores de p obtenidos: * $p < 0.05$.

En conclusión, los resultados presentados en los párrafos precedentes, indican que la proporción de células Th17 se correlacionó no solo con respuestas T CD8⁺ específicas frente a HIV sino también con los niveles de otras subpoblaciones de células T efectoras con potencial importancia en la respuesta frente a diferentes patógenos.

IV. 2. **PARTE II: ESTUDIO DEL IMPACTO DEL TRATAMIENTO ANTIRRETROVIRAL SOBRE LA RESTAURACIÓN DE LAS SUBPOBLACIONES DE CÉLULAS TH17, T_{REG} Y SU BALANCE EN SANGRE PERIFÉRICA Y TRACTO GENITAL FEMENINO**

Un importante aspecto que debe ser considerado es el efecto del TARV en el restablecimiento de las proporciones de células Th17 y del balance Th17/Treg durante la infección crónica causada por HIV-1. Diferentes trabajos han demostrado que lo que se observa a nivel de periferia no necesariamente se ve reflejado en lo que ocurre en sitios de mucosas^{121,123,158}, fundamentalmente en GALT, donde han sido realizados la mayoría de los estudios. Por ello, el segundo objetivo de la presente tesis se centra en la evaluación de la dinámica de las subpoblaciones mencionadas tanto en periferia como en el tracto genital femenino (primer sitio de contacto con el virus tras su transmisión heterosexual), en el contexto de la implementación del TARV.

IV. 2. 1. **CARACTERÍSTICAS DE LOS INDIVIDUOS SELECCIONADOS**

Los diferentes grupos de individuos seleccionados para realizar esta segunda parte del estudio fueron: un grupo de 20 dadores seronegativos para la infección por HIV-1 (DSs), 22 individuos crónicamente infectados *naïve* de TARV (TARV⁻), y un grupo de 19 pacientes crónicamente infectados que se encuentran bajo TARV, durante al menos 2 años, con supresión efectiva de su CV plasmática (TARV⁺). Los dos primeros grupos mencionados se incluyeron como grupos control con el objetivo de comparar los diferentes parámetros evaluados en relación a lo que ocurre en individuos bajo tratamiento (una descripción detallada de los criterios de inclusión de los pacientes de cada grupo se puede consultar en

la sección III.1 de Materiales y Métodos). La *Tabla 3* resume las principales características de los grupos de individuos infectados incluidos en esta segunda parte de la tesis.

Tabla 3. Características de los individuos crónicamente infectados con HIV-1 seleccionados para la Parte II

Grupo	Muestra (nº de individuos)	Edad (años), mediana (IQ)	Log ₁₀ CV ^a , media±DS	Tiempo bajo HAART (años), mediana (IQ)	Recuento de células T CD4 ^b , mediana del nº de células/µl (IQ)	Recuento de células T CD8 ^b , mediana del nº de células/µl (IQ)	Relación CD4/CD8, mediana (IQ)
TARV ⁻	n=22	36 (28-43)	4.52±0.91	---	348 (44-555)	959 (540-1243)	0.25 (0.05-0.44)
TARV ⁺	n=19	41 (37-47)	<1.70	7 (4-16)	556 (376-596)	709 (458-787)	0.73 (0.53-0.99)

TARV⁻: individuos crónicamente infectados por HIV-1 *naïve* de tratamiento antirretroviral. TARV⁺: individuos crónicamente infectados por HIV-1 bajo tratamiento antirretroviral. HAART: tratamiento antirretroviral de alta eficacia. CV: carga viral. IQ: rango intercuartil. DS: desvío *standard*.

^a: *Versant HIV-1 RNA 3.0 assay, Siemens*. Los límites de detección negativo y positivo son 50 y 500.000 copias de ARN viral/ml de plasma, respectivamente (1.7 y 5.7 log₁₀).

^b: Citometría de flujo doble plataforma, *FACSCanto, BD Biosciences*.

Puede observarse que el TARV resulta en la disminución de la CV plasmática a niveles indetectables en todos los individuos TARV⁺ mientras que el grupo TARV⁻ presenta altos valores de CV. Los individuos del grupo TARV⁺ presentan largos períodos de tiempo bajo distintos esquemas de tratamiento, con un mínimo de 2 años. En concordancia con su supresión efectiva y prolongada de la CV plasmática, los individuos del grupo TARV⁺ presentan mayores recuentos de células T CD4⁺ y relación CD4/CD8 comparados a los pacientes del grupo TARV⁻ (valores de *p* 0.0338 y 0.0001, respectivamente).

IV. 2. 2. EL TRATAMIENTO ANTIRRETROVIRAL RESTAURA TANTO EL BALANCE TH17/ TREG COMO LA PROPORCIÓN Y FUNCIONALIDAD DE CÉLULAS TH17 EN SANGRE PERIFÉRICA

Con el objetivo de estudiar el impacto del tratamiento antirretroviral sobre la potencial restauración de las subpoblaciones Th17 y Treg en sangre periférica, en primer lugar se procedió a determinar las proporciones de estas subpoblaciones y su balance en PBMCs mediante citometría de flujo, como ha sido previamente descrito (secciones III.4.3.1 y III.4.3.2 de Materiales y Métodos).

Pudo observarse que las proporciones de células Th17 (% de células Th17) resultaron mayores en el grupo TARV⁺ en relación a lo observado en individuos TARV⁻ [0.45% (0.30-0.61) en TARV⁺ vs. 0.05% (0.02-0.08) en TARV⁻; *p*=0.001; *Figura 30A*] y, asimismo, los niveles de Th17 de pacientes TARV⁺ resultaron similares a los hallados en DSs [0.18%

(0.14-0.31); *Figura 30A*]. Cabe destacar que, como se observa en la *Figura 30B*, el tratamiento restableció tanto las proporciones como la funcionalidad de esta subpoblación (en relación a la capacidad de cada célula de producir IL-17), siendo similar la IMFr de IL-17 en individuos TARV⁺ [21.06 (12.86-34.39)] en relación a la observada en DSs [13.48 (9.07-19.43)] y ambos significativamente mayores a lo observado en pacientes TARV⁻ [8.16 (4.41-9.86); vs. TARV⁺ $p=0.0001$ y vs. DSs $p=0.0013$; *Figura 30B*]. Del mismo modo, al estudiar lo que ocurría con la relación Th17/Treg se pudo observar que, tras el tratamiento, la misma aumenta llegando a valores normales [0.37 (0.17-1.66) en TARV⁺ vs. 0.18 (0.12-0.70) en DSs; *Figura 30C*], en contraste a lo observado en individuos TARV⁻ cuya relación Th17/Treg resultó significativamente menor comparada con ambos grupos [0.03 (0.01-0.09) vs. TARV⁺ $p=0.0001$ y vs. DSs $p=0.003$; *Figura 30C*].

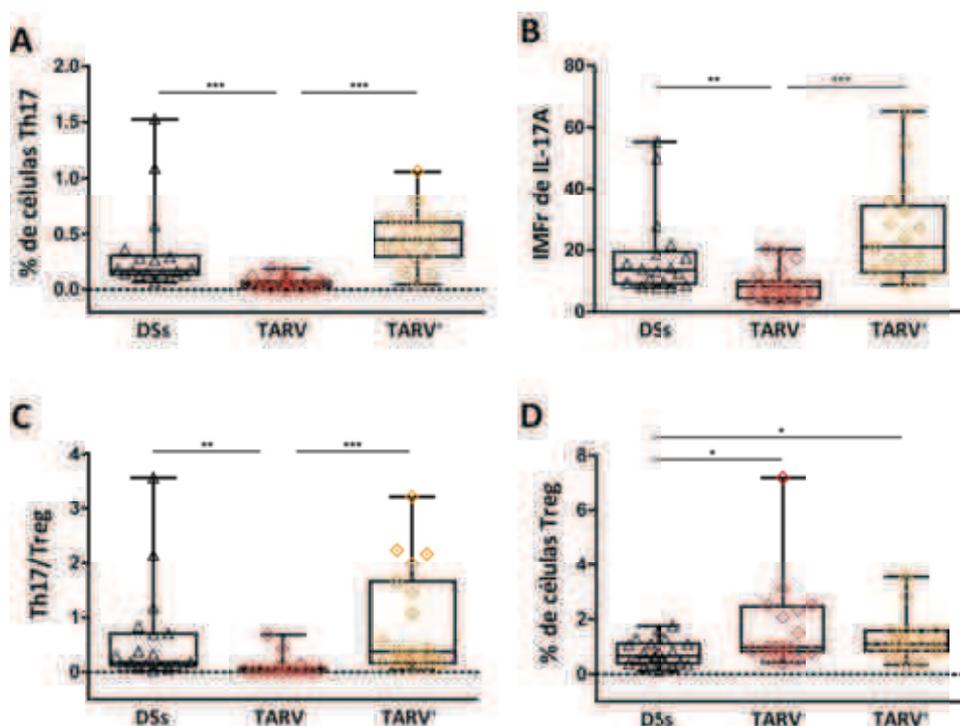


Figura 30: Restauración de la proporción y funcionalidad de la subpoblación Th17 y de la relación Th17/Treg en individuos crónicamente infectados bajo tratamiento antirretroviral. PBMCs fueron estimuladas durante 6 horas en presencia de una mezcla de anticuerpos anti-CD3/anti-CD28 o en medio completo solo (control de *background*) previo a su marcación intracelular. Se muestran los valores de frecuencia de células Th17 luego de sustraer el *background* (A) y de intensidad media de fluorescencia relativa (IMFr) de IL-17 (B). Tinción intranuclear para la detección de células Treg (D). La relación Th17/Treg fue calculada para cada individuo (C). La línea dentro de las cajas indica el valor de la mediana, mientras que sus límites delimitan los percentiles 25-75 y las barras indican los valores máximo y mínimo. Cada símbolo representa pacientes individuales: Dadores sanos (Δ , DSs), individuos crónicamente *naïve* de tratamiento antirretroviral (\diamond , TARV⁻) y bajo tratamiento (\diamond , TARV⁺). Se indican los valores de p obtenidos: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$.

Por el contrario, al analizar el compartimento de la subpoblación de células Treg, pudo observarse que en individuos crónicamente infectados por HIV, el tratamiento no tiene un efecto sobre las proporciones de estas células, las cuales se mantienen en niveles similares a lo observado en pacientes TARV⁻ [0.97% (0.81-2.46) en TARV⁻ vs. 1.08% (0.84-1.57) en TARV⁺; *Figura 30D*], y ambos grupos muestran mayores valores de Treg en relación a DSS [0.65% (0.40-1.10) vs. TARV⁻ $p=0.012$ y vs. TARV⁺ $p=0.03$; *Figura 30D*].

En resumen, esta sección muestra que el tratamiento antirretroviral con supresión efectiva de la CV plasmática resulta en la restauración de la subpoblación de células Th17 y del balance Th17/Treg en muestras de sangre periférica, a pesar de que no logra revertir las altas proporciones de células Treg en pacientes infectados.

IV. 2. 3. EL TRATAMIENTO ANTIRRETROVIRAL NO LOGRA RESTAURAR LA ACTIVACIÓN DE CÉLULAS T CD4⁺ A LOS VALORES OBSERVADOS EN DADORES SANOS. UNA MAYOR ACTIVACIÓN CELULAR SE CORRELACIONA CON MENORES NIVELES DE CÉLULAS TH17 Y DE LA RELACIÓN TH17/ TREG Y CON MAYORES NIVELES DE CÉLULAS TREG

Los resultados descriptos en la primera parte de esta tesis evidenciaron que, tanto durante la infección aguda como en la fase crónica de la infección por HIV-1, los niveles de las subpoblaciones Th17 y Treg se correlacionan diferencialmente con distintos parámetros de seguimiento de la infección. En base a estos hallazgos, se consideró importante investigar el impacto del tratamiento sobre los niveles de activación inmune en muestras de sangre periférica en los distintos grupos de pacientes y analizar su relación con los niveles de células Th17 y Treg y su balance.

Se pudo observar que, en individuos TARV⁺, las proporciones de células T CD8⁺ y CD4⁺ activadas es menor en relación a lo observado en el grupo de pacientes TARV⁻ [4.56% (2.13-6.19) de células T CD8⁺ activadas en TARV⁺ vs. 12.29% (9.78-19.74) de células T CD8⁺ activadas en TARV⁻, $p=0.0001$, *Figura 31A panel izquierdo*; 1.61% (0.73-2.68) de células T CD4⁺ activadas en TARV⁺ vs. 2.72% (1.91-7.12) de células T CD4⁺ activadas en TARV⁻, $p=0.012$, *Figura 31A panel derecho*] pero, a pesar de encontrarse bajo supresión efectiva y prolongada de su CV plasmática, sus valores permanecen elevados comparados a

los hallados en DSs [2.79% (0.51-3.54) de células T CD8⁺ activadas, *Figura 31A panel izquierdo*; 0.80% (0.24-1.40) de células T CD4⁺ activadas, *Figura 31A panel derecho*].

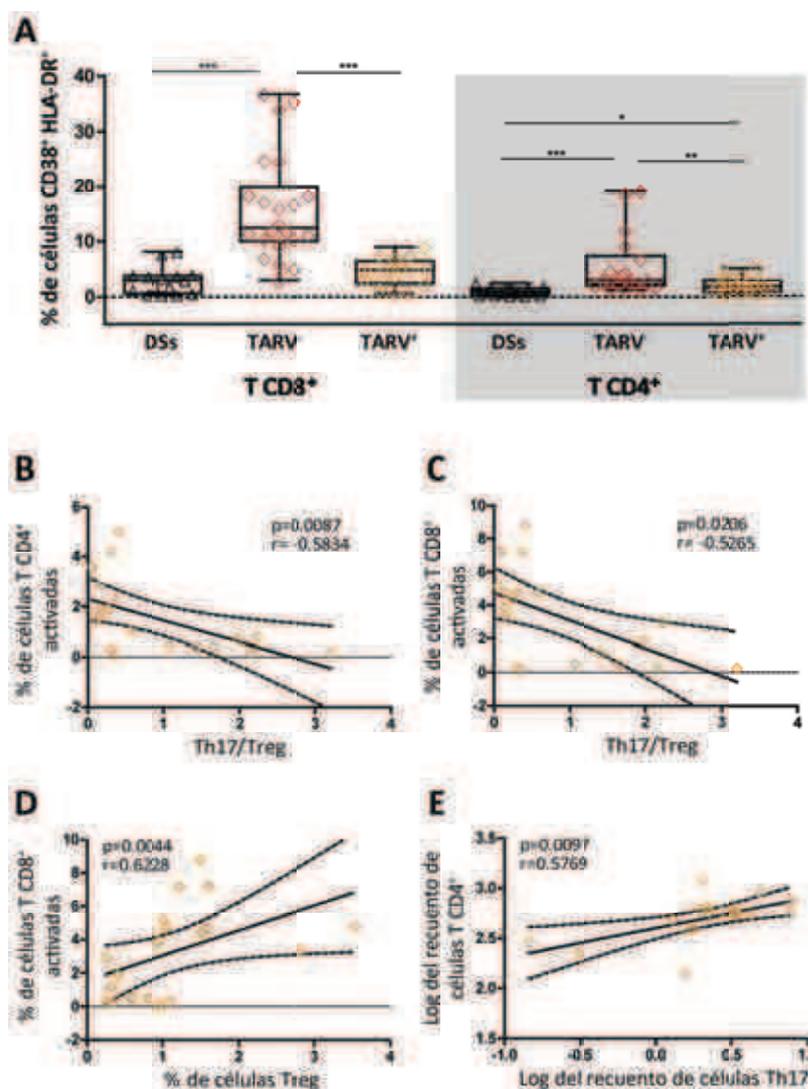


Figura 31: Niveles de activación inmune y correlaciones entre las subpoblaciones Th17 y Treg con parámetros de seguimiento de la infección halladas dentro del grupo de individuos crónicamente infectados bajo tratamiento antirretroviral. La frecuencia de células T CD8⁺ (A, izquierda) y CD4⁺ (A, derecha) activadas (HLA-DR⁺ CD38⁺) fue determinada en todos los grupos de pacientes mediante citometría de flujo utilizando PBMCs. Correlaciones halladas dentro del grupo de pacientes bajo tratamiento: relación Th17/Treg vs. % de células T CD4⁺ (B) y CD8⁺ (C) activadas; % de células Treg vs. % de células T CD8⁺ activadas (D); Log del recuento de células Th17 vs. Log del recuento de células T CD4⁺ (E). Los símbolos distinguen pacientes individuales de los diferentes grupos. TARV⁺: individuos crónicamente infectados por HIV que se encuentran bajo tratamiento antirretroviral. TARV⁻: individuos crónicamente infectados por HIV *naïve* de tratamiento antirretroviral. DSs: dadores sanos, seronegativos para la infección por HIV. La línea dentro de las cajas indica el valor de la mediana, mientras que sus límites delimitan los percentiles 25-75 y las barras indican los valores máximo y mínimo. Se indican los valores de *p* obtenidos: * *p*<0.05 ** *p*<0.01 y *** *p*<0.001 (A). Los valores de *r* y *p* indicados corresponden a correlaciones de *Spearman* (B-E).

Cabe destacar que, dentro del grupo de individuos TARV⁺, mayores niveles de activación de células T CD4⁺ y CD8⁺ se correlacionaron negativamente con la relación

Th17/Treg ($p=0.0087$ $r=-0.5834$, *Figura 31B*; $p=0.0206$ $r=-0.5265$, *Figura 31C*) y positivamente con los niveles de células Treg ($p=0.0044$ $r=0.6228$; *Figura 31D*). Por otro lado, dentro de este mismo grupo de pacientes, mayores niveles de células Th17 se asociaron con mayores recuentos de células T CD4⁺ ($p=0.0097$ $r=0.5769$; *Figura 31E*).

En resumen, en esta sección se observó que el tratamiento antirretroviral con supresión efectiva de la CV plasmática no logra revertir los niveles de activación inmune en relación a lo observado en DSs. Más aún, los resultados sugieren que una mayor eficiencia en la restauración de la subpoblación Th17 y del balance Th17/Treg parece estar correlacionada con menores niveles de activación inmune y la recuperación del recuento de células T CD4⁺.

IV. 2. 4. DURANTE LA INFECCIÓN CRÓNICA CAUSADA POR HIV-1, AÚN BAJO TRATAMIENTO ANTIRRETROVIRAL, SE OBSERVA UNA RESTAURACIÓN INCOMPLETA DE LA INMUNIDAD EN SITIOS DE MUCOSAS, EN CONTRASTE A LO OBSERVADO EN SANGRE PERIFÉRICA

Se ha establecido que las subpoblaciones Th17 y Treg ejercen sus funciones mayormente en sitios de mucosas, siendo el GALT el tejido linfoide más estudiado^{115,116,121}. En este contexto, resulta de interés establecer comparaciones entre la potencial restauración de las subpoblaciones Th17 y Treg circulantes en periferia y aquellas encontradas en sitios relevantes para la transmisión viral como el tracto genital femenino y el GALT. La población celular T CD4⁺ CD161⁺ ha sido identificada como una subpoblación de linfocitos T precursora de la población Th17 que tiene la capacidad de migrar a intestino¹⁵⁹. Algunos estudios han demostrado que no sólo la subpoblación Th17 sino también la población precursora T CD4⁺ CD161⁺ se encuentra disminuida a nivel sistémico en la infección crónica causada por HIV-1¹¹¹. En este contexto, el siguiente objetivo consistió en analizar el efecto del TARV sobre la subpoblación de células T CD4⁺ CD161⁺ precursoras en sangre periférica y sobre las principales citoquinas que ejercen funciones efectoras de las subpoblaciones Th17 y Treg en el tracto genital femenino.

En la *Figura 32A* se muestra que el recuento de células T CD4⁺ CD161⁺ se encuentra severamente disminuido en individuos HIV⁺, independientemente de si se encuentran o no bajo tratamiento, en comparación a lo observado en DSs [125.60 (64.85-175.50) células/ μ l

en DSs vs. 28.60 (19.14-34.04) células/ μ l en TARV⁻ $p=0.001$, y vs. 43.09 (34.14-103.10) células/ μ l en TARV⁺ $p=0.001$; *Figura 32A*], sugiriendo que, aún bajo supresión efectiva de la CV plasmática, la restauración de la subpoblación Th17 con capacidad de migrar a GALT es incompleta.

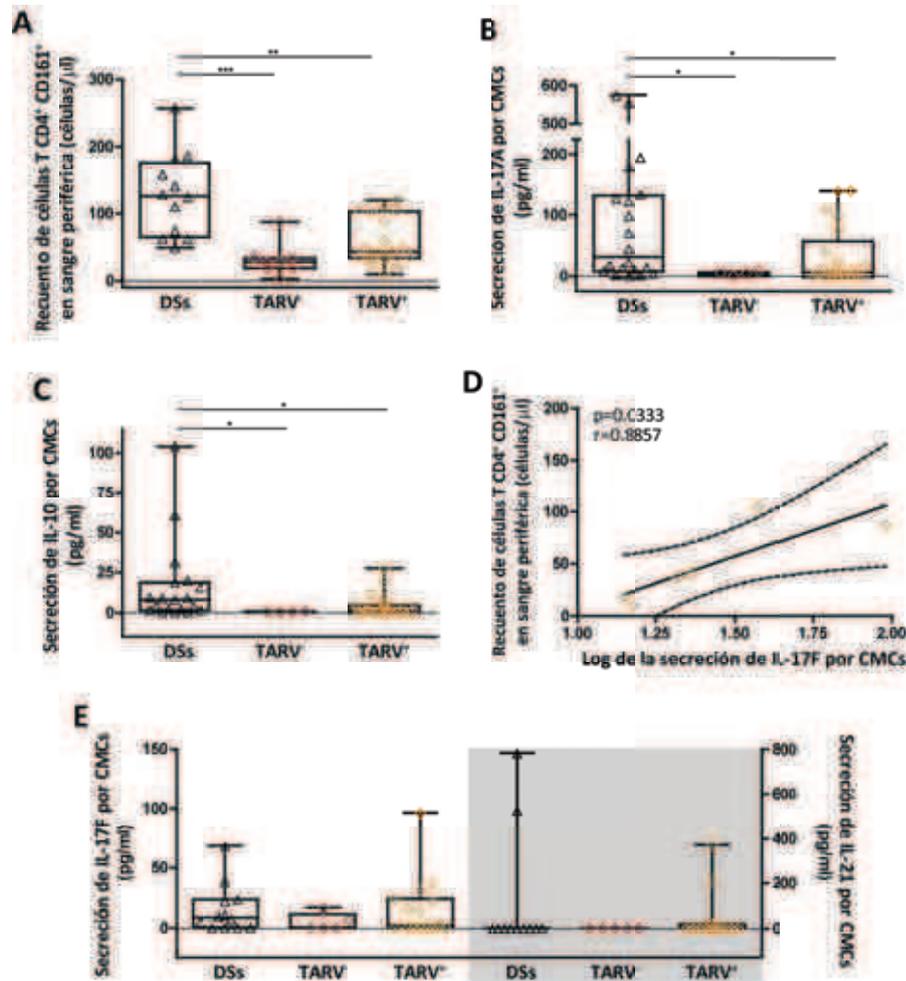


Figura 32: Niveles de la subpoblación T CD4⁺ CD161⁺ en sangre periférica y producción de las citoquinas IL-17A, IL-17F, IL-21 e IL-10 tras la estimulación de células mononucleares de cérvix (CMCs). La frecuencia de células T CD4⁺ CD161⁺ fue determinada en PBMCs estimuladas durante 6 horas con anti-CD3 y anti-CD28 por citometría de flujo (A). Cuantificación de la concentración de IL-17A (B), IL-10 (C), IL-17F e IL-21 (E) en sobrenadantes de CMCs estimuladas durante 8 horas con PMA/Ionomicina. Correlación positiva hallada dentro del grupo de individuos TARV⁺ entre: Log de la concentración de IL-17F en sobrenadante de CMCs estimuladas vs. recuento de células T CD4⁺ CD161⁺ en sangre periférica (D). Los símbolos distinguen pacientes individuales de los diferentes grupos. TARV⁻: individuos crónicamente infectados por HIV que se encuentran bajo tratamiento antirretroviral. TARV⁺: individuos crónicamente infectados por HIV *naïve* de tratamiento antirretroviral. DSs: donadores sanos, seronegativos para la infección por HIV. La línea dentro de las cajas indica el valor de la mediana, mientras que sus límites delimitan los percentiles 25-75 y las barras indican los valores máximo y mínimo. Se indican los valores de p obtenidos: * $p<0.05$ ** $p<0.01$ y *** $p<0.001$ (A-C y E). Los valores de r y p indicados corresponden a una correlación de Spearman (C).

Quizás uno de los aportes más novedosos de este trabajo de tesis consistió en analizar la dinámica de estas subpoblaciones y su funcionalidad en el tracto genital femenino. Para

ello se obtuvieron células mononucleares de cérvix (CMCs) mediante la utilización de citocepillos endocervicales de algunas de las pacientes. Esta técnica no invasiva de toma de muestra presenta una limitación en la cantidad de células obtenidas, dificultando su utilización en ensayos de citometría de flujo (*sección V.3 de la Discusión*). Por este motivo se decidió estudiar la funcionalidad de las células obtenidas mediante su estimulación durante 8 horas en presencia de una mezcla de los mitógenos PMA/Ionomicina para la posterior detección de las citoquinas IL-17A, IL-17F, IL-21 e IL-10 en el sobrenadante de los cultivos. Las mismas constituyen los mediadores más importantes secretados por las subpoblaciones Th17 y Treg. Los detalles metodológicos pueden consultarse en la *sección III.7.3 de Materiales y Métodos*.

Se pudo observar que, a pesar de encontrarse bajo supresión efectiva de la CV plasmática, las CMCs provenientes de los individuos del grupo TARV⁺ no logran los niveles de secreción de IL-17A e IL-10 observados en DSs [32.88 pg/ml (9.09-131.80) de IL-17A en DSs vs. 7.83 pg/ml (0.55-57.83) de IL-17A en TARV⁺ $p=0.031$, *Figura 32B*; 8.10 pg/ml (1.47-18.75) de IL-10 en DSs vs. 1.27 pg/ml (0.04-4.51) de IL-10 en TARV⁺ $p=0.013$, *Figura 32C*]. Cabe destacar que, aunque también se observaron diferencias entre DSs y pacientes TARV⁻ para ambas citoquinas [4.60 pg/ml (1.56-7.92) de IL-17A en TARV⁻ vs. DSs $p=0.048$, *Figura 32B*; 0.62 pg/ml (0.31-0.90) de IL-10 en TARV⁻ vs. DSs $p=0.038$, *Figura 32C*], estas diferencias deben ser interpretadas con cautela debido al bajo número de muestras endocervicales de las cuales fue posible obtener CMCs en este grupo de pacientes hasta el momento (su reclutamiento continúa actualmente). Resulta interesante destacar que, en aquellas pacientes del grupo TARV⁺ para las cuales se encontraron niveles detectables de producción de IL-17F por CMCs estimuladas, esto se correlacionó positivamente con mayores recuentos de células T CD4⁺ CD161⁺ en sangre periférica ($p=0.0333$ $r=0.8857$; *Figura 32D*), aunque por el momento la cantidad de datos disponibles es limitada ($n=6$). Por último, no se detectaron diferencias entre los diferentes grupos de pacientes en cuanto a los niveles de secreción de IL-17F e IL-21 por parte de CMCs estimuladas (*Figura 32E*).

Estos resultados sugieren que, en individuos crónicamente infectados por HIV bajo TARV, la restauración inmune en sitios de mucosas es mucho menos eficiente que la observada en muestras de sangre periférica.

IV. 2. 5. EN INDIVIDUOS CRÓNICAMENTE INFECTADOS BAJO TRATAMIENTO ANTIRRETROVIRAL, MAYORES NIVELES DE CITOQUINAS PROINFLAMATORIAS DETECTADAS EN EXOCERVIX SE CORRELACIONAN CON UNA MAYOR ACTIVACIÓN INMUNE Y UNA MENOR FUNCIONALIDAD DE CÉLULAS TH17 EN SANGRE PERIFÉRICA

Por último, se estudiaron los niveles de mediadores solubles de inflamación en mucosa cervical y su relación con los niveles de activación inmune y las subpoblaciones Th17 y Treg en sangre periférica. Para ello se determinaron simultáneamente las concentraciones de cinco citoquinas proinflamatorias [IL-12 (subunidad p70), IL-1 β , IL-8, IL-6 y TNF] y un mediador anti-inflamatorio (IL-10) en sobrenadantes de hisopados de exocervix, utilizando la tecnología CBA. Debido a que la cantidad de material proveniente de los hisopados puede variar de muestra en muestra, para algunos análisis se optó por relativizar la concentración de cada una de las citoquinas determinadas en función de la concentración de proteínas totales cuantificadas en los mismos sobrenadantes de hisopados de exocervix (ver detalles en la sección III.7.4.2 de Materiales y Métodos).

Como puede observarse en la *Figura 33*, mayores niveles de la citoquina proinflamatoria IL-1 β en exocervix se correlacionaron positivamente con las proporciones de células T CD4⁺ y CD8⁺ activadas en muestras de sangre periférica de individuos TARV⁺ [pg de IL-1 β / μ g de proteínas vs. % de células T CD4⁺ activadas $p=0.0256$ $r=0.5241$, *Figura 33A*; pg de IL-1 β / μ g de proteínas vs. % de células T CD8⁺ activadas $p=0.0238$ $r=0.5297$, *Figura 33B*]. Cabe destacar que IL-1 β ha sido relacionada con un mayor estado inflamatorio en la mucosa genital y un predictor de riesgo de infección por HIV^{160,161}. Al analizar las potenciales asociaciones entre los niveles inflamatorios detectados en mucosa genital y los niveles y funcionalidad de la subpoblación Th17 de sangre periférica, se pudo observar que niveles altos de la citoquina proinflamatoria IL-1 β en exocervix mostraron una tendencia a correlacionarse negativamente con los recuentos de células Th17 de sangre periférica en

todos los pacientes HIV⁺, indistintamente de si se encontraban o no bajo TARV ($p=0.0712$ $r=-0.3920$; *Figura 33C*). Resulta interesante destacar que, dentro del grupo de individuos TARV⁺, mayores niveles de la citoquina proinflamatoria IL-12 en exocervix, se correlacionaron negativamente con la IMFr de IL-17 en células Th17 periféricas ($p=0.0368$ $r=-0.7665$; *Figura 33D*).

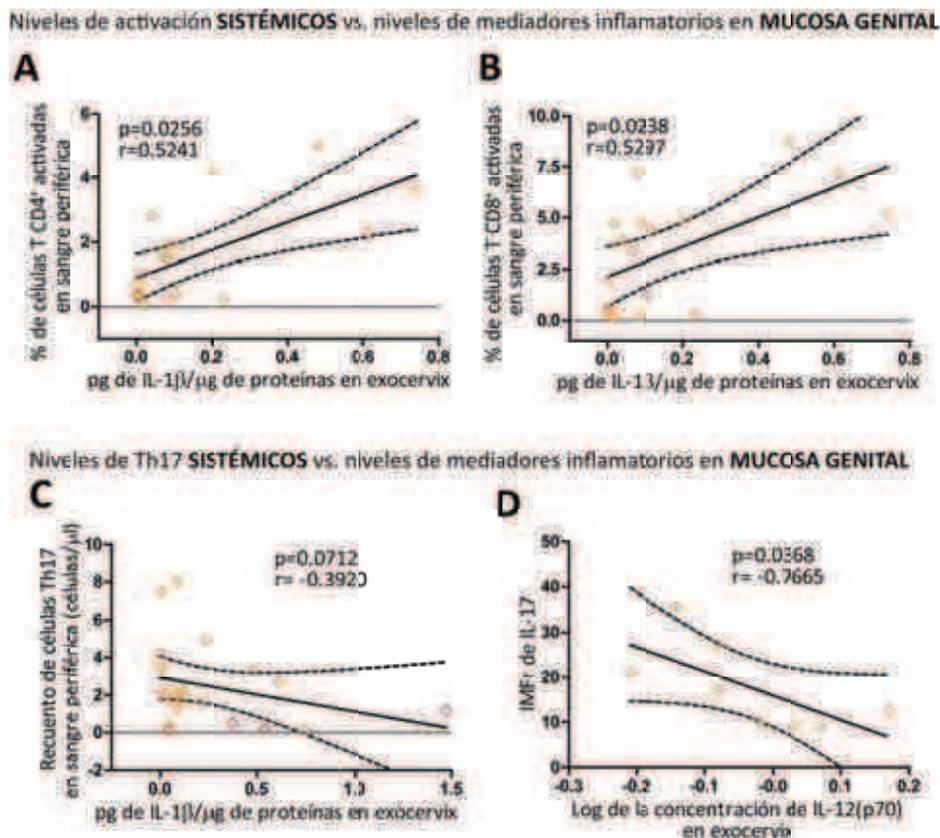


Figura 33: Correlaciones entre los niveles de citoquinas proinflamatorias en exocervix y los niveles de activación inmune y la subpoblación de células Th17 evaluadas en sangre periférica. Correlaciones positivas halladas entre pg de IL-1 β / μ g de proteínas en sobrenadante de hisopados de exocervix vs. % de células T CD4⁺ (A) y CD8⁺ (B) activadas en individuos TARV⁺. Correlaciones negativas halladas entre: pg de IL-1 β / μ g de proteínas en sobrenadante de hisopados de exocervix vs. recuento de células Th17 en sangre periférica en todos los individuos HIV⁺ (C) y Log de la concentración de IL-12(p70) en sobrenadante de hisopados de exocervix vs. intensidad media de fluorescencia relativa (IMFr) de IL-17 en células Th17 periféricas en individuos TARV⁺ (D). Cada símbolo representa pacientes individuales: individuos crónicos *naïve* de tratamiento antirretroviral (\diamond , TARV) y bajo tratamiento (\circ , TARV⁺). Todos los valores de r y p indicados corresponden a correlaciones de *Spearman*.

Estos resultados sugieren que, durante la infección por HIV-1, aún en aquellas pacientes que se encuentran bajo TARV con supresión efectiva de la CV plasmática, los niveles de mediadores solubles de inflamación en mucosa cervical se correlacionan positivamente con mayores niveles de activación inmune en periferia y con menores recuentos y funcionalidad de la subpoblación de células Th17.

V. DISCUSIÓN

V. 1. PARTE I

En la Parte I de este trabajo de tesis se analizaron los niveles de las subpoblaciones Th17, Treg y su balance en cohortes de individuos que poseen distintos niveles de protección natural y se encuentran en diferentes estadios de la infección por HIV-1. Posteriormente se estableció su relación con la funcionalidad de la respuesta celular T antiviral y con los niveles de activación inmune, particularmente en el contexto de la infección aguda/temprana por HIV-1 (PHI) y el curso del primer año de infección.

V. 1. 1. SUBPOBLACIONES DE CÉLULAS TH17, TREG Y BALANCE TH17/ TREG Y SU RELACIÓN CON LOS NIVELES DE ACTIVACIÓN CELULAR

Notablemente se observó que, en comparación a DSs, la relación Th17/Treg se encontraba significativamente reducida en todos los grupos de individuos infectados por HIV-1, y dentro de la cohorte de PHI se halló una rápida reducción de la relación Th17/Treg desde tiempos muy tempranos p.i (en muestras basales; *Figura 19C*). Este hallazgo resulta de gran importancia al ser interpretado en el contexto de un estudio previo llevado a cabo en el modelo de SIV¹¹². En ese trabajo se demostró que la infección patogénica aguda causada por SIV en macacos se caracteriza por una depleción rápida y selectiva de células Th17 y por una disminución de la relación Th17/Treg en sangre y múltiples tejidos, indicando que un desbalance temprano se relaciona con la progresión de la enfermedad en la infección por SIV. El presente trabajo de tesis muestra que la relación Th17/Treg se encuentra significativamente reducida incluso en individuos ECs, y que esta reducción en la relación Th17/Treg coincide con mayores frecuencias de células T CD8⁺ activadas en este grupo (en comparación a los niveles normales hallados en DSs; *Figura 20D*). En contraste a lo reportado por algunos trabajos recientes que muestran evidencias de una activación de la inmunidad innata y de células T en individuos ECs¹⁶²⁻¹⁶⁴, sólo existe un reporte que compara la relación Th17/Treg entre ECs y DSs, el cual muestra una tendencia a una menor relación Th17/Treg en ECs¹¹⁸. En este contexto, los resultados de la presente tesis sugieren que la potencial asociación entre el desbalance en la relación Th17/Treg y los niveles de activación

inmune que en algunos casos se encuentran presentes en individuos ECs es un aspecto que amerita futuros análisis en mayor profundidad.

Dentro de la cohorte PHI, se encontró una tendencia a una reducción en los niveles de Th17 entre las muestras basales y al año p.i, a pesar de ello no se alcanzó la significancia estadística, en concordancia con estudios previos^{153,165}. Sin embargo, a nivel basal se observó una clara diferencia entre progresores rápidos y típicos en relación a sus niveles de activación T CD8⁺ y los recuentos de células Th17 (*Figura 20*). Lo observado en los progresores rápidos concuerda con observaciones previas durante la infección avanzada por HIV^{111,166} y, más importante aún, con los factores asociados con una sintomatología severa durante la infección aguda previamente descrita en los pacientes del Grupo Argentino de Seroconversión¹⁴³ y también en otras cohortes de pacientes infectados con HIV¹⁶⁷.

V. 1. 2. **SUBPOBLACIONES DE CÉLULAS TH17, TREG Y BALANCE TH17/ TREG Y SU RELACIÓN CON LA CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA DE CITOQUINAS/ QUIMIOQUINAS Y CON PARÁMETROS DE SEGUIMIENTO DE LA INFECCIÓN Y PROGRESIÓN A ENFERMEDAD**

A tiempos tempranos p.i, la preservación de la subpoblación de células Th17 (evaluada de diferentes formas como los niveles de IL-17 en plasma, el porcentaje de células Th17 y la IMFr de IL-17) se correlacionó con menores niveles de células T CD4⁺ activadas y, por otro lado, tanto con mayores recuentos de células T CD4⁺ como niveles plasmáticos de MDC (*Figura 21*). Ha sido previamente reportado que esta β -quimioquina posee actividades protectoras en modelos de infección de PBMCs *in vitro*¹⁵⁴. Luego, a tiempos tardíos p.i, mayores niveles de células Th17 mantuvieron sus correlaciones positivas con los recuentos de células T CD4⁺ y se correlacionaron inversamente con los niveles basales de mediador inflamatorio sCD40L (*Figura 22*), un biomarcador asociado con progresión a la enfermedad¹⁵⁵. Estos resultados indican que existe una clara relación entre un mejor estatus clínico con mayores niveles de Th17 y a su vez con menores niveles de Treg.

A la luz de los reportes que demuestran que la subpoblación Treg posee la capacidad de suprimir respuestas T, se podrían esperar correlaciones negativas con los niveles de activación inmune. Sin embargo, el presente estudio reveló la existencia de correlaciones

directas con los niveles de activación de células T CD8⁺ y con la CV, y una relación inversa con los recuentos de células T CD4⁺ (*Figuras 21F, 22C y 23B y C*). Estos resultados se encuentran en concordancia con lo descrito en otros estudios recientes que muestran la existencia de correlaciones directas entre los niveles de células Treg y activación de células T¹¹⁸ o progresión a la enfermedad¹⁶⁵, y asociaciones negativas con la frecuencia de células T CD4⁺¹¹⁸. Estos resultados pueden ser interpretados desde al menos dos perspectivas: por un lado, pueden ser considerados evidencias a favor de la hipótesis que postula que la subpoblación Treg jugaría un rol detrimental durante la infección por HIV¹⁶⁸ o, por otro lado, podrían sugerir que la infección por HIV da lugar a una expansión de células Treg no funcionales.

V. 1. 3. **EVALUACIÓN DE LAS RESPUESTAS T CD8⁺ ANTIVIRALES PREVIAMENTE ASOCIADAS CON CONTROL VIRAL: ESTUDIO DE SU RELACIÓN CON LA SUBPOBLACIÓN DE CÉLULAS Th17 Y EL BALANCE Th17/ TREG DURANTE LA SEROCONVERSIÓN Y EL PRIMER AÑO DE INFECCIÓN**

Una de las mayores contribuciones aportada por la presente tesis está dada por el análisis del potencial impacto que podrían tener las alteraciones observadas en las proporciones y la relación entre las subpoblaciones Th17 y Treg en la respuesta T CD8⁺ específica frente a HIV-1 con una relevancia documentada en la inmunidad antiviral durante la infección aguda/temprana. Los resultados revelan la existencia de correlaciones directas entre los niveles basales de células Th17 y la capacidad de ejercer VIA y también con otras funciones clave (IFN- γ ⁺/CD107_{A/B}⁺) de las células T CD8⁺ HIV-específicas tanto a tiempos tempranos como tardíos p.i (*Figuras 24 y 25*), resaltando el potencial valor pronóstico de esta subpoblación en la preservación de una inmunidad efectiva frente a HIV. Es importante destacar que, al año p.i, aún se detectaron correlaciones positivas entre la funcionalidad de las células Th17 (IMFr de IL-17) y la relación Th17/Treg con la capacidad de las células T CD8⁺ de ejercer VIA (*Figura 27*).

En concordancia con estos hallazgos, algunos trabajos previos ya habían sugerido la potencial influencia que la subpoblación Th17 podía tener sobre la funcionalidad de la respuesta T específica frente a SIV/HIV. Uno de estos estudios analizó la restauración de

células T CD4⁺ en GALT en pacientes infectados por HIV, demostrando que una restauración efectiva se asociaba con una mayor proporción de células Th17 y respuestas T específicas para HIV de mayor polifuncionalidad¹²¹. Otro estudio realizado en el modelo de SIV, no solo demostró que la replicación del virus se encuentra limitada por el tamaño del compartimiento Th17 pre-existente a la infección y que la reducción de la relación Th17/Treg se asociaba con mayores CVs, sino que además mostraron que estas variables podían interactuar y dar forma a las respuestas celulares contra el virus¹²⁰. En consecuencia, aquellos animales con mayores niveles de células Th17 fueron los que mostraron mayor respuesta específica frente a SIV tanto T CD4⁺ como CD8⁺, y más importante aún, la respuesta T CD4⁺ evaluada en animales con mayor relación Th17/Treg resultaron ser más funcionales.

Con la finalidad de ahondar en la posible relación entre los niveles de Th17 y potenciales funciones T efectoras, se decidió analizar los perfiles de células Th1, Tc1 y Tc17. Los resultados sugieren que, la preservación del compartimiento Th17 se ve acompañada por mayores niveles de otros perfiles de células T efectoras que poseen la potencial capacidad de confrontar infecciones por otros agentes patógenos (*Figura 28*).

V. 1. 4. POTENCIALES CAUSAS DE LAS RELACIONES OBSERVADAS ENTRE LOS NIVELES DE CÉLULAS TH17 Y LA FUNCIONALIDAD DE LA RESPUESTA T CD8⁺ ANTIVIRAL PROTECTIVA

La preservación/deterioro de la subpoblación de células Th17 y de la relación Th17/Treg observadas en la primer parte del presente trabajo de tesis podrían tener distintas consecuencias de importantes implicancias en la funcionalidad de la respuesta T CD8⁺ específica frente a HIV-1. Una de ellas es la pérdida de células T CD4⁺ la cual se encontró positiva y negativamente correlacionada con las frecuencias de células Treg y Th17, respectivamente. El declive progresivo de los recuentos de células T CD4⁺ en la infección por HIV, así como en otras infecciones virales, ha sido asociado con la disfuncionalidad de células T CD8⁺ justificado por la disminución de la “ayuda” T CD4⁺ necesaria para la segunda expansión de las células T CD8⁺ específicas^{169,170}. Además, los altos valores de CV podrían tener un fuerte impacto en la disfuncionalidad celular, como ha sido sugerido¹⁷⁰⁻¹⁷²,

así como la presencia de células T CD8⁺ específicas frente al virus con un fenotipo de activación que carecen de sus funciones efectoras debido al agotamiento celular, un mecanismo previamente descrito de evasión viral de la respuesta inmune¹⁷³. En relación a estos dos últimos factores, en la presente tesis se muestra que, mientras que los niveles de células Th17 se correlacionaron inversamente con la CV, el porcentaje de células Treg se correlacionó positivamente con la replicación viral, en concordancia con su relación directa con mayores frecuencias de células T CD8⁺ activadas. Por otro lado, mayores proporciones de células T CD8⁺ HIV-específicas con un fenotipo de agotamiento (positivas para el marcador PD-1) detectadas a tiempos tardíos p.i se correlacionaron inversamente con los niveles basales de células Th17.

Otra posible hipótesis que podría explicar la correlación directa observada entre los niveles de células Th17 y la funcionalidad de la respuesta T CD8⁺ HIV-específica, es la acción ejercida por IL-21, que es una citoquina pleiotrópica secretada en altos niveles por las células Th17 y otras células T CD4⁺ activadas¹⁷⁴. Esta citoquina ejerce múltiples funciones, como el mantenimiento a largo plazo tanto de poblaciones T CD8⁺ antivirales^{169,175-177} como de una subpoblación de células Th17 plenamente funcionales^{178,179}. Así, en un estudio publicado recientemente, la administración de IL-21 a macacos infectados con SIV fue acompañada por una mayor expresión de perforina y granzima B en células T CD8⁺ totales y específicas contra SIV (mayor funcionalidad) y mayores niveles de Th17 en intestino¹⁸⁰. Las relaciones positivas entre la respuesta T CD8⁺ HIV-específica y los niveles y funcionalidad de la subpoblación Th17 (IMFr de IL-17) observadas en este trabajo de tesis, podrían ser explicadas infiriendo que mayores niveles de Th17 podrían traducirse en niveles de producción de IL-21 más altos.

V. 2. PARTE II

En la Parte II de este trabajo de tesis se evaluó el impacto del TARV en el restablecimiento y funcionalidad de células Th17, Treg y la relación Th17/Treg en sangre periférica y en mucosa del tracto genital femenino. Asimismo, se analizó la relación de estos

parámetros con los niveles de inflamación en tracto genital y de activación inmune en periferia.

V. 2. 1. EFECTO DEL TRATAMIENTO ANTIRRETROVIRAL SOBRE LAS SUBPOBLACIONES DE CÉLULAS TH17, TREG Y EL BALANCE TH17/ TREG Y SU RELACIÓN CON LOS NIVELES DE ACTIVACIÓN CELULAR EN SANGRE PERIFÉRICA

Diferentes trabajos han reportado que, luego del TARV, el número y funcionalidad de las células Th17 así como la relación Th17/Treg no se recuperan, o lo hacen solo parcialmente, en sitios de mucosas (fundamentalmente en GALT), donde estas subpoblaciones ejercen sus funciones efectoras^{121,158}. Por otro lado, los resultados de la primera parte de este trabajo de tesis demuestran que, en ausencia de TARV, los niveles de las subpoblaciones Th17 y Treg se correlacionan diferencialmente con distintos parámetros de seguimiento de la infección. Por ello, uno de los primeros objetivos de la segunda parte de esta tesis, consistió en analizar el impacto del TARV sobre los niveles de activación inmune en muestras de sangre periférica en los distintos grupos de pacientes y analizar su relación con los niveles de células Th17, Treg y su balance. Cabe destacar que todas las pacientes del grupo TARV⁺ incluidas en el estudio iniciaron el tratamiento tardíamente respecto al momento de la primoinfección y, a su vez, se encontraban bajo distintos esquemas de TARV por períodos prolongados, con una mediana de 7 años y un mínimo de 2 años.

Tras el tratamiento, los valores tanto de la proporción y funcionalidad (IMFr de IL-17) de células Th17 como de la relación Th17/Treg resultaron similares a los hallados en la población de DSs, siendo ambos parámetros significativamente mayores respecto a lo observado en el grupo TARV⁻ (*Figura 30A, B y C*). Estos resultados coinciden parcialmente con lo descrito en un trabajo recientemente publicado, realizado con pacientes de China¹⁸¹. En ese trabajo los autores encuentran que, tras un tiempo medio de tratamiento de 3 años, la proporción de células Th17 en perifera se restablece. Sin embargo, en dicho trabajo la relación Th17/Treg en el grupo de individuos TARV⁻ no presentó diferencias significativas en relación a DSs y TARV⁺. En el mismo estudio los autores observan que el porcentaje de células Treg en el grupo TARV⁻ está significativamente elevado en relación a lo hallado en DSs, y tras el TARV los valores

disminuyen a los niveles normales observados en dadores HIV⁻. Esto último se contrapone a lo reportado en este trabajo de tesis donde, tras el TARV, los pacientes seguían presentando altas proporciones de células Treg en relación a lo observado en DSs (*Figura 30D*). En otro trabajo en el que realizan un estudio longitudinal analizando los cambios producidos en la dinámica de estas subpoblaciones celulares después del inicio de la terapia¹²³, y en coincidencia con nuestros resultados, observan que tras 12 meses de TARV se restaura la relación Th17/Treg, mientras que el porcentaje de células Th17 se incrementa respecto a los valores detectados previo al inicio de TARV pero sin alcanzar los valores de DSs. Por su parte, la proporción de células Treg se encontraba incrementada antes del inicio del TARV y a los 12 meses post-TARV disminuía en forma significativa pero sin alcanzar los valores normales presentes en DSs, hallazgo similar al presentado en esta tesis. Los trabajos mencionados, en conjunto con los resultados de esta tesis, demuestran que existe un efecto positivo de diferentes esquemas de TARV sobre la restauración de la subpoblación Th17 y de la relación Th17/Treg en sangre periférica^{121,123}, reforzando el concepto general de que el TARV contribuiría a la restauración de la homeostasis inmune a nivel sistémico.

Por otro lado, el tratamiento no logró restaurar los niveles de activación de células T CD4⁺ a los observados en DSs. A su vez, se destacan las correlaciones halladas entre mayores niveles de activación, tanto de células T CD4⁺ como CD8⁺, con una menor relación Th17/Treg y con mayores niveles de células Treg (*Figura 31*). La activación inmune sistémica persistente constituye una característica de la infección crónica por HIV-1, siendo un predictor independiente de progresión a enfermedad. Estudios previos ya habían reportado la correlación indirecta entre los niveles de células Th17 y la relación Th17/Treg en periferia con el grado de activación celular en pacientes HIV⁺ *naïve* de tratamiento¹⁸². Recientemente, *Schuetz* y colaboradores¹⁸³ han descripto que durante la infección aguda por HIV-1 ocurre una rápida depleción de células Th17 a nivel de intestino acompañada de un incremento en la activación inmune local y sistémica. Al analizar el impacto del inicio temprano del tratamiento sobre estos eventos, observan que solamente el inicio del TARV en los pacientes de infección aguda que se encuentran en los estadios de Fiebig I/II (entre 7

y 20 días p.i) logra, tras 6 meses, reducir los niveles de activación celular en intestino y periferia a valores similares a los hallados en DSs. Sin embargo, si el TARV es iniciado cuando los pacientes se encuentran ya cursando el estadio de Fiebig III (entre 20 y 25 días p.i), si bien los niveles de activación celular disminuyen respecto a los valores basales pre-TARV, estos no alcanzan los valores normales presentes en DSs. Por otro lado observan que, si bien el inicio de TARV en el estadio de Fiebig III restaura las proporciones de Th17 en intestino, su funcionalidad no se recompone, lo que se podría correlacionar con los altos niveles de activación inmune aún presentes en esos pacientes. Este último resultado se encuentra en concordancia con lo hallado en este trabajo de tesis en relación a los valores de activación celular observados en las pacientes TARV⁺ (con inicio tardío de tratamiento) y también con las correlaciones indirectas halladas con los niveles de células Th17 y la relación Th17/Treg.

V. 2. 2. EFECTO DEL TRATAMIENTO ANTIRRETROVIRAL SOBRE LA RECONSTITUCIÓN INMUNE EN SITIOS DE MUCOSAS

La población celular T CD4⁺ CD161⁺ ha sido identificada como una subpoblación de linfocitos T precursora de la población Th17 que tiene la capacidad de migrar a intestino y que, junto a las células Th17, se encuentra disminuida a nivel sistémico en individuos crónicamente infectados por HIV^{111,159}. En este contexto, consideramos relevante analizar el efecto del TARV sobre esta subpoblación precursora en sangre periférica. Los resultados mostraron que los números absolutos de células T CD4⁺ CD161⁺ se encontraban significativamente disminuidos, en relación a los valores hallados en DSs, en individuos HIV⁺ independientemente de si se encontraban o no bajo TARV (*Figura 32A*). Esto indicaría que el tratamiento prolongado (mediana de 7 años) no logra restaurar la subpoblación de células T CD4⁺ CD161⁺ precursora de Th17 con capacidad de migrar a la mucosa intestinal. En concordancia con estos hallazgos, un trabajo recientemente publicado describe que, en los pacientes HIV⁺, existe un desbalance en las poblaciones de células T CD4⁺ que migran a intestino [definidas en ese trabajo como células T CD4⁺ de memoria (RO⁺) que expresan $\alpha 4\beta 7$ integrina]¹⁸¹. Concretamente observan que, a nivel sistémico, los individuos bajo TARV

experimentan incrementos en la frecuencia y en los números absolutos de células T CD4⁺ totales, pero cuando analizan tanto los recuentos absolutos de células T CD4⁺ α4β7⁺ RO⁺ como de Th17 α4β7⁺ RO⁺, no observan diferencias con el grupo de individuos TARV⁻, hallazgos similares a los presentados en esta tesis. Tanto las células precursoras de células Th17 (T CD4⁺ CD161⁺) descritas en esta tesis como los linfocitos Th17 de memoria con un fenotipo de migración a intestino¹⁸¹ serían las principales subpoblaciones involucradas en la restauración deficiente de linfocitos T CD4⁺ en intestino y ganglios linfáticos¹⁸⁴ aún post-TARV^{122,185}. Por otro lado *Macal* y colaboradores¹²¹ ya habían descrito que, en pacientes TARV⁺, la magnitud de la restauración de células T CD4⁺ en GALT (en los casos en los que esta ocurre) se encuentra asociada con el grado de funcionalidad de estas células y su capacidad de ejercer respuestas HIV-específicas. Considerando estos datos previos y los resultados de la primera y segunda parte de la presente tesis, será importante evaluar, en el futuro, el potencial impacto del inicio temprano del TARV en la restauración de las células Th17 y de la relación Th17/Treg y su influencia sobre los niveles de activación celular y el restablecimiento y calidad de las respuestas T CD8⁺ antivirales protectoras.

Uno de los aportes más novedosos de este trabajo de tesis consistió en analizar la funcionalidad de las células Th17 y Treg en el tracto genital femenino. Ya se ha mencionado que está bien establecida la cinética de la pérdida de linfocitos T CD4⁺ en GALT tras la infección con SIV y HIV, mientras que lo que ocurre en otros sitios de mucosas ha sido menos estudiado. En un trabajo recientemente publicado se analizó por primera vez el impacto de la infección aguda/temprana por HIV-1 sobre las poblaciones de linfocitos T CD4⁺ en cérvix¹⁸⁶. Los resultados sugieren que la infección por HIV tiene un profundo impacto en la frecuencia y balance de las poblaciones de células T CD4⁺ de la mucosa cervical desde tiempos tempranos p.i y, aunque el número de muestras analizadas es bajo (n=6), detectan que la frecuencia de células Th17 en cérvix (definidas como CCR6⁺ CCR10⁻ CD4⁺) es de 10 a 15 veces menor en relación a lo observado en DSs. Sin embargo, es importante destacar que aún no ha sido analizada la potencial restauración de las subpoblaciones de células Th17 y Treg en mucosa cervical tras la aplicación de TARV.

Los resultados presentados en esta tesis demuestran que, tras una estimulación policlonal, las CMCs provenientes de pacientes HIV⁺ bajo TARV evidencian menores niveles de secreción de IL-17A (Th17) e IL-10 (Treg) en relación a lo observado en DSs (*Figura 32B y C*). Este hallazgo sugiere que existen menores niveles de las células productoras de estas citoquinas y/o una menor funcionalidad de las mismas en las pacientes de este grupo. Es interesante destacar que, en las pacientes del grupo TARV⁺ cuyos niveles de secreción de la citoquina IL-17F por parte de CMCs resultó detectable, se halló una correlación positiva entre este parámetro y la cantidad de células T CD4⁺ CD161⁺ en periferia (*Figura 32D*). Estos resultados sugieren que existe un paralelismo en la restauración de células Th17 en ambos sitios de mucosas, dado que una mayor funcionalidad de las células Th17 en tracto genital se correlaciona con mayores niveles de la subpoblación precursora de células Th17 que migrarán a intestino. Cabe aclarar que este último constituye un resultado preliminar (n=6) y que se continuarán realizando estas determinaciones en un mayor número de muestras. La importancia de la preservación/restauración de la funcionalidad de las células Th17 en el contexto de la infección por HIV-1 ha sido previamente analizada en GALT. Ha sido demostrado que la funcionalidad de las células Th17 de la mucosa intestinal se encuentra alterada y que esta disfuncionalidad constituye un predictor independiente de la activación inmune¹⁵⁸. A su vez, otro estudio indicó que el rol de la coproducción de citoquinas específicas por parte de estas células resulta crítico para que puedan ejercer su acción defensiva en las mucosas¹⁸⁷. Sin embargo, los resultados de la presente tesis constituyen los primeros en evaluar la funcionalidad de las subpoblaciones de células Th17 y Treg en mucosa genital durante la infección crónica causada por HIV-1 en el contexto de la implementación del TARV.

V. 2. 3. RELACIÓN ENTRE LOS NIVELES DE INFLAMACIÓN EN EXOCERVIX Y LA ACTIVACIÓN CELULAR SISTÉMICA EN PACIENTES BAJO TRATAMIENTO ANTIRRETROVIRAL

Existen pocos estudios en los que se hayan realizado determinaciones de mediadores solubles de inflamación en la mucosa del tracto genital femenino en mujeres HIV⁺ tras la aplicación del TARV y, además, el análisis de las correlaciones entre los marcadores de

respuesta inflamatoria en periferia en relación a lo detectado en mucosa genital en estas pacientes es escasa. Los resultados de la presente tesis muestran que, en mujeres bajo TARV, mayores niveles de la citoquina proinflamatoria IL-1 β en exocervix se correlacionan positivamente con las proporciones de células T CD4 $^{+}$ y CD8 $^{+}$ activadas en muestras de sangre periférica (*Figura 33A y B*). Estos resultados indicarían que la detección de mayores niveles sistémicos de células T con un fenotipo de activación aumentaría la probabilidad de encontrar mayores niveles de activación en tracto genital femenino, lo cual podría tener como consecuencia un aumento en la susceptibilidad de adquisición de co-infecciones y/o de la liberación de virus a nivel del tracto genital¹⁸⁸. Asimismo, otros trabajos demostraron que, en mujeres HIV $^{+}$ en las que se evidenciaba liberación de virus en mucosa genital, poseían mayores niveles de IL-1 β , IL-6 e IL-8¹⁸⁹. La citoquina IL-1 β ha sido identificada como un mediador proinflamatorio primario secretado en inflamasomas en respuesta a infecciones bacterianas y virales¹⁹⁰ y ha sido reportado que, aunque el TARV disminuye la CV en plasma y mucosa genital, no altera los niveles de IL-6 e IL-1 β de mucosa genital en individuos de Sudáfrica¹⁹¹. En varios de los trabajos que analizan estos parámetros, al igual que en el presente trabajo de tesis, no pudo ser evaluada la presencia de otras infecciones genitales en los pacientes estudiados, por lo que los autores sugieren que la secreción de IL-1 β podría estar más fuertemente relacionada con infecciones genitales o inflamación asociada a eventos no infecciosos¹⁹¹.

Finalmente, en la presente tesis se muestran, por primera vez, correlaciones entre mayores niveles de citoquinas proinflamatorias en mucosa genital (IL-1 β e IL-12) con menores recuentos (*Figura 33C*) y menor funcionalidad (*Figura 33D*) de células Th17 periféricas, respectivamente. Hallazgos recientes indican que el inicio temprano del TARV es fundamental para preservar la funcionalidad de la subpoblación de células Th17 (evaluada como la capacidad de secreción de IL-17, IL-22 e IFN- γ) y que la preservación de los números y funcionalidad de estas células en GALT es importante para revertir los niveles de activación sistémica y en mucosas¹⁸³. Estos resultados serían análogos a las observaciones preliminares presentadas en este trabajo de tesis en tracto genital femenino, en las cuales la IMFr de IL-17 (una medida de la funcionalidad de células Th17) se correlacionó

inversamente con los niveles de la citoquina proinflamatoria IL-12 en exocervix (*Figura 33D*). Cabe resaltar lo novedoso de este tipo de análisis en tracto genital femenino, los cuales son escasos en la bibliografía. Finalmente, en un trabajo de reciente publicación realizado en una cohorte de mujeres sudafricanas¹⁹¹ se observó que, tras un año de implementación de TARV, la CV en plasma y en mucosa genital se suprimía pero, sin embargo, los niveles de citoquinas inflamatorias en mucosa genital permanecieron elevados. Esto podría traducirse en un aumento del riesgo de la liberación de virus en mucosa genital y la consecuente transmisión de HIV-1 en pacientes con CV plasmática indetectable. Los autores del trabajo describen que la liberación de virus en tracto genital depende, principalmente, de la CV en plasma pero también se ve influenciada por otros factores, como la concentración local de citoquinas proinflamatorias como MIP-1 β . En este contexto, consideramos que sería de gran importancia la futura evaluación de la CV genital en estas pacientes y el estudio de su potencial correlación con los niveles y funcionalidad de células Th17.

V. 3. LIMITACIONES Y ALCANCES DEL ESTUDIO

Cabe destacar que, a pesar de constituir hallazgos muy novedosos, una de las limitaciones del presente estudio se encuentra dada por la cantidad limitada de muestras disponibles para la realización de las múltiples evaluaciones. De este modo, aunque en la primera parte se reclutaron 40 individuos PHI, no todas las muestras permitieron obtener suficiente número de células para realizar todos los ensayos descritos. Del mismo modo, en la Parte II, no fue posible obtener suficiente cantidad de CMCs de todas las pacientes de las cuales se tomaron muestras ginecológicas y, hasta la fecha, sólo se han podido obtener 5 muestras de pacientes *naïve* de TARV en las cuales la calidad de la muestra era la adecuada para la realización del ensayo de estimulación de CMCs. Por este motivo el reclutamiento de pacientes continúa a fin de corroborar estos resultados ampliando el tamaño muestral de los grupos. Asimismo, la reducida cantidad de CMCs obtenidas para nuestros ensayos, que no resultó adecuada para la evaluación de marcadores fenotípicos en CMCs por citometría de flujo, se deben probablemente al esquema de toma de muestras

ginecológicas el cual priorizó la toma de un citocepillo endocervical para el control médico de las pacientes previo a la toma de la muestra que sería utilizada en este estudio. Por otro lado, no fue posible evaluar la microbiota vaginal ni realizar análisis moleculares de la presencia de otras enfermedades de transmisión sexual en las pacientes de las cuales se obtuvieron muestras ginecológicas, por lo que no fue posible evaluar su impacto sobre el microambiente de la mucosa genital y su potencial interacción con los parámetros estudiados. Finalmente, dada la naturaleza del diseño experimental y de los análisis realizados, no es posible establecer las relaciones causales ni los mecanismos subyacentes a las correlaciones halladas entre los parámetros estudiados.

A pesar de las limitaciones anteriormente mencionadas, los hallazgos descritos en este trabajo de tesis sugieren, por primera vez, la potencial existencia de interacciones entre la subpoblación de células Th17 y la relación Th17/Treg con la funcionalidad de la respuesta T CD8⁺ tanto específica frente a HIV-1 como frente a otros potenciales patógenos (respuesta T CD8⁺ policlonal). Además, fue posible demostrar que, aunque el inicio del TARV en la etapa crónica de la infección contribuye a la restauración de células Th17 y de la relación Th17/Treg en periferia, a nivel de la mucosa del tracto genital femenino la restauración de la funcionalidad de células Th17 y Treg parecería ser incompleta, de modo similar a lo observado en GALT. Finalmente cabe destacar que este constituye el primer trabajo que analiza los diversos aspectos anteriormente mencionados en cohortes de individuos infectados por HIV-1 de Sudamérica.

VI. CONCLUSIONES

-  La infección por HIV-1 tiene un impacto negativo sobre la relación Th17/Treg desde tiempos muy cortos p.i, e incluso en individuos capaces de controlar naturalmente la infección (ECs).
-  Desde etapas tempranas hasta los estadios crónicos de la infección por HIV-1 se observan niveles elevados de activación inmune celular, aún en individuos ECs.
-  Aquellos individuos de infección aguda/temprana (PHI) que sufren un rápido deterioro de su sistema inmunitario (con descensos de sus recuentos de células T CD4⁺ inferiores a los 350 células/ μ l durante el primer año p.i) evidencian menores niveles basales de células Th17 y mayores niveles basales de activación celular, de forma similar a lo observado en individuos crónicamente infectados.
-  Tanto durante la infección aguda/temprana como en etapas crónicas de la infección por HIV-1, la preservación de la subpoblación de células Th17 se asocia con una mejora en el estatus inmunológico y virológico de los pacientes (en cuanto al recuento de células T CD4⁺, la CV plasmática, marcadores solubles de progresión a la enfermedad y los niveles de activación inmune). Por el contrario, la expansión de la subpoblación Treg se correlaciona directamente con niveles incrementados de activación inmune, replicación viral y menores recuentos de células T CD4⁺.
-  Existe una relación directa entre los niveles basales de células Th17 y la funcionalidad de la respuesta T CD8⁺ antiviral protectora (capacidad de inhibir la replicación viral y frecuencia de células T CD8⁺ HIV-específicas CD107_{A/B}⁺/IFN- γ ⁺) tanto a tiempos tempranos como tardíos de la infección por HIV-1.
-  Al año post-infección, tanto la funcionalidad de las células Th17 como la relación Th17/Treg se relacionan con una mayor funcionalidad de las células T CD8⁺ HIV-específicas capaces de inhibir la replicación viral.
-  La proporción de células Th17 se correlaciona no solo con respuestas T CD8⁺ específicas frente a HIV-1 sino también con otras funciones ejercidas por diferentes subpoblaciones de células T efectoras (Th1, Tc1 y Tc17).

-  El tratamiento antirretroviral con supresión efectiva de la CV plasmática resulta en la restauración de los niveles y funcionalidad de células Th17 y del balance Th17/Treg en muestras de sangre periférica, pero no logra revertir las altas proporciones de células Treg.
-  Aunque el tratamiento antirretroviral disminuye parcialmente la activación inmune, los niveles de células T CD4⁺ activadas no alcanzan valores normales detectados en dadores sanos.
-  En individuos que se encuentran bajo tratamiento antirretroviral, una mayor eficiencia en la restauración de la subpoblación Th17 y del balance Th17/Treg se correlaciona con menores niveles de activación inmune y mayores recuentos de células T CD4⁺.
-  El tratamiento antirretroviral no logra restaurar los recuentos de células T CD4⁺ CD161⁺, una subpoblación precursora de células Th17 que poseen la capacidad de migrar a intestino, a los niveles normales observados de dadores sanos.
-  El tratamiento antirretroviral no logra restaurar a valores normales los niveles de secreción de las citoquinas IL-17A e IL-10 por parte de células mononucleares de cérvix.
-  Durante la infección por HIV-1, aún en aquellas pacientes que se encuentran bajo tratamiento, los niveles de mediadores solubles de inflamación en mucosa cervical se correlacionan positivamente con mayores niveles de activación inmune en periferia y con menores recuentos y funcionalidad de células Th17.

VII. REFERENCIAS

- 1 Fauci, A. S. HIV and AIDS: 20 years of science. *Nature medicine* **9**, 839-843 (2003).
- 2 Masur, H. *et al.* An outbreak of community-acquired *Pneumocystis carinii* pneumonia: initial manifestation of cellular immune dysfunction. *The New England journal of medicine* **305**, 1431-1438 (1981).
- 3 Barre-Sinoussi, F. *et al.* Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science (New York, N.Y)* **220**, 868-871 (1983).
- 4 Gallo, R. C. *et al.* Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science (New York, N.Y)* **224**, 500-503 (1984).
- 5 Gallo, R. C. *et al.* Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science (New York, N.Y)* **220**, 865-867 (1983).
- 6 Levy, J. A. *et al.* Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San Francisco patients with AIDS. *Science (New York, N.Y)* **225**, 840-842 (1984).
- 7 Ratner, L., Gallo, R. C. & Wong-Staal, F. HTLV-III, LAV, ARV are variants of same AIDS virus. *Nature* **313**, 636-637 (1985).
- 8 Clavel, F. *et al.* Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science (New York, N.Y)* **233**, 343-346 (1986).
- 9 Clavel, F. *et al.* Molecular cloning and polymorphism of the human immune deficiency virus type 2. *Nature* **324**, 691-695, doi:10.1038/324691a0 (1986).
- 10 Kong, L. I. *et al.* West African HIV-2-related human retrovirus with attenuated cytopathicity. *Science (New York, N.Y)* **240**, 1525-1529 (1988).
- 11 <http://www.unaids.org/>.
- 12 <http://www.msal.gov.ar/sida/>.
- 13 www.hiv.lanl.gov.
- 14 Plantier, J. C. *et al.* A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. *Nature medicine* **15**, 871-872 (2009).
- 15 Sanchez, A. M. *et al.* Development of a contemporary globally diverse HIV viral panel by the EQAPOL program. *Journal of immunological methods* **409**, 117-130 (2014).
- 16 Hemelaar, J. Implications of HIV diversity for the HIV-1 pandemic. *The Journal of infection* **66**, 391-400 (2013).
- 17 Arien, K. K., Vanham, G. & Arts, E. J. Is HIV-1 evolving to a less virulent form in humans? *Nature reviews* **5**, 141-151 (2007).
- 18 Flint, S. J. *Principles of Virology: Molecular Biology, Pathogenesis and Control*. (ASM Press, 2004).
- 19 Coffin, J. M. & Rosenberg, N. Retroviruses. Closing the joint. *Nature* **399**, 413, 415-416 (1999).
- 20 Lever, A. M. & Jeang, K. T. Replication of human immunodeficiency virus type 1 from entry to exit. *International journal of hematology* **84**, 23-30 (2006).
- 21 Choe, H. *et al.* The beta-chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates. *Cell* **85**, 1135-1148 (1996).
- 22 Deng, H. *et al.* Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature* **381**, 661-666 (1996).
- 23 Dragic, T. *et al.* HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature* **381**, 667-673 (1996).
- 24 Chan, D. C. & Kim, P. S. HIV entry and its inhibition. *Cell* **93**, 681-684 (1998).

- 25 Peterlin, B. M. & Trono, D. Hide, shield and strike back: how HIV-infected cells avoid immune eradication. *Nat Rev Immunol* **3**, 97-107 (2003).
- 26 Paiardini, M., Frank, I., Pandrea, I., Apetrei, C. & Silvestri, G. Mucosal immune dysfunction in AIDS pathogenesis. *AIDS reviews* **10**, 36-46 (2008).
- 27 Cunningham, A. L., Harman, A. N. & Nasr, N. Initial HIV mucosal infection and dendritic cells. *EMBO molecular medicine* **5**, 658-660 (2013).
- 28 Shaw, G. M. & Hunter, E. HIV transmission. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* **2** (2012).
- 29 Harman, A. N., Kim, M., Nasr, N., Sandgren, K. J. & Cameron, P. U. Tissue dendritic cells as portals for HIV entry. *Reviews in medical virology* **23**, 319-333 (2013).
- 30 Miller, C. J. *et al.* Propagation and dissemination of infection after vaginal transmission of simian immunodeficiency virus. *Journal of virology* **79**, 9217-9227 (2005).
- 31 Cohen, M. S., Anderson, J.A. and Swanstrom, R. . *Acute HIV Infection: Implications for HIV Spread, Disease Progression, and Vaccine Development, in HIV Molecular Immunology*. (2005).
- 32 Simon, V., Ho, D. D. & Abdool Karim, Q. HIV/AIDS epidemiology, pathogenesis, prevention, and treatment. *Lancet (London, England)* **368**, 489-504 (2006).
- 33 Mellors, J. W. *et al.* Plasma viral load and CD4+ lymphocytes as prognostic markers of HIV-1 infection. *Annals of internal medicine* **126**, 946-954 (1997).
- 34 Kelley, C. F., Barbour, J. D. & Hecht, F. M. The relation between symptoms, viral load, and viral load set point in primary HIV infection. *Journal of acquired immune deficiency syndromes (1999)* **45**, 445-448, doi:10.1097/QAI.0b013e318074ef6e (2007).
- 35 Walker, L. M. *et al.* Broad neutralization coverage of HIV by multiple highly potent antibodies. *Nature* **477**, 466-470 (2011).
- 36 Liao, H. X. *et al.* Co-evolution of a broadly neutralizing HIV-1 antibody and founder virus. *Nature* **496**, 469-476 (2013).
- 37 Cooper, A. *et al.* HIV-1 causes CD4 cell death through DNA-dependent protein kinase during viral integration. *Nature* **498**, 376-379 (2013).
- 38 Mehandru, S. *et al.* Mechanisms of gastrointestinal CD4+ T-cell depletion during acute and early human immunodeficiency virus type 1 infection. *Journal of virology* **81**, 599-612 (2007).
- 39 Brenchley, J. M., Price, D. A. & Douek, D. C. HIV disease: fallout from a mucosal catastrophe? *Nature immunology* **7**, 235-239 (2006).
- 40 Vrisekoop, N., Mandl, J. N. & Germain, R. N. Life and death as a T lymphocyte: from immune protection to HIV pathogenesis. *Journal of biology* **8**, 91 (2009).
- 41 Giorgi, J. V. *Phenotype and function of T cells in HIV disease*. 181–199 (Plenum Press, 1996).
- 42 Betts, M. R. *et al.* HIV nonprogressors preferentially maintain highly functional HIV-specific CD8+ T cells. *Blood* **107**, 4781-4789 (2006).
- 43 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. *The Journal of experimental medicine* **181**, 1365-1372 (1995).
- 44 Poropatch, K. & Sullivan, D. J., Jr. Human immunodeficiency virus type 1 long-term non-progressors: the viral, genetic and immunological basis for disease non-progression. *The Journal of general virology* **92**, 247-268.

- 45 Kloosterboer, N. *et al.* Natural controlled HIV infection: preserved HIV-specific immunity despite undetectable replication competent virus. *Virology* **339**, 70-80 (2005).
- 46 Lambotte, O. *et al.* HIV controllers: a homogeneous group of HIV-1-infected patients with spontaneous control of viral replication. *Clin Infect Dis* **41**, 1053-1056 (2005).
- 47 Jin, X. *et al.* Dramatic rise in plasma viremia after CD8(+) T cell depletion in simian immunodeficiency virus-infected macaques. *The Journal of experimental medicine* **189**, 991-998 (1999).
- 48 Schmitz, J. E. *et al.* Control of viremia in simian immunodeficiency virus infection by CD8+ lymphocytes. *Science (New York, N.Y)* **283**, 857-860 (1999).
- 49 Mahnke, Y. D., Brodie, T. M., Sallusto, F., Roederer, M. & Lugli, E. The who's who of T-cell differentiation: human memory T-cell subsets. *European journal of immunology* **43**, 2797-2809 (2013).
- 50 Streeck, H. *et al.* Antigen load and viral sequence diversification determine the functional profile of HIV-1-specific CD8+ T cells. *PLoS medicine* **5**, e100, doi:10.1371/journal.pmed.0050100 (2008).
- 51 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* **182**, 4751-4761, doi:10.4049/jimmunol.0803801 (2009).
- 52 Ganesan, A. *et al.* Immunologic and virologic events in early HIV infection predict subsequent rate of progression. *The Journal of infectious diseases* **201**, 272-284, doi:10.1086/649430 (2010).
- 53 Ghiglione, Y. *et al.* Early skewed distribution of total and HIV-specific CD8+ T-cell memory phenotypes during primary HIV infection is related to reduced antiviral activity and faster disease progression. *PloS one* **9**, e104235, doi:10.1371/journal.pone.0104235 (2014).
- 54 Day, C. L. *et al.* PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. *Nature* **443**, 350-354, doi:10.1038/nature05115 (2006).
- 55 Trautmann, L. *et al.* Upregulation of PD-1 expression on HIV-specific CD8+ T cells leads to reversible immune dysfunction. *Nature medicine* **12**, 1198-1202, doi:10.1038/nm1482 (2006).
- 56 Yamamoto, T. *et al.* Surface expression patterns of negative regulatory molecules identify determinants of virus-specific CD8+ T-cell exhaustion in HIV infection. *Blood* **117**, 4805-4815, doi:10.1182/blood-2010-11-317297 (2011).
- 57 Zuniga, R. *et al.* Relative dominance of Gag p24-specific cytotoxic T lymphocytes is associated with human immunodeficiency virus control. *Journal of virology* **80**, 3122-3125, doi:10.1128/JVI.80.6.3122-3125.2006 (2006).
- 58 Kiepiela, P. *et al.* CD8+ T-cell responses to different HIV proteins have discordant associations with viral load. *Nature medicine* **13**, 46-53 (2007).
- 59 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. *Journal of virology* **83**, 7641-7648 (2009).
- 60 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. *Journal of virology* **76**, 2298-2305 (2002).
- 61 Turk, G. *et al.* Early Gag immunodominance of the HIV-specific T-cell response during acute/early infection is associated with higher CD8+ T-cell antiviral activity and

- correlates with preservation of the CD4+ T-cell compartment. *Journal of virology* **87**, 7445-7462 (2013).
- 62 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* **182**, 7828-7837, doi:10.4049/jimmunol.0803928 (2009).
- 63 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 7239-7244, doi:10.1073/pnas.0502393102 (2005).
- 64 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 6776-6781, doi:10.1073/pnas.0611244104 (2007).
- 65 Freel, S. A. *et al.* Phenotypic and functional profile of HIV-inhibitory CD8 T cells elicited by natural infection and heterologous prime/boost vaccination. *Journal of virology* **84**, 4998-5006, doi:10.1128/JVI.00138-10 (2010).
- 66 Ndhlovu, Z. M. *et al.* Elite controllers with low to absent effector CD8+ T cell responses maintain highly functional, broadly directed central memory responses. *Journal of virology* **86**, 6959-6969, doi:10.1128/JVI.00531-12 (2012).
- 67 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. *Journal of virology* **86**, 5877-5884, doi:10.1128/JVI.00315-12 (2012).
- 68 Julg, B. *et al.* Enhanced anti-HIV functional activity associated with Gag-specific CD8 T-cell responses. *Journal of virology* **84**, 5540-5549, doi:10.1128/JVI.02031-09 (2010).
- 69 Almeida, J. R. *et al.* Antigen sensitivity is a major determinant of CD8+ T-cell polyfunctionality and HIV-suppressive activity. *Blood* **113**, 6351-6360 (2009).
- 70 Ferre, A. L. *et al.* Mucosal immune responses to HIV-1 in elite controllers: a potential correlate of immune control. *Blood* **113**, 3978-3989 (2009).
- 71 Hersperger, A. R. *et al.* Perforin expression directly *ex vivo* by HIV-specific CD8 T-cells is a correlate of HIV elite control. *PLoS pathogens* **6**, e1000917 (2010).
- 72 Betts, M. R. & Koup, R. A. Detection of T-cell degranulation: CD107a and b. *Methods in cell biology* **75**, 497-512 (2004).
- 73 Yang, L. *et al.* IL-21 and TGF-beta are required for differentiation of human T(H)17 cells. *Nature* **454**, 350-352 (2008).
- 74 Manel, N., Unutmaz, D. & Littman, D. R. The differentiation of human T(H)-17 cells requires transforming growth factor-beta and induction of the nuclear receptor RORgammat. *Nature immunology* **9**, 641-649 (2008).
- 75 Bettelli, E. *et al.* Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* **441**, 235-238 (2006).
- 76 Veldhoen, M., Hocking, R. J., Atkins, C. J., Locksley, R. M. & Stockinger, B. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports *de novo* differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* **24**, 179-189 (2006).
- 77 Dong, C. TH17 cells in development: an updated view of their molecular identity and genetic programming. *Nat Rev Immunol* **8**, 337-348 (2008).
- 78 Zuniga, L. A., Jain, R., Haines, C. & Cua, D. J. Th17 cell development: from the cradle to the grave. *Immunological reviews* **252**, 78-88 (2013).

- 79 Ivanov, I. I. *et al.* The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17⁺ T helper cells. *Cell* **126**, 1121-1133 (2006).
- 80 Cook, D. N. *et al.* CCR6 mediates dendritic cell localization, lymphocyte homeostasis, and immune responses in mucosal tissue. *Immunity* **12**, 495-503 (2000).
- 81 Kolls, J. K. & Linden, A. Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity* **21**, 467-476 (2004).
- 82 Onishi, R. M. & Gaffen, S. L. Interleukin-17 and its target genes: mechanisms of interleukin-17 function in disease. *Immunology* **129**, 311-321 (2010).
- 83 Blaschitz, C. & Raffatellu, M. Th17 cytokines and the gut mucosal barrier. *Journal of clinical immunology* **30**, 196-203 (2010).
- 84 Zhu, S. & Qian, Y. IL-17/IL-17 receptor system in autoimmune disease: mechanisms and therapeutic potential. *Clin Sci (Lond)* **122**, 487-511 (2012).
- 85 Shevach, E. M. CD4⁺ CD25⁺ suppressor T cells: more questions than answers. *Nat Rev Immunol* **2**, 389-400 (2002).
- 86 von Boehmer, H. Mechanisms of suppression by suppressor T cells. *Nature immunology* **6**, 338-344 (2005).
- 87 Whiteside, T. L. Regulatory T cell subsets in human cancer: are they regulating for or against tumor progression? *Cancer Immunol Immunother* **63**, 67-72 (2014).
- 88 Hori, S., Nomura, T. & Sakaguchi, S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science (New York, N.Y)* **299**, 1057-1061 (2003).
- 89 Fontenot, J. D., Gavin, M. A. & Rudensky, A. Y. Foxp3 programs the development and function of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells. *Nature immunology* **4**, 330-336 (2003).
- 90 Workman, C. J., Szymczak-Workman, A. L., Collison, L. W., Pillai, M. R. & Vignali, D. A. The development and function of regulatory T cells. *Cell Mol Life Sci* **66**, 2603-2622 (2009).
- 91 Zhou, L., Chong, M. M. & Littman, D. R. Plasticity of CD4⁺ T cell lineage differentiation. *Immunity* **30**, 646-655 (2009).
- 92 Wolf, M., Schimpl, A. & Hunig, T. Control of T cell hyperactivation in IL-2-deficient mice by CD4(+)CD25(-) and CD4(+)CD25(+) T cells: evidence for two distinct regulatory mechanisms. *European journal of immunology* **31**, 1637-1645 (2001).
- 93 Robinson, D. S. Regulatory T cells and asthma. *Clin Exp Allergy* **39**, 1314-1323 (2009).
- 94 Costantino, C. M., Baecher-Allan, C. & Hafler, D. A. Multiple sclerosis and regulatory T cells. *Journal of clinical immunology* **28**, 697-706 (2008).
- 95 Jaeckel, E., Mpofu, N., Saal, N. & Manns, M. P. Role of regulatory T cells for the treatment of type 1 diabetes mellitus. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme* **40**, 126-136 (2008).
- 96 Miyara, M. & Sakaguchi, S. Natural regulatory T cells: mechanisms of suppression. *Trends in molecular medicine* **13**, 108-116 (2007).
- 97 Jonuleit, H. & Schmitt, E. The regulatory T cell family: distinct subsets and their interrelations. *J Immunol* **171**, 6323-6327 (2003).
- 98 Pyzik, M. & Piccirillo, C. A. TGF- β 1 modulates Foxp3 expression and regulatory activity in distinct CD4⁺ T cell subsets. *Journal of leukocyte biology* **82**, 335-346 (2007).
- 99 Awasthi, A. *et al.* A dominant function for interleukin 27 in generating interleukin 10-producing anti-inflammatory T cells. *Nature immunology* **8**, 1380-1389 (2007).

- 100 de Waal Malefyt, R. *et al.* Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. *The Journal of experimental medicine* **174**, 915-924 (1991).
- 101 Ding, L., Linsley, P. S., Huang, L. Y., Germain, R. N. & Shevach, E. M. IL-10 inhibits macrophage costimulatory activity by selectively inhibiting the up-regulation of B7 expression. *J Immunol* **151**, 1224-1234 (1993).
- 102 Speiran, K. *et al.* Endogenous suppression of mast cell development and survival by IL-4 and IL-10. *Journal of leukocyte biology* **85**, 826-836 (2009).
- 103 Williams, L. M., Ricchetti, G., Sarma, U., Smallie, T. & Foxwell, B. M. Interleukin-10 suppression of myeloid cell activation--a continuing puzzle. *Immunology* **113**, 281-292 (2004).
- 104 Li, M. O., Sanjabi, S. & Flavell, R. A. Transforming growth factor-beta controls development, homeostasis, and tolerance of T cells by regulatory T cell-dependent and -independent mechanisms. *Immunity* **25**, 455-471 (2006).
- 105 Zhou, L. *et al.* IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. *Nature immunology* **8**, 967-974 (2007).
- 106 Zhou, L. *et al.* TGF-beta-induced Foxp3 inhibits T(H)17 cell differentiation by antagonizing RORgamma function. *Nature* **453**, 236-240 (2008).
- 107 Noack, M. & Miossec, P. Th17 and regulatory T cell balance in autoimmune and inflammatory diseases. *Autoimmunity reviews* **13**, 668-677 (2014).
- 108 Basso, A. S., Cheroutre, H. & Mucida, D. More stories on Th17 cells. *Cell research* **19**, 399-411 (2009).
- 109 Ochs, H. D., Oukka, M. & Torgerson, T. R. TH17 cells and regulatory T cells in primary immunodeficiency diseases. *The Journal of allergy and clinical immunology* **123**, 977-983; quiz 984-975 (2009).
- 110 Brenchley, J. M. *et al.* Differential Th17 CD4 T-cell depletion in pathogenic and nonpathogenic lentiviral infections. *Blood* **112**, 2826-2835 (2008).
- 111 Prendergast, A. *et al.* HIV-1 infection is characterized by profound depletion of CD161+ Th17 cells and gradual decline in regulatory T cells. *AIDS (London, England)* **24**, 491-502 (2010).
- 112 Favre, D. *et al.* Critical loss of the balance between Th17 and T regulatory cell populations in pathogenic SIV infection. *PLoS pathogens* **5**, e1000295 (2009).
- 113 Cecchinato, V. *et al.* Altered balance between Th17 and Th1 cells at mucosal sites predicts AIDS progression in simian immunodeficiency virus-infected macaques. *Mucosal immunology* **1**, 279-288 (2008).
- 114 Brenchley, J. M. & Douek, D. C. Microbial translocation across the GI tract. *Annual review of immunology* **30**, 149-173 (2012).
- 115 Ciccone, E. J. *et al.* CD4+ T cells, including Th17 and cycling subsets, are intact in the gut mucosa of HIV-1-infected long-term nonprogressors. *Journal of virology* **85**, 5880-5888 (2011).
- 116 Salgado, M. *et al.* Long-term non-progressors display a greater number of Th17 cells than HIV-infected typical progressors. *Clinical immunology (Orlando, Fla)* **139**, 110-114 (2011).
- 117 Kanwar, B., Favre, D. & McCune, J. M. Th17 and regulatory T cells: implications for AIDS pathogenesis. *Current opinion in HIV and AIDS* **5**, 151-157 (2010).

- 118 Brandt, L. *et al.* Low level of regulatory T cells and maintenance of balance between regulatory T cells and TH17 cells in HIV-1-infected elite controllers. *Journal of acquired immune deficiency syndromes (1999)* **57**, 101-108 (2011).
- 119 Klatt, N. R. & Brenchley, J. M. Th17 cell dynamics in HIV infection. *Current opinion in HIV and AIDS* **5**, 135-140 (2010).
- 120 Hartigan-O'Connor, D. J., Abel, K., Van Rompay, K. K., Kanwar, B. & McCune, J. M. SIV replication in the infected rhesus macaque is limited by the size of the preexisting TH17 cell compartment. *Science translational medicine* **4**, 136ra169 (2012).
- 121 Macal, M. *et al.* Effective CD4+ T-cell restoration in gut-associated lymphoid tissue of HIV-infected patients is associated with enhanced Th17 cells and polyfunctional HIV-specific T-cell responses. *Mucosal immunology* **1**, 475-488 (2008).
- 122 Mehandru, S. *et al.* Lack of mucosal immune reconstitution during prolonged treatment of acute and early HIV-1 infection. *PLoS medicine* **3**, e484 (2006).
- 123 He, Y. *et al.* A randomized case-control study of dynamic changes in peripheral blood Th17/Treg cell balance and interleukin-17 levels in highly active antiretroviral-treated HIV type 1/AIDS patients. *AIDS research and human retroviruses* **28**, 339-345 (2012).
- 124 Alvarez, Y., Tuen, M., Nadas, A. & Hioe, C. E. In vitro restoration of Th17 response during HIV infection with an antiretroviral drug and Th17 differentiation cytokines. *AIDS research and human retroviruses* **28**, 823-834 (2012).
- 125 Blaskewicz, C. D., Pudney, J. & Anderson, D. J. Structure and function of intercellular junctions in human cervical and vaginal mucosal epithelia. *Biology of reproduction* **85**, 97-104 (2011).
- 126 Mestecky, J., Moldoveanu, Z. & Russell, M. W. Immunologic uniqueness of the genital tract: challenge for vaccine development. *Am J Reprod Immunol* **53**, 208-214 (2005).
- 127 Wira CR, R. J., Prabhala R. *Endocrine regulation of mucosal immunity: effect of sex hormones and cytokines on the afferent and efferent arms of the immune system in the female reproductive tract.* (Academic Press, 1994).
- 128 Kaushic, C., Roth, K. L., Anipindi, V. & Xiu, F. Increased prevalence of sexually transmitted viral infections in women: the role of female sex hormones in regulating susceptibility and immune responses. *Journal of reproductive immunology* **88**, 204-209 (2011).
- 129 Wira, C. R., Patel, M. V., Ghosh, M., Mukura, L. & Fahey, J. V. Innate immunity in the human female reproductive tract: endocrine regulation of endogenous antimicrobial protection against HIV and other sexually transmitted infections. *Am J Reprod Immunol* **65**, 196-211 (2011).
- 130 Nguyen, P. V., Kafka, J. K., Ferreira, V. H., Roth, K. & Kaushic, C. Innate and adaptive immune responses in male and female reproductive tracts in homeostasis and following HIV infection. *Cellular & molecular immunology* **11**, 410-427 (2014).
- 131 Yeaman, G. R. *et al.* Unique CD8+ T cell-rich lymphoid aggregates in human uterine endometrium. *Journal of leukocyte biology* **61**, 427-435 (1997).
- 132 Pudney, J., Quayle, A. J. & Anderson, D. J. Immunological microenvironments in the human vagina and cervix: mediators of cellular immunity are concentrated in the cervical transformation zone. *Biology of reproduction* **73**, 1253-1263 (2005).
- 133 Hladik, F. & McElrath, M. J. Setting the stage: host invasion by HIV. *Nat Rev Immunol* **8**, 447-457 (2008).
- 134 Brotman, R. M., Ravel, J., Bavoil, P. M., Gravitt, P. E. & Ghanem, K. G. Microbiome, sex hormones, and immune responses in the reproductive tract: challenges for

- vaccine development against sexually transmitted infections. *Vaccine* **32**, 1543-1552 (2014).
- 135 Ferreira, V. H., Kafka, J. K. & Kaushic, C. Influence of common mucosal co-factors on HIV infection in the female genital tract. *Am J Reprod Immunol* **71**, 543-554 (2014).
- 136 Haase, A. T. Early events in sexual transmission of HIV and SIV and opportunities for interventions. *Annual review of medicine* **62**, 127-139 (2011).
- 137 Abel, K., Rocke, D. M., Chohan, B., Fritts, L. & Miller, C. J. Temporal and anatomic relationship between virus replication and cytokine gene expression after vaginal simian immunodeficiency virus infection. *Journal of virology* **79**, 12164-12172 (2005).
- 138 McKinnon, L. R. *et al.* Characterization of a human cervical CD4+ T cell subset coexpressing multiple markers of HIV susceptibility. *J Immunol* **187**, 6032-6042 (2011).
- 139 McKinnon, L. R. & Kaul, R. Quality and quantity: mucosal CD4+ T cells and HIV susceptibility. *Current opinion in HIV and AIDS* **7**, 195-202 (2012).
- 140 Roberts, L. *et al.* Plasma cytokine levels during acute HIV-1 infection predict HIV disease progression. *AIDS (London, England)* **24**, 819-831 (2010).
- 141 Roberts, L. *et al.* Genital tract inflammation during early HIV-1 infection predicts higher plasma viral load set point in women. *The Journal of infectious diseases* **205**, 194-203 (2012).
- 142 Chege, D. *et al.* Blunted IL17/IL22 and pro-inflammatory cytokine responses in the genital tract and blood of HIV-exposed, seronegative female sex workers in Kenya. *PLoS one* **7**, e43670 (2012).
- 143 Socias, M. E. *et al.* Acute retroviral syndrome and high baseline viral load are predictors of rapid HIV progression among untreated Argentinean seroconverters. *Journal of the International AIDS Society* **14**, 40 (2011).
- 144 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 (London, England)* **17**, 1871-1879 (2003).
- 145 Kay, J. E. Mechanisms of T lymphocyte activation. *Immunology letters* **29**, 51-54 (1991).
- 146 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. *Journal of virology* **81**, 5225-5237 (2007).
- 147 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. *Journal of immunological methods* **260**, 157-172 (2002).
- 148 Saez-Cirion, A., Shin, S. Y., Versmisse, P., Barre-Sinoussi, F. & Pancino, G. Ex vivo T cell-based HIV suppression assay to evaluate HIV-specific CD8+ T-cell responses. *Nature protocols* **5**, 1033-1041 (2010).
- 149 Giavedoni, L. D. Simultaneous detection of multiple cytokines and chemokines from nonhuman primates using luminex technology. *Journal of immunological methods* **301**, 89-101 (2005).
- 150 Liebenberg, L. J. *et al.* Stability and transport of cervical cytobrushes for isolation of mononuclear cells from the female genital tract. *Journal of immunological methods* **367**, 47-55, doi:10.1016/j.jim.2011.01.013 (2011).
- 151 Mkhize, N. N. *et al.* Persistence of genital tract T cell responses in HIV-infected women on highly active antiretroviral therapy. *Journal of virology* **84**, 10765-10772, doi:10.1128/JVI.00518-10 (2010).

- 152 Gumbi, P. P. *et al.* CD4 T cell depletion at the cervix during HIV infection is associated with accumulation of terminally differentiated T cells. *Journal of virology* **85**, 13333-13341 (2011).
- 153 Chevalier, M. F. *et al.* The Th17/Treg ratio, IL-1RA and sCD14 levels in primary HIV infection predict the T-cell activation set point in the absence of systemic microbial translocation. *PLoS pathogens* **9**, e1003453 (2013).
- 154 Cocchi, F. *et al.* Soluble factors from T cells inhibiting X4 strains of HIV are a mixture of beta chemokines and RNases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**, 5411-5416 (2012).
- 155 Jenabian, M. A. *et al.* Soluble CD40-ligand (sCD40L, sCD154) plays an immunosuppressive role via regulatory T-cell expansion in HIV infection. *Clinical and experimental immunology* (2014).
- 156 Yang, H. *et al.* Antiviral inhibitory capacity of CD8+ T cells predicts the rate of CD4+ T-cell decline in HIV-1 infection. *The Journal of infectious diseases* **206**, 552-561 (2012).
- 157 Tansiri, Y., Rowland-Jones, S. L., Ananworanich, J. & Hansasuta, P. Clinical outcome of HIV viraemic controllers and noncontrollers with normal CD4 counts is exclusively determined by antigen-specific CD8+ T-cell-mediated HIV suppression. *PloS one* **10**, e0118871, doi:10.1371/journal.pone.0118871 (2015).
- 158 Kim, C. J. *et al.* Mucosal Th17 cell function is altered during HIV infection and is an independent predictor of systemic immune activation. *J Immunol* **191**, 2164-2173 (2013).
- 159 Kleinschek, M. A. *et al.* Circulating and gut-resident human Th17 cells express CD161 and promote intestinal inflammation. *The Journal of experimental medicine* **206**, 525-534, doi:10.1084/jem.20081712 (2009).
- 160 Arnold, K. B. *et al.* Increased levels of inflammatory cytokines in the female reproductive tract are associated with altered expression of proteases, mucosal barrier proteins, and an influx of HIV-susceptible target cells. *Mucosal immunology*, doi:10.1038/mi.2015.51 (2015).
- 161 Masson, L. *et al.* Genital inflammation and the risk of HIV acquisition in women. *Clin Infect Dis* **61**, 260-269, doi:10.1093/cid/civ298 (2015).
- 162 Krishnan, S. *et al.* Evidence for innate immune system activation in HIV type 1-infected elite controllers. *The Journal of infectious diseases* **209**, 931-939 (2014).
- 163 Pereyra, F. *et al.* Increased coronary atherosclerosis and immune activation in HIV-1 elite controllers. *AIDS (London, England)* **26**, 2409-2412 (2012).
- 164 Hunt, P. W. *et al.* Relationship between T cell activation and CD4+ T cell count in HIV-seropositive individuals with undetectable plasma HIV RNA levels in the absence of therapy. *The Journal of infectious diseases* **197**, 126-133 (2008).
- 165 Singh, A., Vajpayee, M., Ali, S. A. & Chauhan, N. K. Cellular interplay among Th17, Th1, and Treg cells in HIV-1 subtype "C" infection. *Journal of medical virology* **86**, 372-384 (2014).
- 166 Li, D. *et al.* Loss of balance between T helper type 17 and regulatory T cells in chronic human immunodeficiency virus infection. *Clinical and experimental immunology* **165**, 363-371 (2011).
- 167 Olson, A. D. *et al.* Evaluation of rapid progressors in HIV infection as an extreme phenotype. *Journal of acquired immune deficiency syndromes (1999)* **67**, 15-21 (2014).

- 168 Favre, D. *et al.* Tryptophan catabolism by indoleamine 2,3-dioxygenase 1 alters the balance of TH17 to regulatory T cells in HIV disease. *Science translational medicine* **2**, 32ra36 (2010).
- 169 Chevalier, M. F. *et al.* HIV-1-specific interleukin-21+ CD4+ T cell responses contribute to durable viral control through the modulation of HIV-specific CD8+ T cell function. *Journal of virology* **85**, 733-741 (2011).
- 170 Wherry, E. J. & Ahmed, R. Memory CD8 T-cell differentiation during viral infection. *Journal of virology* **78**, 5535-5545 (2004).
- 171 Fuller, M. J. & Zajac, A. J. Ablation of CD8 and CD4 T cell responses by high viral loads. *J Immunol* **170**, 477-486 (2003).
- 172 Kostense, S. *et al.* High viral burden in the presence of major HIV-specific CD8(+) T cell expansions: evidence for impaired CTL effector function. *European journal of immunology* **31**, 677-686 (2001).
- 173 Zajac, A. J. *et al.* Viral immune evasion due to persistence of activated T cells without effector function. *The Journal of experimental medicine* **188**, 2205-2213 (1998).
- 174 Wei, L., Laurence, A., Elias, K. M. & O'Shea, J. J. IL-21 is produced by Th17 cells and drives IL-17 production in a STAT3-dependent manner. *The Journal of biological chemistry* **282**, 34605-34610 (2007).
- 175 Barker, B. R., Gladstone, M. N., Gillard, G. O., Panas, M. W. & Letvin, N. L. Critical role for IL-21 in both primary and memory anti-viral CD8+ T-cell responses. *European journal of immunology* **40**, 3085-3096 (2010).
- 176 Novy, P., Huang, X., Leonard, W. J. & Yang, Y. Intrinsic IL-21 signaling is critical for CD8 T cell survival and memory formation in response to vaccinia viral infection. *J Immunol* **186**, 2729-2738 (2011).
- 177 Yi, J. S., Ingram, J. T. & Zajac, A. J. IL-21 deficiency influences CD8 T cell quality and recall responses following an acute viral infection. *J Immunol* **185**, 4835-4845 (2010).
- 178 Nurieva, R. *et al.* Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells. *Nature* **448**, 480-483 (2007).
- 179 Korn, T. *et al.* IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells. *Nature* **448**, 484-487 (2007).
- 180 Pallikkuth, S. *et al.* Maintenance of intestinal Th17 cells and reduced microbial translocation in SIV-infected rhesus macaques treated with interleukin (IL)-21. *PLoS pathogens* **9**, e1003471 (2013).
- 181 Peng, Q. *et al.* Imbalances of gut-homing CD4+ T-cell subsets in HIV-1-infected Chinese patients. *Journal of acquired immune deficiency syndromes (1999)* **64**, 25-31, doi:10.1097/QAI.0b013e318293a114 (2013).
- 182 Page, E. E. *et al.* Loss of Th22 cells is associated with increased immune activation and IDO-1 activity in HIV-1 infection. *Journal of acquired immune deficiency syndromes (1999)* **67**, 227-235, doi:10.1097/QAI.0000000000000294 (2014).
- 183 Schuetz, A. *et al.* Initiation of ART during early acute HIV infection preserves mucosal Th17 function and reverses HIV-related immune activation. *PLoS pathogens* **10**, e1004543, doi:10.1371/journal.ppat.1004543 (2014).
- 184 Eberhard, J. M. *et al.* CD161+ MAIT cells are severely reduced in peripheral blood and lymph nodes of HIV-infected individuals independently of disease progression. *PLoS one* **9**, e111323, doi:10.1371/journal.pone.0111323 (2014).
- 185 Guadalupe, M. *et al.* Severe CD4+ T-cell depletion in gut lymphoid tissue during primary human immunodeficiency virus type 1 infection and substantial delay in restoration following highly active antiretroviral therapy. *Journal of virology* **77**, 11708-11717 (2003).

- 186 McKinnon, L. R. *et al.* Early HIV-1 infection is associated with reduced frequencies of cervical Th17 cells. *Journal of acquired immune deficiency syndromes (1999)* **68**, 6-12, doi:10.1097/QAI.0000000000000389 (2015).
- 187 Zielinski, C. E. *et al.* Pathogen-induced human TH17 cells produce IFN-gamma or IL-10 and are regulated by IL-1beta. *Nature* **484**, 514-518, doi:10.1038/nature10957 (2012).
- 188 Spencer, L. Y. *et al.* Systemic Immune Activation and HIV Shedding in the Female Genital Tract. *Journal of acquired immune deficiency syndromes (1999)*, doi:10.1097/QAI.0000000000000823 (2015).
- 189 Gumbi, P. P. *et al.* Impact of mucosal inflammation on cervical human immunodeficiency virus (HIV-1)-specific CD8 T-cell responses in the female genital tract during chronic HIV infection. *Journal of virology* **82**, 8529-8536, doi:10.1128/JVI.00183-08 (2008).
- 190 Lamkanfi, M. & Dixit, V. M. Modulation of inflammasome pathways by bacterial and viral pathogens. *J Immunol* **187**, 597-602, doi:10.4049/jimmunol.1100229 (2011).
- 191 Ondoa, P. *et al.* Twelve-Month Antiretroviral Therapy Suppresses Plasma and Genital Viral Loads but Fails to Alter Genital Levels of Cytokines, in a Cohort of HIV-Infected Rwandan Women. *PloS one* **10**, e0127201, doi:10.1371/journal.pone.0127201 (2015).