



FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Medicina y Especialidades Médicas

Combinación del uso de Galectina-9 como agente reactivador de la latencia del VIH-1 y el bloqueo del receptor celular TIM-3 como estrategia global para la curación de la infección por VIH-1

Tesis doctoral

MARTA SANZ PÉREZ

2020

UNIVERSIDAD DE ALCALÁ

FACULTAD DE MEDICINA

Programa de Doctorado en Ciencias de la Salud



Combinación del uso de Galectina-9 como agente reactivador de la latencia del VIH-1 y el bloqueo del receptor celular TIM-3 como estrategia global para la curación de la infección por VIH-1

Tesis Doctoral presentada por:

Marta Sanz Pérez

DIRECTORES: Dr. Santiago Moreno Guillén

Dra. Carolina Gutiérrez Montero

Alcalá de Henares, 2020

Este trabajo ha sido financiado por el Fondo de investigación sanitaria. Proyecto PI17/01636, con el Título "Eliminación del reservorio celular latente del VIH-1 mediante manipulación de la interacción entre Galectina-9 y TIM-3 (Proyecto Galactic). 2018-2020. Investigador Principal Dr. Santiago Moreno Guillén.

Cofinanciado por la Red de Investigación en SIDA (RIS) (RETIC RD16/0025/001) integrado en el Plan Nacional de I+D+I y por el ISCIII-Subdirección General de Evaluación y el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER).

Agradecimientos

Nunca pensé que llegaría este momento...pero cierro una etapa de 3 años maravillosos.

En primer lugar, quiero agradecer a mis directores de Tesis, Santiago Moreno y Carolina Gutiérrez, sin ellos este trabajo no habría salido adelante.

Gracias Santi, por darme esta gran oportunidad de trabajar a tu lado, por todo lo que me has enseñado del mundo del VIH, por tus consejos, tu apoyo, tu cariño, por motivarme y animarme a seguir adelante. Gracias por todo y por estar siempre ahí.

Gracias Carol, por ayudarme tanto durante estos años, por tu apoyo día tras día, por escucharme y por estar ahí con cada duda que tenía (¡que no eran pocas!). Gracias por tu dedicación y estar pendiente de mí

A Nadia quiero agradecerle todo su apoyo y sus consejos, por ser una gran compañera y amiga. Gracias porque siempre he podido contar contigo (¡incluso en nuestras investigaciones no científicas!). A María Elena, quiero agradecerle todo su cariño, su amor, sus consejos de la vida en general y por preocuparse de mí. Gracias a las 2 por los buenos momentos que hemos pasado juntas.

Quiero agradecer al resto del laboratorio, Alex, Fran, Laura L. y Manoli y a toda la gente del Servicio de Enfermedades Infecciosas del Hospital Ramón y Cajal, en especial al Dr. Sergio Serrano y a sus pacientes por su colaboración.

Quiero dar las gracias al laboratorio donde comencé, y donde vi que la ciencia era para mí. En especial quiero agradecer a Gloria y a Jose por enseñarme tanto y por hacerme pensar cuando un experimento no salía y no tirar la toalla. Gracias a Celes, Tania y Lorena por mis primeros 6 años en el mundo bacteriano.

A mis amigas, con las que siempre puedo contar ya sea para lo bueno o lo malo, Virgi, Sofía, Saavi, Tena, Noush y Sus. Gracias por estar a mi lado.

A mis Frikis, Víctor, Andrea, Jero, Irene y bombón Héctor, por animarme cada fin de semana y por esas horas que parecen infinitas de juegos de mesa.

A mi madre, gracias por absolutamente todo, por animarme en cada momento de bajón, por todo el apoyo, eres mi guía y mi ejemplo. Gracias por toda la fuerza que me das y por aguantar en algunas (muchas) ocasiones mi mal genio. Gracias por nuestros viajesitos a Málaga, que siempre tendremos. A mi padre, que, aunque ya no estés, sé que estarías muy orgulloso de mí y por muy extraño que parezca sé que aún me sigues ayudando. A mi tía por todo el amor, cariño y por preocuparse tanto de mí. A mi hermana, a mi cuñado y a mis sobris, mi tío Manolo y Pilar, gracias por vuestro apoyo. A Fer, gracias por todo tu cariño y por ser el fan número 1 de Galectina, por estar siempre tan interesado y por preguntarme cada día como van las celulillas. Gracias por escucharme y por estar siempre.

Por último, Fabián, (ese último trocito de palmera de chocolate), gracias por ser todo para mí, por tirar de mí en los peores momentos, por cuidarme, protegerme, sobre todo esta tesis va para ti, eres el que más lo ha sufrido, has tenido que aguantar mis agobios y mi carácter. Gracias por apoyarme en mis decisiones. Gracias por estar en mi vida y hacerme reír en cada momento. Gracias por hacerme sentir la persona más afortunada del mundo y por no separarte de mí.

Índice

FIGURAS	23
TABLAS	25
ABREVIATURAS	27
INTRODUCCIÓN	33
1.OBSTÁCULOS PARA LA ERRADICACIÓN DEL VIH-1	35
1.1. El virus de la inmunodeficiencia humana. Agente etiológico del síndrome de inmunodeficiencia adquirida	35
1.2. Importancia epidemiológica de la infección por el VIH-1	38
1.3. Replicación residual del VIH-1	38
1.4. Santuarios anatómicos	40
1.5. Reservorio celular latente	42
1.5.1. Establecimiento y mantenimiento de la latencia	44
1.6. Agotamiento inmunológico	46
2. ESTRATEGIAS PARA LA CURACIÓN	50
2.1. Inicio del tratamiento precoz	50
2.2. Intensificación del TAR: eliminación de la replicación persistente	50
2.3. Eliminación de los reservorios anatómicos	51
2.4. Trasplante de médula ósea y terapia génica	52
2.5. Eliminar el reservorio celular latente. Agentes reactivadores de la latencia	54
2.6. Mejorar el agotamiento inmunológico	58
3. GALECTINAS	61
3.1. Origen de las Galectinas	61
3.2. Estructura y tipos de Galectinas	61
3.3. Función de las Galectinas	64
3.4. Galectina-9	68
3.4.1 Estructura y características bioquímicas de Gal-9	68
3.4.2. Gal-9 en procesos biológicos	70
4. PROTEÍNAS TIM	77
4.1. Estructura de las proteínas TIM	77
4.2. TIM-3	81
4.2.1. Estructura de TIM-3	81
4.2.2. Ligandos de TIM-3	82

4.2.3. TIM-3 en enfermedades	83
5. VIH-1. Interacción Gal-9:TIM-3	87
JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	91
MATERIALES Y MÉTODOS	97
1. Toxicidad de Gal-9 y α -TIM-3 en células VERO	99
2. Reactivación de VIH-1 latente mediada por Gal-9	99
2.1. Evaluación de la actividad reactivadora de Gal-9 en el sistema celular Jurkat-LAT-GFP	99
2.2. Reactivación de VIH-1 mediada por Gal-9 en modelos de latencia en células T CD4 ⁺ basado en IL-7	101
2.2.1. Generación del sobrenadante viral NL4.3	101
2.2.2. Detección de la proteína p24 del VIH-1	103
2.2.3. Obtención y cultivo de células mononucleares de sangre periférica	103
2.2.4. Purificación de las poblaciones celulares T CD4 ⁺ memoria reposo	103
2.2.5 Modelo celular basado en IL-7	104
2.2.6. Extracción del ADN total	106
2.2.7. Cuantificación de la integración del VIH-1	107
3. Evaluación del bloqueo de la unión de Gal-9 a TIM-3 en la restauración de la actividad CTL de los linfocitos T CD8 ⁺ y NK	108
3.1. Purificación de las poblaciones celulares T CD4 ⁺ t, células T CD8 ⁺ y NK	109
3.2. Modelo <i>in vitro</i> . Co-cultivos CD4 ⁺ t:CD8 ⁺ , CD4 ⁺ t: NK, CD4 ⁺ t:CD8 ⁺ : NK	109
3.2.2. Determinación de citoquinas Th1/Th2/Th17	110
3.3. Modelo <i>in vitro</i> . Co-cultivos CD4 ⁺ reposo latentemente infectadas: CD8 ⁺	111
3.4. Modelo <i>ex vivo</i> . Co-cultivos CD4 ⁺ t:CD8 ⁺ , CD4 ⁺ t: NK, CD4 ⁺ t:CD8 ⁺ : NK	112
3.4.1. Detección de la proteína p24 del VIH-1	113
3.4.2. Determinación de citoquinas Th1/Th2/Th17	113
4. Consideraciones éticas	114
5. Análisis estadístico	114
RESULTADOS	117
1. Toxicidad de Gal-9 y α -TIM-3 en células VERO	119

2. Reactivación de VIH-1 latente mediada por Gal-9	120
2.1. Reactivación de VIH-1 mediada por Gal-9 en el sistema celular Jurkat-LAT-GFP	120
2.2. Reactivación de VIH-1 mediada por Gal-9 en modelos de latencia en células T CD4 ⁺ basado en IL-7	121
2.2.1 Reactivación mediada por Gal-9	121
2.2.2. Reactivación mediada por Gal-9 en combinación con tunicamicina	123
2.2.3. Reactivación mediada por Gal-9 en combinación con diferentes ARLs	124
3. Efecto del bloqueo de TIM-3 en la restauración de la actividad CTL de las células T CD8 ⁺ y NK	127
3.1. Modelos <i>in vitro</i>	128
3.1.1. Co-cultivo de células T CD4 ⁺ t y células T CD8 ⁺	128
3.1.2. Co-cultivo de células T CD4 ⁺ t y células NK	129
3.1.3. Co-cultivo de células T CD4 ⁺ t, células T CD8 ⁺ y células NK	130
3.1.4. Co-cultivos de células T CD4 reposo latentemente infectadas y células TCD8 ⁺	131
3.2. Modelo <i>ex vivo</i>	132
3.2.1. Características de los pacientes	132
3.2.2. Co-cultivo de células T CD4 ⁺ t, células T CD8 ⁺ y células NK	133
4. Evaluación del bloqueo TIM-3 y uso de Gal-9	134
4.1. Modelos <i>in vitro</i>	135
4.1.1. Co-cultivo de células T CD4 ⁺ t y células T CD8 ⁺	135
4.1.2. Co-cultivo de células T CD4 ⁺ t y células NK	136
4.1.3. Co-cultivo de células T CD4 ⁺ t, células T CD8 ⁺ y células NK	137
4.1.4. Co-cultivos de células T CD4 reposo latentemente infectadas y células T CD8 ⁺	142
4.2. Modelo <i>Ex vivo</i>	143
4.2.1. Co-cultivo de células T CD4 ⁺ t, células T CD8 ⁺ y células NK	143
DISCUSIÓN	153
1.Toxicidad Gal-9 y α -TIM-3	155
2.Reactivación de VIH-1 mediada por Gal-9 en el sistema celular Jurkat-LAT-GFP	156

3.Reactivación de VIH-1 mediada por Gal-9 en modelos de latencia en células T CD4 ⁺ basado en IL-7	156
4.Evaluación del bloqueo de la unión de Gal-9 a TIM-3 en la restauración de la actividad CTL de los linfocitos T CD8 ⁺ y las células NK	160
4.1. Modelo <i>in vitro</i>	160
4.1.1. Co-cultivo de células T CD4 ⁺ t y células T CD8 ⁺	161
4.1.2. Co-cultivo de células T CD4 ⁺ t y células NK	162
4.1.3. Co-cultivo de células T CD4 ⁺ t, células T CD8 ⁺ y células NK	163
4.2. Modelo <i>ex vivo</i>	163
4.2.1. Co-cultivo de células T CD4 ⁺ t, células T CD8 ⁺ y células NK	163
5. Determinación de citoquinas en los co-cultivos	164
CONCLUSIONES	169
BIBLIOGRAFÍA	175

FIGURAS

Figura 1. Genoma VIH. A)VIH-1. B)VIH-2

Figura 2. Ciclo biológico VIH

Figura 3. Principales santuarios anatómicos del VIH-1

Figura 4. Contribución de los subconjuntos de células T CD4⁺ al reservorio de VIH-1 durante TAR

Figura 5. Establecimiento del reservorio latente

Figura 6. Progresión de células T naïve a células T agotadas

Figura 7. Estrategia “*shock and kill*”

Figura 8. Localización y secreción subcelular. Tipos de galectinas

Figura 9. Funciones de las galectinas

Figura 10. Secreción de citoquinas.

Figura 11. Regulación de monocitos/macrófagos y células dendríticas según las diferentes galectinas.

Figura 12. Activación de neutrófilos, eosinófilos y mastocitos

Figura 13. Funciones de Gal-9

Figura 14. Modulación de Gal-9 en las células T

Figura 15. Gal-9 en patogénesis viral

Figura 16. Representación esquemática de la estructura de las proteínas TIM

Figura 17. Estimulación de la activación y expresión de las células T mediante la unión de TIM-4 a TIM-1

Figura 18. Dominio IgV de TIM-3 ratón

Figura 19. TIM-3 en autoinmunidad

Figura 20. TIM-3 en enfermedades crónicas

Figura 21. Funciones inmonomoduladoras que media Gal-9 en la infección por VIH-1

Figura 22. Genoma VIH-1 en las células Jurkat-LAT-GFP

Figura 23. Vector pNL4.3

Figura 24. Esquema extracción de ADN plasmídico

Figura 25. Esquema de la realización del modelo de latencia

Figura 26. Esquema de la extracción de ADN con el kit QuiAmp DNA blood mini[®] (Qiagen)

Figura 27. Esquema de los pasos seguidos en los experimentos de co-cultivo *in vitro*

Figura 28. Esquema de los pasos seguidos en los experimentos de co-cultivo *ex vivo*

Figura 29. Imágenes de toxicidad en células VERO con Gal-9 a diferentes concentraciones

Figura 30. Imágenes de toxicidad en células VERO con α -TIM-3 a diferentes concentraciones

Figura 31. Reactivación de VIH-1 en las células Jurkat-LAT-GFP

Figura 32. Reactivación de VIH-1 en el modelo de latencia basado en IL-7

Figura 33. Reactivación de VIH-1 en un modelo de latencia basado en IL-7 mediado por Gal-9 en combinación con tunicamicina

Figura 34. Reactivación de VIH-1 en modelos de latencia basado en IL-7 mediada por diferentes ARLs

Figura 35. Reactivación de VIH-1 en modelos de latencia basado en IL-7 mediada por la combinación sencilla de ARLs

Figura 36. Reactivación de VIH-1 en modelos de latencia basado en IL-7 mediada por la combinación múltiple de ARLs

Figura 37. Co-cultivo de células T CD4⁺ y células T CD8⁺. Efecto del bloqueo de TIM-3

Figura 38. Co-cultivo de células T CD4⁺ y células NK. Efecto del bloqueo de TIM-3

Figura 39. Co-cultivo de células T CD4⁺ y células T CD8⁺. Efecto del bloqueo de TIM-3

Figura 40. Co-cultivo células T CD4⁺ latentemente infectadas con células T CD8⁺. Efecto del bloqueo de TIM-3

Figura 41. Media reducción de Agp24 (log), día 7 y día 10. Efecto del bloqueo de TIM-3

Figura 42. Co-cultivo de células T CD4⁺t y células T CD8⁺. Efecto del bloqueo de TIM-3 y uso de Gal-9

Figura 43. Co-cultivo de células T CD4⁺t y células NK. Efecto del bloqueo de TIM-3 y uso de Gal-9

Figura 44. Co-cultivo de células T CD4⁺t, células T CD8⁺ y células NK. Efecto del bloqueo de TIM-3 y uso de Gal-9

Figura 45. Citoquinas analizadas en los sobrenadantes de los co-cultivos CD4⁺t:CD8⁺.

Figura 46. Citoquinas analizadas en los sobrenadantes de los co-cultivos CD4⁺t: NK.

Figura 47. Citoquinas analizadas en los sobrenadantes de los co-cultivos CD4⁺t:CD8⁺: NK

Figura 48. Co-cultivo células T CD4⁺ latentemente infectadas con células T CD8⁺. Efecto del bloqueo de TIM-3 y uso de Gal-9

Figura 49. Media reducción de Agp24 (log), día 7 y día 10. Efecto del bloqueo de TIM-3 y uso de Gal-9

Figura 50. Citoquinas analizadas en los sobrenadantes de los co-cultivos CD4⁺ t:CD8

Figura 51. Citoquinas analizadas en los sobrenadantes de los co-cultivos CD4⁺ t:CD8

Figura 52. Citoquinas analizadas en los sobrenadantes de los co-cultivos CD4⁺ t:CD8

Figura 53. Citoquinas analizadas en los sobrenadantes de los co-cultivos CD4⁺ t: NK

Figura 54. Citoquinas analizadas en los sobrenadantes de los co-cultivos CD4⁺ t:CD8⁺: NK

Figura 55. Citoquinas analizadas en los sobrenadantes de los co-cultivos CD4⁺ t:CD8⁺: NK

TABLAS

Tabla 1. Genes de VIH-1. Adaptado de Guía práctica del SIDA 2013.

Tabla 2. Expresión inhibitoria del receptor en numerosos tipos de células inmunes.
Expresión y función de los receptores inhibidores

Tabla 3. Agentes reactivadores de la latencia. Mecanismo de acción

Tabla 4. Distribución de galectinas según tejidos y especies

Tabla 5. A) Combinación de los diferentes ARLs. B) Concentración empleada de los ARLs

Tabla 6. Cebadores utilizados para cuantificar la integración del DNA

Tabla 7. Características de los pacientes incluidos en el estudio

Abreviaturas

ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADNc: ADN complementario

Agp24: Antígeno p24

ARL: Agente Reactivador de la Latencia

ARN: Ácido Ribonucleico

Bry: Briostatina

CBA: Cytometric Bead Array

CCR5: Virus CCR5 trópico

CD4⁺ t: Células T CD4⁺ totales

CEIC: Comité Ético de Investigación Clínica

CRD: Dominio de reconocimiento de carbohidratos, del inglés Carbohydrate Recognition Domain

CTL: Linfocitos T citotóxicos, del inglés Cytotoxic T Lymphocytes

CTLA-4: Antígeno 4 del Linfocito T citotóxico, del inglés Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4

CV: Carga Viral

CXCR4: Virus CXCR4 trópico

DMSO: Dimetilsulfóxido

EDTA: Ácido etilendiamino tetraacético, del inglés ethylenediaminetetraacetic acid

ELISA: Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas, del inglés Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

Gal: Galectina

GALT: Tejido linfático asociado al tracto gastrointestinal, del inglés Gut-Associated Lymphoid Tissue

GFP: Proteína verde fluorescente, del inglés Green Fluorescent Protein

HDAC: Inhibidores de las histonas desacetilasas

IFN: Interferon

IgSF: Superfamilia de la Inmunoglobulinas

IgV: Dominio variable

IL: Interleuquina

LAG-3: Gen 3 de activación de linfocitos, del inglés Lymphocyte-activation gene 3

LCR: Líquido cefalorraquídeo

Log: Logaritmo

LTR: Repetición terminal larga, del inglés Long Terminal Repeat

Min: Minutos

Abreviaturas

mL: Mililitros

MVC: Maraviroc

NFAT: Factor nuclear de células T activadas, del inglés nuclear factor of activated T cells

NF- κ B: Factor nuclear kappaB, del inglés Nuclear Factor KappaB

ng: Nanogramo

NK: Célula Natural Killer

nM: Nanomolar

PBMC: Células mononucleares de sangre periférica, del inglés Peripheral Blood Mononuclear Cells

PBS: Tampón fosfato salino, del inglés Phosphate Saline Buffer

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa, del inglés Polymerase Chain Reaction

PD-1: Molécula de muerte programada

pg: Picogramo

PHA: Fitohematoglutinina, del inglés Phytohemagglutinin

PKC: Proteína quinasa C

PMA: Éster de forbol, del inglés Phorbol Myristate Acetate

RMD: Romidepsina

RPMI: Medio Roswell Park Memorial Institute, del inglés, Roswell Park Memorial Institute medium

SNC: Sistema Nervioso Central

TAR: Terapia antirretroviral

TIGIT: Inmunorreceptor de células T con dominios Ig e ITIM

TIM-3: Proteína 3 que contiene el dominio de la mucina y el dominio inmunoglobulina de los linfocitos T

TNC: Tunicamicina

TNF: Factor de necrosis tumoral, del inglés Tumor Necrosis Factor

VIH: Virus de la Inmunodeficiencia Humana

Vor: Vorinostat

VPA: Ácido Valproico

mg: Microgramo

μ L: Microlitro

Introducción

1. OBSTÁCULOS PARA LA ERRADICACIÓN DEL VIH

1.1. El virus de la inmunodeficiencia humana. Agente etiológico del síndrome de inmunodeficiencia adquirida

El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) es el agente causal del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). Es un virus que pertenece a la familia de los retrovirus humanos (familia *Retroviridae*), dentro de la subfamilia Lentivirus.

En 1981, en Estados Unidos se diagnosticaron cinco casos de neumonía producida por *Pneumocystis carinii* y poco después se detectaron casos de sarcoma Kaposi o candidiasis de las mucosas, siempre en homosexuales aparentemente sanos. Todas estas infecciones estaban asociadas a una inmunodeficiencia severa (1,2). Pero no fue hasta 1983, en Francia, cuando se aisló el virus y se le identificó como agente causal del sida por el grupo de los Dres. Luc Montagnier y Françoise Barré-Sinoussi (3).

Se han identificado 2 tipos de VIH: VIH-1 (3), la causa más frecuente de SIDA en el mundo, y VIH-2 (4), que difiere en su estructura genómica y antigenicidad, de menor patogenicidad y localizado principalmente en África occidental (5) (Figura 1).

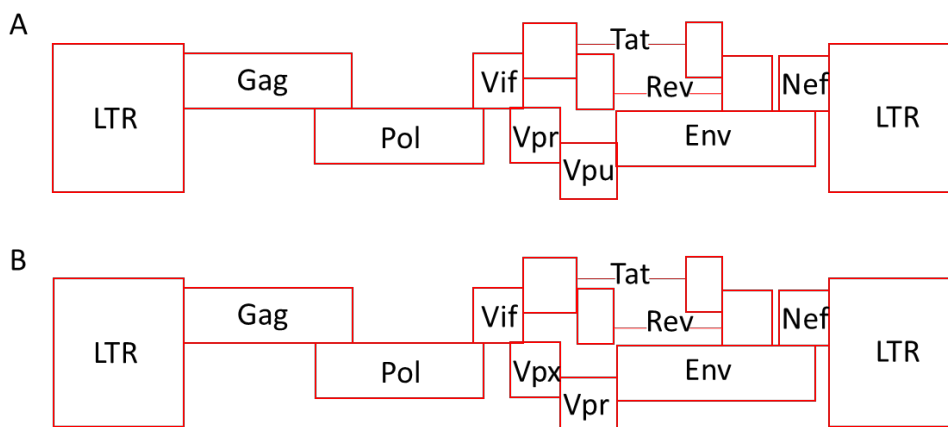


Figura 1. Genoma VIH. A)VIH-1. B)VIH-2. Adaptado de (6)

Se trata de un virus con envoltura icosaédrica, que contiene dos cadenas idénticas de ARN (ácido ribonucleico) dentro de un núcleo de proteínas víricas y rodeadas de una capa fosfolipídica derivada de la membrana de la célula anfitriona, pero que incluye proteínas de

membrana codificadas por el virus. Los genes que codifican las proteínas virales se dividen en (1) genes estructurales que son: el gen *env* que codifica las glicoproteínas de la envuelta (gp120 que permite la inserción al unirse con el receptor CD4 y CCR5/CXCR4 y gp41 que permite la fusión y penetración en las células del sistema inmune), el gen *gag* codifica las proteínas de la matriz y la proteína p24 de la cápside y el gen *pol* codifica las enzimas responsables de la transcripción inversa, integración y el procesamiento de los precursores proteicos y (2) genes reguladores que son *tat*, *rev*, *nef*, *vif*, *vpr*, y *vpu* los cuales participan en la regulación de la expresión génica (7). Estos 9 genes imprescindibles para el ciclo de replicación vírica se encuentran flanqueados por las LTR (repeticiones terminales largas, del inglés Long Terminal Repeat) (Tabla 1).

	Genes	Proteínas	Funciones
Genes estructurales	<i>env</i>	gp160	Proteína precursora
		gp120	Interacción con los receptores celulares
		gp41	Fusión de membrana celular y viral
	<i>gag</i>	p55	Proteína precursora
		p24	Proteína de la cápside
		p17	Proteína de la matriz
		p7	Proteína de la nucleocápside, facilita la transcripción inversa
		p6	Proteína de la nucleocápside, participa en la encapsidación
	<i>pol</i>	Retrotranscriptasa	Retrotranscripción del genoma viral
Integrasa		Integración del genoma retrotranscrito	
Proteasa		Procesamiento de las proteínas Gag-Pol	
Genes reguladores	<i>tat</i>	Tat	Transactivador
			Elongación del ARNm
	<i>rev</i>	Rev	Regulación del transporte del ARNm del núcleo al citoplasma
			Procesamiento del ARNm
	<i>nef</i>	Nef	Regulación negativa de CD4 y MHC I
			Aumento de la infectividad
			Inducción de apoptosis en células T CD8+ citotóxicas
	<i>vif</i>	Vif	Incremento de la infectividad viral
			Induce la degradación de APOBEC
	<i>vpr</i>	Vpr	Transporte del complejo preintegración
Transactivador viral			
Detiene el ciclo celular en la fase G2			
<i>vpu</i>	Vpu	Aumenta la liberación de viriones	
		Degradación de CD4 en el retículo endoplásmico	

Tabla 1. Genes de VIH-1. Adaptado de Guía práctica del SIDA 2013.

El ciclo biológico del VIH-1 se divide en una etapa temprana y una etapa tardía, que contienen una serie de puntos importantes que pueden ser usados como blancos potenciales para la acción terapéutica. La fase temprana comienza con la unión de la partícula viral a la superficie celular, su fusión e internalización. El provirus integrado puede permanecer en estado de latencia dentro del genoma celular mediante factores tanto virales como celulares o puede iniciar la expresión viral. La fase tardía del ciclo comienza con la transcripción del ADN integrado que requiere la activación de la célula infectada. El ciclo finaliza con la liberación de nuevos viriones (Figura 2).

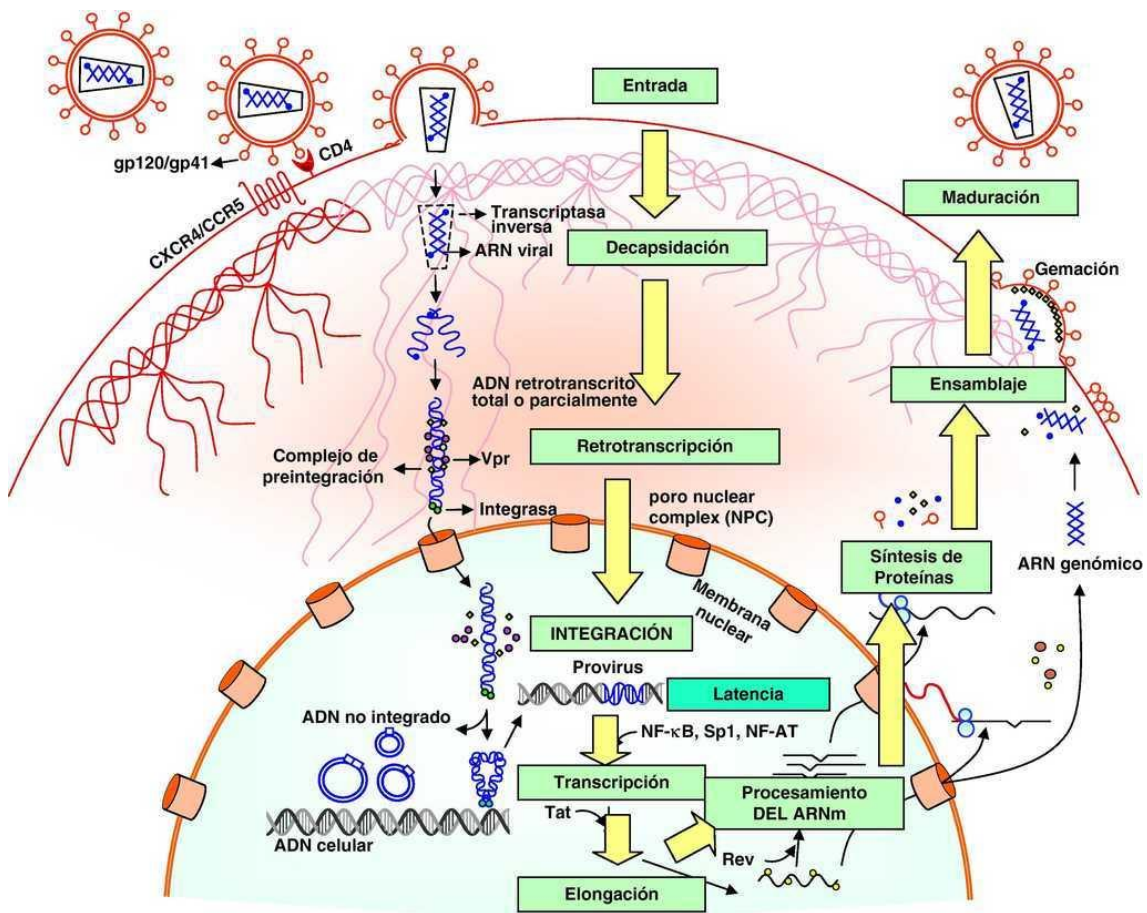


Figura 2. Ciclo biológico VIH. (8)

1.2. Importancia epidemiológica de la infección por el VIH-1

En el mundo y en España, la infección por VIH-1 constituye un problema sanitario de gran importancia debido a diferentes motivos: 1) Es un problema de Salud Pública, por tratarse de una enfermedad transmisible que afecta a personas previamente sanas, 2) En España, afecta a más de 150.000 personas y el número de personas sigue aumentando (aproximadamente 4.000 diagnósticos nuevos al año), 3) La mortalidad sigue siendo significativa (2% al año), 4) Aunque la medicación utilizada es altamente efectiva no está exenta de problemas importantes (toxicidad, resistencias, adherencia), 5) La carga económica asociada a la enfermedad es muy elevada, con un presupuesto global para afrontar este problema de hoy a 2031 estimado en 397-727 billones de dólares americanos.

El programa Conjunto de las Naciones Unidas sobre el VIH-1/SIDA (ONUSIDA) estima que, en el 2017, el número total de personas en el mundo viviendo con el VIH-1 era de 36,9 millones (31,1–43,9 millones), además se ha dado 1,8 millones (1,4–2,4 millones) de nuevos casos de infección por el VIH-1 (9).

Debido a estos motivos desde hace años se plantea la búsqueda de métodos curativos de la infección por VIH-1. Sin embargo, desde la introducción de los tratamientos de alta eficacia en 1996, la demostración de un reservorio de células latentemente infectadas por VIH cuestionó esta posibilidad. Hoy se admite que los principales obstáculos para la erradicación del VIH-1 incluyen (1) replicación residual, (2) reservorios anatómicos, (3) reservorios celulares latentemente infectados y (4) agotamiento inmunológico.

1.3. Replicación residual del VIH-1

El TAR (tratamiento antirretroviral de alta eficacia) es altamente efectivo en cuanto al control de la replicación vírica, pero es ineficaz en la eliminación de las células infectadas que contienen VIH-1 latente. La persistencia viral se produce tras un tratamiento inicialmente exitoso donde los pacientes tratados presentan unos niveles indetectables de ARN viral (≤ 50 copias ARN de VIH-1/mL) (9). Estos niveles de viremia no provocan una resistencia a los fármacos ni el fracaso del TAR. Sin embargo, la indetectabilidad de la carga viral plasmática no impide que pueda haber replicación vírica persistente,

fundamentalmente en lugares extraplasmáticos, en tejidos, lo que constituiría un obstáculo para la erradicación del VIH-1 (10). Además, la supresión a largo plazo de la replicación del VIH-1 no impide que persistan ciertas anomalías inmunológicas, como un alto número de linfocitos T activados y quizás disfuncionales (11).

El VIH-1 se replica rápidamente en individuos infectados. La mayor parte de esta replicación vírica tiene lugar en los linfocitos T CD4⁺ activados de sangre periférica y en el tejido linfoide. Se han observado 3 fases en pacientes tratados con potentes combinaciones de fármacos antirretrovirales: una primera fase donde se produce una disminución de la productividad de las células infectadas, a continuación, una disminución de las células de larga duración como macrófagos unidos a tejidos y finalmente una disminución de las células infectadas como son los linfocitos T CD4⁺ en reposo (9).

Se ha demostrado que existe replicación residual tanto en las células latentes como en las células infectadas que se encuentran en tejidos donde el TAR no alcanza concentraciones adecuadas. En la mayoría de los pacientes tratados correctamente con TAR, se detectan niveles muy bajos de ARN viral (con límite de detección inferior a 1 copia/mL), muy por debajo del umbral de detección de las técnicas habitualmente usadas en el seguimiento y que define la carga viral indetectable (< 20-50 copias de ARN de VIH-1/mL). Este bajo nivel de viremia no contribuye al desarrollo de resistencias ni al fracaso del TAR, pero puede ser señal de una replicación vírica persistente y ser, por tanto, un obstáculo adicional para la erradicación del VIH-1 (10).

Además, en diferentes estudios se ha demostrado que el virus no desarrolla resistencia a los fármacos antirretrovirales ya que la baja concentración de estos fármacos en los santuarios anatómicos no es suficiente para conferir una ventaja competitiva del virus (12). Sin embargo, es importante conseguir una farmacocinética óptima y una distribución de los fármacos antirretrovirales en zonas donde no se alcanzan concentraciones óptimas para conseguir suprimir la replicación viral y preservar la función inmune.

Actualmente no se conoce el origen del virus detectable. Podría proceder de los reservorios donde el virus permanece de forma latente o bien de la replicación residual no suprimida por TAR (13).

1.4. Santuarios anatómicos

Los principales santuarios anatómicos de células infectadas son el tejido linfoide: tracto genital y GALT (Tejido Linfoide Asociado al Tracto gastrointestinal) y órganos no linfoides como son el SNC (Sistema Nervioso Central) y los riñones (Figura 3).

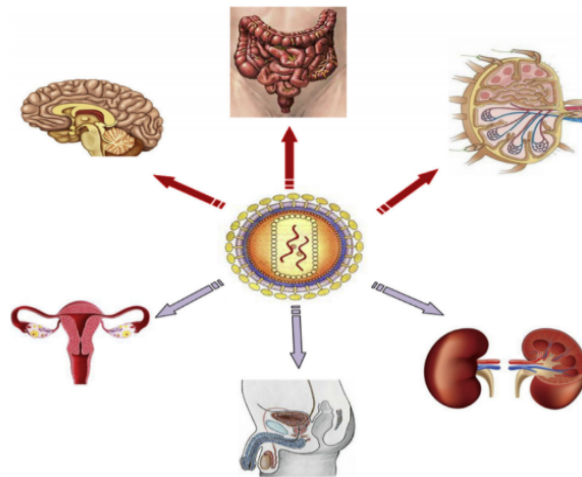


Figura 3. Principales santuarios anatómicos del VIH-1 (14).

El VIH-1 infecta principalmente a las células T CD4⁺ y células de la línea mieloide, pero es importante considerar que las células T CD4⁺ circulantes comprenden <2% del número total de linfocitos (15). Si la replicación residual del VIH persiste en pacientes con TAR con niveles de virus en plasma <20-50 copias/ml, es muy probable que esto involucre reservorios de tejidos (16). Los santuarios tisulares que presentan una baja penetración de TAR pueden provocar una propagación viral limitada a niveles insuficientes para permitir una resistencia a los fármacos (16). Además, existe una variación en la distribución de los subconjuntos de células T, por lo que cada uno de estos factores puede contribuir a la complejidad de los reservorios de VIH en personas con TAR.

GALT representa el santuario anatómico más importante debido a que es uno de los órganos linfoides más grande del cuerpo y presenta el 60% de los linfocitos de los cuales el 40% son células T CD4⁺. Además es uno de los primeros objetivos de la infección por VIH-1, siendo las células T CD4⁺ de la mucosa intestinal más susceptibles a la infección por VIH-1 y soportar niveles más altos de replicación viral (16–19). En el intestino la alta frecuencia de activación

celular podrían favorecer la replicación viral residual incluso después del TAR durante un tiempo prolongado (14).

Las células T CD4⁺ también se encuentran en los ganglios linfáticos donde hay una concentración de VIH mayor que en la sangre periférica (20).

En cuanto al SNC el virus es capaz de infectar diferentes tipos de células como astrocitos, células neurales fetales, microglía y células endoteliales del cerebro. Se ha detectado VIH-ADN (ácido desoxirribonucleico) y ARN en el cerebro de pacientes con y sin tratamiento localizado principalmente en macrófagos, células microgliales y astrocitos (16,21,22). En varios estudios se ha observado que los virus presentes en el cerebro y en LCR (líquido cefalorraquídeo) presentan mutaciones de resistencia al fármaco que no se encontraban en la sangre (23,24).

El tracto genital masculino y femenino podría ser un reservorio importante. En cuanto al tracto genital masculino se ha observado que infectan diferentes tipos de células y en algunos de estos estudios sugieren la compartimentación viral (25–27). En el tracto genital femenino se puede detectar virus en células cervicales y en secreciones genitales (28). Al igual que en el tracto genital masculino, en el femenino se sugiere una compartimentación de las poblaciones virales entre la sangre y los órganos genitales femeninos (29).

También se ha observado la importancia como potencial reservorio anatómico de los riñones, los pulmones y el hígado (30–32).

El principal obstáculo para la erradicación de VIH-1 en los reservorios anatómicos se debe a no alcanzar las concentraciones adecuadas para inhibir la replicación viral, dada la escasa penetración de los fármacos antirretrovirales. Esto podría producir una replicación constante a pesar de las concentraciones indetectables de virus en sangre periférica.

1.5. Reservorio celular latente

La latencia viral es un estado reversible de infección no productiva de las células. La integración del ADNc (ADN complementario) viral en las células huésped es un paso esencial en el ciclo de vida permitiendo la persistencia de los genomas virales durante la vida de las células infectadas en las que establece un estado de infección latente (33).

El reservorio celular latentemente infectado es actualmente el principal obstáculo para lograr la erradicación del VIH. El reservorio celular está compuesto fundamentalmente por células T CD4⁺ memoria en reposo latentemente infectadas que presentan el ADN del VIH-1 integrado y transcripcionalmente silente (34,35). Las células que albergan VIH-1 integrado son las células T CD4⁺ de memoria y las células T CD4⁺ de memoria transicional. También parece que las células T naïve (células que nunca han estado en contacto con el antígeno correspondiente) y, menos probablemente, las células progenitoras multipotentes en médula ósea podrían formar parte del reservorio celular latente. Se han identificado, por último, las llamadas células madre de memoria T que representan el estadio más temprano y de mayor duración de las células T memoria. Al tener características similares a las células madre, el VIH-1 puede usar su maquinaria para generar una persistencia viral a largo plazo (36).

Existen otros tipos celulares que podrían formar parte del reservorio como son los macrófagos y los monocitos, (35,37). Diferentes estudios han comprobado que los monocitos activados/macrófagos, después de las células T CD4⁺ son la principal fuente de producción de viremia residual, durante el TAR indefinido (35,38,39).

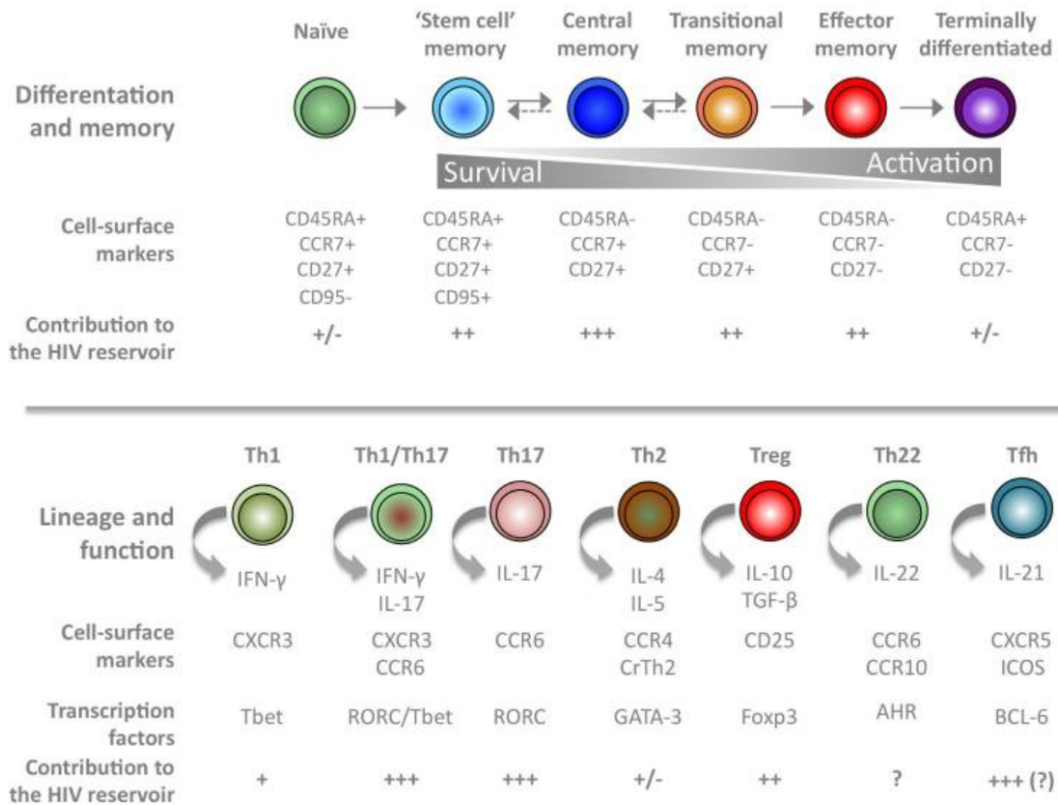


Figura 4. Contribución de los subconjuntos de células T CD4⁺ al reservorio de VIH-1 durante TAR. Los subconjuntos de células T CD4⁺ se pueden clasificar según su diferenciación y estado de memoria (arriba) o según sus funciones efectoras (abajo). Los marcadores de la superficie celular y la producción de citocinas específicas pueden usarse para identificar cada subconjunto individual. Se indica la contribución relativa de cada subconjunto al reservorio de VIH-1 (40)

Las células latentemente infectadas no son reconocidas por el sistema inmune al no tener ningún marcador que lo identifique como célula infectada, ya que presentan una mínima expresión de los genes VIH-1 o de sus proteínas. En sangre periférica, aproximadamente una de cada millón de células T CD4⁺ de memoria en reposo albergan virus con replicación competente (35) Estos niveles son probablemente mayores en ciertos tejidos (41). Diferentes estudios concluyen que el VIH-1 puede utilizar las características especiales de estas células para promover la persistencia viral a largo plazo (36).

1.5.1. Establecimiento y mantenimiento de la latencia

Una de las hipótesis de cómo se establece un estado de latencia se basa en la fisiología de las células T CD4⁺. Las células T CD4⁺ en respuesta al antígeno experimentan una proliferación y diferenciación celular dando lugar a células efectoras. Gran parte de estas células efectoras mueren rápidamente, pero un pequeño grupo sobrevive y vuelve a un estado G0 en reposo, persisten como células de memoria que son susceptibles a la infección por VIH, y por lo general mueren como resultado de los efectos citopáticos. Sin embargo, algunas células T CD4⁺ activadas pueden infectarse y sobrevivir un tiempo suficiente para volver a un estado de reposo. En estado latente, el virus persiste simplemente como información integrada en el genoma de la célula y por lo tanto no se ve afectado por los medicamentos antirretrovirales o las respuestas inmunitarias (33).

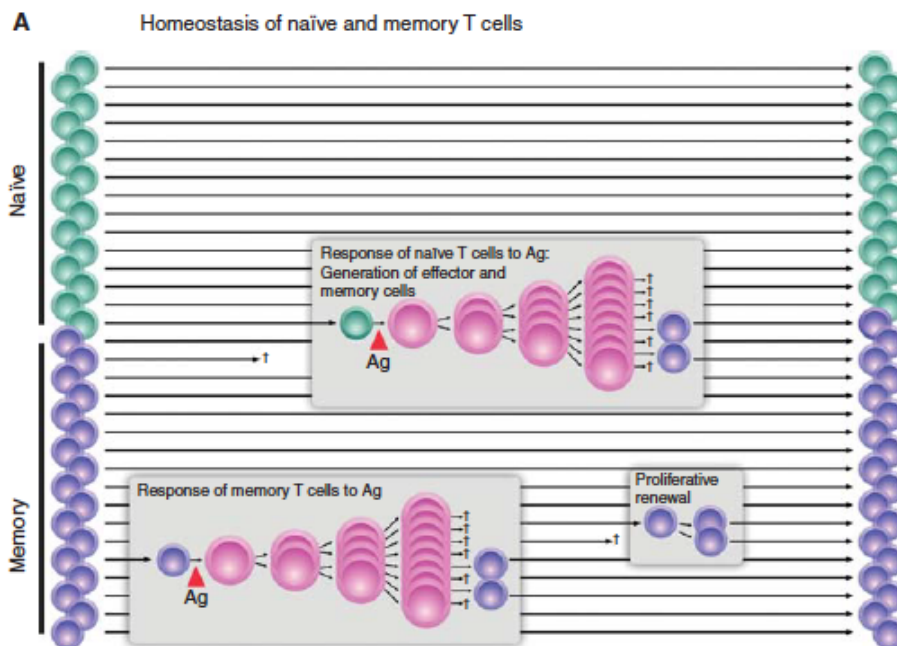


Figura 5A. Establecimiento del reservorio latente. Generación de las células T CD4⁺ de memoria. Una fracción de las células T CD4⁺ que responden a un antígeno dado sobrevive y vuelve a un estado de reposo como células T de memoria de larga duración. (33).

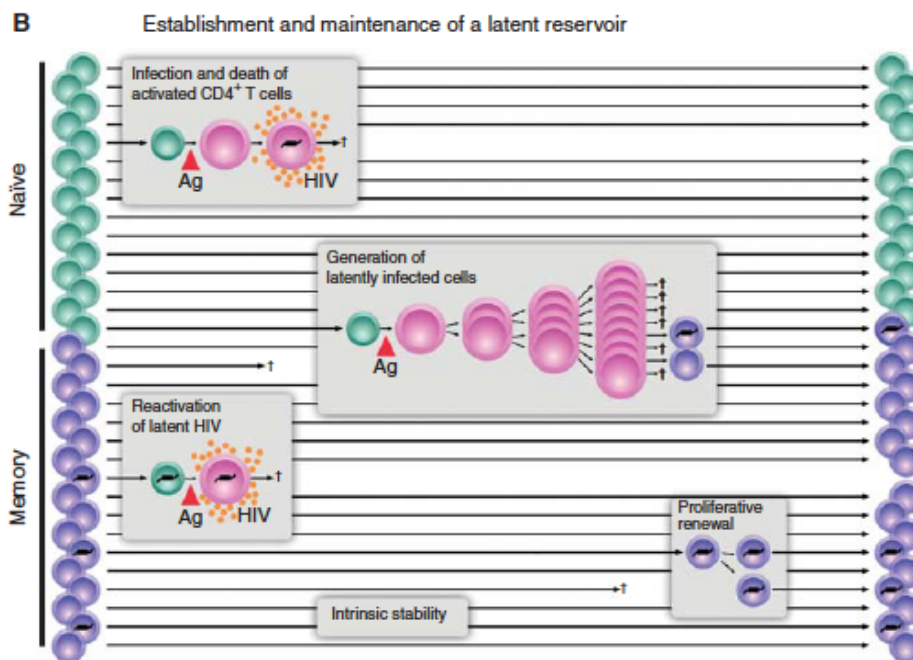


Figura 5B. Establecimiento del reservorio latente. Generación de células infectadas de forma latente. La latencia se establece cuando las células T CD4⁺ activadas se infectan y sobreviven el tiempo suficiente para volver a un estado de memoria en reposo que no es permisivo para la expresión del gen viral. (33).

Sin embargo, si la célula latentemente infectada se activa, esta latencia puede revertirse y comienza el ciclo biológico del virus, infectando nuevas células.

La transcripción del ADN del VIH se regula por las mismas vías que regulan la transcripción del ADN del huésped. Existen 3 mecanismos para el mantenimiento del reservorio celular latentemente infectado:

1. Por niveles insuficientes de factores de transcripción del huésped como PTEFB, NF- κ B, NFAT, STAT5, proteínas Tat viral y factores del hospedador asociados a Tat junto con la presencia de reguladores transcripcionales negativos como homodímeros NF- κ B1 (42)
2. Proliferación homeostática. En la activación celular se liberan diferentes interleuquinas que favorecen la división celular. Tras la división, una de las células entra en apoptosis y la otra que contiene el provirus en su genoma, cumple su

función. En diferentes estudios se muestra que las células con expansión clonal podrían contener virus con replicación competente (43,44).

3. Reguladores negativos de la activación de células T. Diferentes estudios han demostrado que células con los receptores en superficie PD-1, CTLA-4, TIGIT, TIM-3, LAG3, CD160 y CD2B4 tienen más probabilidad de estar en estado de latencia, por una regulación negativa de la replicación (45).

Una vez que se genera el reservorio celular latente, el provirus se queda silenciado en presencia de TAR, pudiendo recuperar su poder replicativo cuando el TAR es suspendido, produciendo elevados niveles de CV (carga viral) en plasma.

1.6. Agotamiento inmunológico

El término “agotamiento inmunológico” se define por la pérdida de funciones efectoras y capacidad proliferativa de las células T de memoria. Mediante una respuesta inmune adaptativa, las células T naïve se activan mediante células presentadoras de antígenos. Esta activación provoca una proliferación y una adquisición de funciones efectoras, con cambios en el fenotipo de superficie que reflejan el estado de activación. La activación crónica por antígenos víricos provoca que algunas células T activadas persistan, pero no responden funcionalmente a la estimulación de antígenos. El mecanismo que conduce a este proceso, denominado agotamiento inmunológico, no se conoce (46).

La infección por VIH-1 provoca una disminución de la función citopática de las células T CD8⁺, provocando una inadecuada respuesta por anticuerpos (47). Además, dado que los pacientes con TAR a largo plazo no tienen la replicación viral suficiente para estimular una fuerte respuesta de células T CD8 CTL (Linfocitos T citotóxicos, del inglés Cytotoxic T Lymphocytes) específicas frente al VIH-1, los mecanismos celulares para la eliminación del virus pueden ser insuficientes.

Aunque el agotamiento celular puede llevar a la muerte a las células T, la función efectora se puede revertir (48).

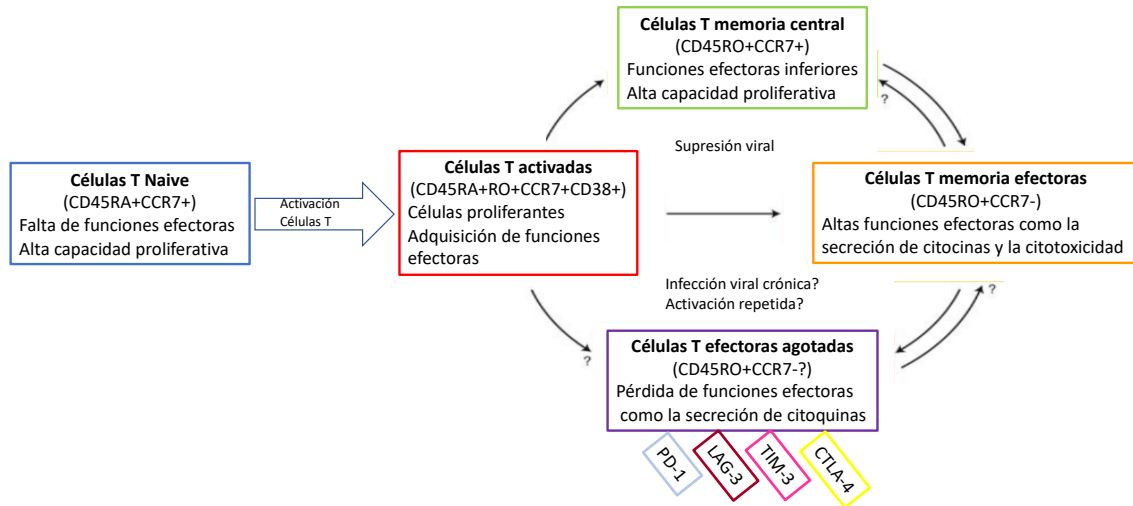


Figura 6. Progresión de células T naíve a células T agotadas. Tras la activación por un antígeno, una célula T naíve se activa, comienza a proliferar y adquiere funciones efectoras. La célula activada se diferencia en célula T de memoria efectora con potencial citotóxico y funciones efectoras o células T de memoria de larga vida con funciones efectoras bajas, pero con la capacidad de proliferar rápidamente tras la estimulación repetida. La exposición antigénica persistente y la activación repetida pueden provocar el agotamiento de las células T efectoras con pérdida de las funciones efectoras y capacidad proliferativa. Adaptado de (46).

El agotamiento celular viene marcado por la expresión o sobreexpresión de una serie de marcadores celulares. Los más conocidos son: PD-1, CTLA-4, LAG-3, TIM-3 y TIGIT.

PD-1: es la proteína encargada de la muerte celular programada. Es un regulador negativo, juega un papel importante en el equilibrio entre la activación de las células T y la tolerancia. Se expresa en células T CD4⁺, células T CD8⁺, células NK y monocitos (49). Se une a los ligandos PD-L1 expresados en células presentadoras de antígenos, células T y células no hematopoyéticas y PD-L2 en células dendríticas y macrófagos (49). Cuando PD-1 se une a PDL-1 se produce una señal inhibitoria en los receptores antigénicos dependientes, por lo que se impide la señal necesaria para la proliferación, función efectiva y la replicación del VIH-1 (14).

CTLA-4: es un regulador negativo. Los estudios sobre el papel de CTLA-4 en infecciones crónicas han dado diversos resultados. En estudios con ratones, CTLA-4 afectó la eliminación de patógenos como *Helicobacter pylori* (50), *Leishmania* (51) y *Trypanosoma* (52). Sin

embargo en infecciones de ratones con el virus de la coriomeningitis, se demostró que CTLA-4 no estaba involucrado en el agotamiento de las células T CD8⁺ (53).

En infecciones por VIH-1, los primeros estudios demostraron que CTLA-4 estaba sobreexpresada en las células T CD4⁺ y su expresión estaba correlacionada inversamente con el recuento de CD4⁺(54). En estudios con pacientes infectados con VIH-1 en diferentes etapas de la infección, CTLA-4 estaba regulada positivamente en las células CD4⁺ en todas las categorías de individuos, excepto en los controladores de élite, pero no se expresó en CTL específicos de VIH-1 (55). La expresión de CTLA-4 se correlaciona con marcadores de progresión de la enfermedad, directamente con la carga viral e indirectamente con el recuento de células (56).

LAG-3: ligando MHC de clase II, se expresa en células T activadas y agotadas. Se ha demostrado que LAG-3 inhibe los flujos de calcio asociados con la señalización de TCR y frena la producción de citoquinas (57). El interés de LAG-3 creció cuando se descubrió que está regulado positivamente en las células T CD8⁺ antivirales durante la infección crónica por el virus de la coriomeningitis linfocitaria (LCMV) y está asociado con la coexpresión de PD-1 (58). Se ha demostrado que LAG-3 por sí sólo no puede producir el agotamiento de las células T, pero puede cooperar con otros receptores inhibidores influyendo en el grado de agotamiento (59).

TIGIT: se expresa en células T CD4⁺, CD8⁺ y células NK. Interviene con la activación inmune de varias maneras. La expresión de TIGIT en las células NK, inhibe la citotoxicidad al interrumpir la polarización de los gránulos citotóxicos, además puede inhibir la producción de IFN- γ en este tipo de células. Se expresa en las células T reguladoras y en las células T memoria, donde aumenta su expresión con la activación (60). La expresión de TIGIT en las células T durante la infección de VIH-1 se correlaciona con la progresión de la enfermedad (61).

TIM-3: proteína 3 que contiene el dominio de la mucina y el dominio inmunoglobulina de los linfocitos T. Nos centraremos en esta proteína en el apartado 4 de la introducción.

	PD1	CTLA-4	TIM-3	LAG-3	TIGIT
Células T CD4+	Células activadas y agotadas	Expresadas tras activación	Media la eliminación de	Expresado en un subconjunto	Expresado en células T reg
	Células T reguladoras	Compite con la señalización de CD28	las células activadas	de células CD25-T reg	y de memoria.
	Células Th	Crítico para la función de las células T regs			La expresión aumenta con la activación
Células T CD8+	Células activadas y agotadas	Expresado en la activación, pero	Coexpresado con PD-1	Deterioro de la función en las	Coexpresado con PD-1 en VIH
	Inhibe funciones	no tan alto como en CD4 +	en VIH, VHC y VHB	células T CD8 agotadas y las	Se correlaciona con la progresión
			Media la eliminación de células activadas	células T antitumorales	
Células B	Células B naive de memoria y en reposo	Expresión en células B activadas de una manera dependiente de T	No expresado	Expresión en células B activadas de una manera dependiente de T	No expresado
	Inhibe la activación				
Células NK	Expresado en un subconjunto de células NK maduras en individuos con HCMV,	Expresado en células NK IL-2	Expresado en células NK maduras	Marcador de maduración de células NK.	Expresado en células NK maduras inhibe la citotoxicidad
	Asociado con pérdida de función		Mejora IFNg.	Suprime la citotoxicidad	
			Puede inhibir la citotoxicidad.		

Tabla 2. Expresión inhibitoria del receptor en numerosos tipos de células inmunes. Expresión y función de los receptores inhibidores PD-1, CTLA-4, Tim-3, LAG-3 y TIGIT en células T CD4⁺ y CD8⁺, células B y células NK. (60)

2. ESTRATEGIAS PARA LA CURACIÓN

2.1. Inicio del tratamiento precoz

Diferentes estudios han puesto de manifiesto la importancia del inicio del TAR durante la infección aguda del VIH-1 en los reservorios y persistencia virales. Entre los posibles beneficios del inicio precoz del TAR cabe destacar una disminución de la activación de las células T, así como una reducción en los reservorios virales (62).

Uno de los ejemplos que muestra los beneficios logrados tras TAR precoz es el del caso de la “niña del Mississippi” infectada por el VIH-1. El TAR se inició a las 30 horas de nacer de una madre infectada, se consiguió una supresión viral de 27 meses tras la suspensión del TAR, con rebrote posterior (63). Este caso sugiere que el inicio muy temprano de TAR daría lugar a una curación funcional.

En un estudio francés perteneciente a la cohorte ANRS EP47 VISCONTI (64), 14 pacientes que iniciaron TAR en las primeras etapas de la infección aguda lograron una curación funcional después de una interrupción del tratamiento de unos seis años (denominados controladores post-tratamiento). Los pacientes presentan un tamaño de reservorio viral extremadamente pequeño del mismo nivel que en el caso de los controladores de élite.

Sin embargo, existen estudios con resultados contradictorios (65–67), por ejemplo, en uno de ellos, observaron que el control del virus después de la interrupción del tratamiento no era duradero en la mayoría de los pacientes tratados durante la infección aguda (68).

2.2. Intensificación del TAR: eliminación de la replicación persistente

La intensificación del TAR consiste en aumentar los niveles de fármacos antirretrovirales establecidos o añadir agentes más potentes lo que podría ayudar a reducir el tamaño del reservorio celular. El objetivo de la intensificación del TAR es lograr la supresión completa de la replicación persistente (42).

El tratamiento de intensificación no ha mostrado reducir el tamaño del reservorio VIH-1 o prevenir el rebrote viral tras la supresión del TAR, pero algunas investigaciones presentan resultados muy positivos frente a eliminar la replicación. Entre los fármacos empleados para este fin se encuentra el inhibidor de la integrasa del VIH-1 raltegravir, que se ha visto que podría tener efectos beneficiosos en la velocidad de eliminación del reservorio de VIH-1 (69). En otros estudios se mostró la acumulación transitoria del ADN episomal con 2-LTRs, reducción de marcadores de activación de las células T CD8⁺ y la reducción de ARN viral en el íleon, lo que sugiere una inhibición de la replicación vírica (70–74).

Otro de los fármacos estudiados para la intensificación del TAR es el antagonista del correceptor CCR5, maraviroc (75,76). Se observó una disminución del reservorio celular latente y un incremento de la viremia residual tras 48 semanas de intensificación. Maraviroc, además de ser un agente antirretroviral, presenta actividad antilatencia, ya que puede unirse al receptor CCR5 estimulando la cascada de señalización intracelular dando lugar a la producción del factor de transcripción NF-κB y a la transcripción del VIH-1 latente (77,78).

Por otro lado, TAR podría ser incapaz de penetrar por completo en todos los tejidos (79). La persistencia de la replicación del VIH-1 a nivel tisular justifica los esfuerzos para optimizar la administración de los fármacos con el fin de mejorar la penetración en los diferentes tejidos (80).

2.3. Eliminar reservorios anatómicos

Eliminar los reservorios anatómicos como estrategia para erradicar el VIH-1 no ha sido de los más estudiados, únicamente el SNC. El cerebro actúa como un reservorio de VIH aislado e independiente del resto de reservorios durante el TAR (12,81), basándose en la diferencia entre las secuencias virales en plasma y LCR (82). Además, la penetración de los fármacos antirretrovirales es escasa en el SNC (83), por lo que se consigue un descenso lento de los niveles de VIH en LCR, sugiere que el reservorio de VIH a nivel cerebral se mantiene debido a los macrófagos/microglía y no tanto por las células T CD4⁺ dado el bajo nivel de este tipo de células (84,85).

El cerebro es uno de los órganos más difíciles de estudiar en individuos infectados por VIH-1, debido a la disponibilidad limitada de muestras. Los primates no humanos siguen siendo el modelo animal más representativo y mejor caracterizado para la neurogénesis del VIH-1 hasta la fecha. El modelo de macaco cola de cerdo con una enfermedad del SNC asociada al SIV proporciona una oportunidad para estudiar y desarrollar marcadores pronósticos de trastornos neurocognitivos asociados al VIH-1 (86). En este estudio se demostró que la compartimentalización del cerebro como reservorio desarrollaba daños neurológicos, y tras la administración de fármacos antilantencia (un activador de PKC y un inhibidor de histona desacetilasa), originó en unos de los animales un incremento de la activación inmune en el cerebro (neopterina y CCL2), un incremento de marcadores de daño neuronal y un aumento de la carga viral en plasma y LCR, mientras aun recibía TAR. Además, se encontró SIV transcrito en macrófagos CD68 (posiblemente células de la microglía). De esta manera se confirmó que el virus podía ser reactivado tanto desde el plasma como desde los tejidos, incluido el cerebro. Los biomarcadores de los trastornos neurocognitivos asociados al VIH-1 son útiles para predecir el desarrollo de esta enfermedad y ser utilizado en el entorno clínico.

La evidencia de que el SNC alberga genoma de SIV latente después de recibir TAR a largo plazo muestra el papel del cerebro como un potente reservorio viral, que debería tenerse en cuenta a la hora de intentar estrategias curativas. El incremento de la activación del sistema inmune en el cerebro podría originar una reactivación de los reservorios latentes seguido de una respuesta inflamatoria exacerbada y dañina incluso en presencia de TAR. Teniendo en cuenta que el SNC presenta macrófagos con replicación competente persistente, la monitorización de la activación viral en LCR y la viremia residual podría ser clave a la hora de aplicar estrategias de erradicación (81).

2.4. Trasplante de médula ósea y terapia génica

La terapia génica consiste en sustituir las células infectadas con una nueva población de células resistentes al VIH-1. Se basa en el éxito obtenido con el trasplante de médula ósea de un donante homocigótico con la delección del correceptor CCR5 (CCR5 Δ 32). Se realizó por primera vez en un paciente conocido como “el paciente de Berlín”, en el que se consiguió

remisión completa, sin rebrote viral desde 2007 en ausencia de TAR. Este paciente se ha convertido en el primer ejemplo de erradicación del VIH-1 (87–89).

Años después del primer caso de erradicación, se ha logrado reproducir la experiencia. En un estudio reciente (90), se ha mostrado que la remisión del VIH-1 puede ser posible con un enfoque menos agresivo y tóxico. Un paciente infectado con VIH-1 se sometió a un trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas para el linfoma de Hodgkin utilizando células de un donante CCR5 Δ 32/ Δ 32. El TAR se interrumpió 16 meses después del trasplante y la remisión del VIH-1 se mantuvo durante otros 18 meses. Las células T CD4⁺ aisladas de sangre periférica después del trasplante no expresaron CCR5 y solo fueron susceptibles al virus trópico CXCR4 *ex vivo*. Sin embargo las respuestas de las células T CD8⁺ específicas de VIH-1 se perdieron tras el trasplante, mientras que las respuestas específicas de citomegalovirus si se detectaron. Los anticuerpos específicos del VIH-1 cayeron a niveles comparables a los del paciente de Berlín. Con estos resultados es prematuro concluir que este paciente se ha curado tras 18 meses de la interrupción del TAR, pero los datos sugieren que un solo trasplante de células hematopoyéticas con donante CCR5 Δ 32 homocigóticas podría lograr la remisión del VIH-1, a diferencia del paciente de Berlín donde se realizó dos trasplantes de células.

Debido al éxito de esta intervención, se empezó a realizar diversos estudios de modificaciones genéticas en las células propias del individuo para dotar a esas células de resistencia frente al VIH-1. Algunas de las estrategias son la supresión del gen que codifica el receptor CCR5 (91) o la introducción de genes que codifican proteínas anti-VIH (92). Las nuevas técnicas buscan inhibir o eliminar la expresión de CCR5 empleando el silenciamiento génico de CCR5 mediante nucleasas de dedos de zinc (ZFNs), nucleasas efectoras con función activador de transcripción (TALENs, transcription activator-like effector nuclease) y endonucleasas celulares (CRISPR-Cas9/ clustered regularly interspaced short palindromic repeats) (93).

2.5. Eliminar el reservorio celular latente. Agentes reactivadores de la latencia

El objetivo de los ARL (Agente Reactivador de la latencia) es activar la replicación viral y producir la división celular en las células latentemente infectadas y constituye uno de los principales esfuerzos para la erradicación del VIH. Este tipo de estrategia se denomina “activar y matar” (“shock and kill”, en su denominación original en inglés). La primera parte consiste en reactivar las células latentemente infectadas mediante ARL (*shock*). Esto supondría una liberación de nuevas partículas virales y una expresión de antígenos que serán reconocidos por el sistema inmune (*kill*) (94) (Figura 7).

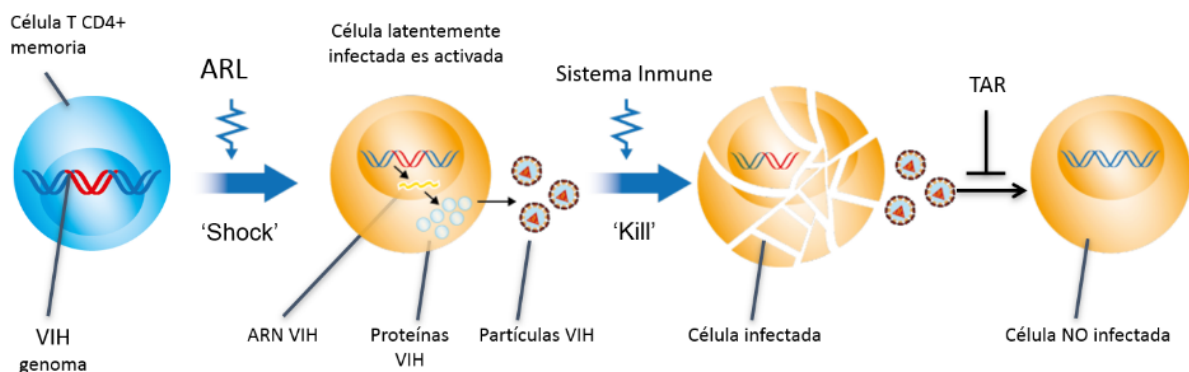


Figura 7. Estrategia “shock and kill”. Adaptado de (94)

Se había asumido que, tras la activación celular, la respuesta inmune sería lo suficientemente potente como para acabar con las células reactivadas. De manera que un contexto de reactivación mediante un ARL y con TAR, las partículas virales serían eliminadas por éste y las células reactivadas eliminadas por la respuesta CTL. Sin embargo, esto no es así por la baja potencia inmunológica (95).

Existen diferentes tipos de ARL cuyo mecanismo de acción puede ser por varias vías de señalización (Tabla 3).

Los HDAC (inhibidores de las histonas desacetilasas) se han estudiado intensamente como terapias contra el cáncer, por lo que se conoce de ellos una gran variedad de sus propiedades farmacológicas y toxicológicas. El primero en evaluarse fue el ácido valproico

(VPA), con el que observaron que en pacientes con TAR intensificada se producía una disminución significativa de células T CD4⁺ latentemente infectadas en tres de cada cuatro pacientes (96). Sin embargo, estudios posteriores contradecían estos resultados (97), debido a que VPA es un HDAC relativamente débil. Por otro lado, con Vorinostat se demostró que fue capaz de activar la transcripción del virus latente *in vitro* (11,98). En cuanto a estudios *in vivo* también se demostró la reactivación del virus en células T CD4⁺ de memoria en reposo (99). Sin embargo, existe cierta evidencia de que después de la administración de vorinostat *in vitro*, las células T CD4⁺ en reposo que producen virus no se someten al proceso de apoptosis, incluso en presencia de linfocitos T citotóxicos (95). Por lo tanto, la reactivación del virus por los inhibidores de la HDAC no parece suficiente para la eliminación de las células infectadas y sería necesario combinarlo con otras estrategias.

En estudios donde han combinado inhibidores de HDAC e inhibidores de histona metiltransferasa se ha visto que mejora la reactivación del virus (100–102). Sin embargo, la investigación de los inhibidores de histona metiltransferas aún se encuentran en una etapa preliminar.

Los activadores de la proteína quinasa C (PKC) tienen un papel importante en la activación transcripcional en las células T. La activación de PKC induce la activación del virus latente a través de las vías de señalización NF- κ B y AP-1. Los más conocidos son PMA, Prostatina y Briostatina-1. Sin embargo, aunque PMA reactiva el virus e induce la liberación de citoquinas es altamente tóxico, siendo un promotor de tumores, y por lo tanto no es adecuado para su uso en clínica. La prostatina induce la transcripción del VIH-1 latente en células mononucleares de sangre periférica en individuos infectados con TAR (103,104). La Briostatina-1 se ha demostrado que es un potente reactivador de la latencia en comparación con otros fármacos, y puede ser seguro si se administra a pacientes a dosis adecuadas (105).

Otros reactivadores de latencia importante de mencionar es Maraviroc, antagonista del receptor de quimioquinas CCR5 que a su vez es utilizado por el VIH-1 como correceptor para su entrada a la célula. Cuando se emplea maraviroc en un TAR supresivo se observó una caída del reservorio celular, un aumento de la viremia plasmática y el ADN episomal con 2-LTRs (78,106).

Sin embargo, la potencia de los fármacos antilatenencia es insuficiente para reducir el reservorio. En los ensayos clínicos llevados a cabo en humanos, la administración de fármacos aislados no tuvieron efecto en la frecuencia de las células infectadas latentes (107,108).

Fármacos	Mecanismo de acción	Intensidad
Agentes inductores de NF-κB		
Anti-CD3/CD28	Activación del receptor de células T	++++
TNF-α	Activador del receptor TNF	++
Prostatina, PMA, Briostatina, Picolog	Activador de la proteína C Kinasa	+++
Inhibidores de HDAC		
Vorinostat	HDAC clase 1, 3, 4 y 6 y frenadores del ciclo celular: bajan Myc y suben p21 Especies reactivas de oxígeno: suben apoptosis Angiogénesis: HIF α, VEGF baja Inmunidad innata, baja citoquinas proinflamatorias, STAT 5 hiperacetilación.	++
Romidepsina	Inhibidor de HDAC 1, 2, 4 y 6	+++
Panobinostat, givinostat y belinostat	Disminución de potencia: LBH589, ITF2357, PXD101, SAHA, VPA	+++
Inhibidores Sirtuin	Acetilación de las proteínas no histonas: Tat HIV, RelA p65, p53 y FOXO3a	No probado
Inhibidores HMT		
BIX-01294	Inhibidor de G9a (HEK9me2)	++
Chaetocin	Inhibidor de SUV39H (HEK9me3)	++
Moléculas de diferenciación celular y pro-apoptóticas		
JQ1	Bloqueo de las uniones TAT para pTEFb Inhibe el dominio bromo del lectro BRD4, reclutamiento de H-K9ac, H4k16ac Disminuye transcripción myc Aumenta SIRT	+
Nutlin	Bloquea MSM2 Transcripción de p53, activación de la caspasa	No probado
Disulfiram, aphidicolin	Aumento del estrés oxidativo y apoptosis	++
HMBA, dactinomicina, aclarubicin y cytarabine	P-TEF-b liberado asociado con RNAP II que permite elongación transcripcional	+
Moduladores inmunes		
Anti-PD1, CTLA-4, anticuerpo monoclonal TIM-3	Bloqueo de los receptores de regulación negativa	Anti-PD1 (ACTG 5301)
Anticuerpo monoclonal anti PD1 e IL15	STAT5, señalización PI3k, diferenciación de las células T CD4+ efectoras de memoria	No probado
Vacuna terapéutica de células T CD4+ y raltegravir	Reactivación del virus en células CD4 antígeno-específico latentemente infectadas y limitan la extensión del reservorio viral	No probado
Combinación sinérgica		
Vorinostat y chaetocin, Vorinostat y prostatina	Inhibidor de HMT e inhibidor HDAC. Inductor de NF-κB e inhibidor de HDAC	+++
Inhibidor de HDAC y anti-PD1	Inhibidor de HDAC y anti-PD1 mAb	Estudios pre-clínicos
Anticuerpo monoclonal anti PD1 e IL15, Raltegravir y peptidomiméticos	Diferenciación de las células T CD4 efectoras de memoria. Inhibidor de la integrasa. LEDGF/p75	No probado

Tabla 3. Agentes reactivadores de la latencia. Mecanismo de acción. Adaptado (74).

2.6. Mejorar el agotamiento inmunológico

Como se ha visto en diferentes estudios basados en la estrategia de *Shock and Kill*, la potencia de la respuesta CTL-VIH-1 específica es insuficiente para la eliminación de las células en las que ha sido reactivado el virus latente. Esto hace que se tenga que buscar estrategias que mejoren este agotamiento inmunológico. Como se ha comentado en el apartado “1.6. Agotamiento inmunológico”, existen diferentes receptores que resultan ser marcadores de agotamiento funcional. En diferentes estudios se ha comprobado que bloqueando estos receptores se puede mejorar la respuesta CTL.

En estudios *in vivo* con el virus de coriomeningitis linfocítica en ratones, se bloqueó la vía PD-1: PD-L1 y este bloqueo condujo a un aumento en el número y funcionalidad de las células T CD8 específicas del virus y a un aumento del control de la infección (53). Otros modelos con infección viral también apoyaron el papel importante para la vía PD-1: PD-L1 para la regulación de las respuestas de las células T antivirales (109). El bloqueo *in vitro* de PD-1: PD-L1 revirtió el agotamiento de las células T específicas de VHB y VHC y la capacidad proliferativa de estas células T mejoró drásticamente (110). En modelos de ratón humanizado con infección de VIH, el bloqueo de PD-1 redujo considerablemente la carga viral y aumento el número de células T CD8 (111). En monos infectados por SIV, el bloqueo de PD-1 provocó un aumento de las células T antivirales en sangre y en el intestino, además de aumentar la expresión de moléculas efectoras y citoquinas (112). Debido a estos resultados, se sugiere PD-1 como un importante regulador del agotamiento de las células T durante la infección crónica, y por lo tanto un importante objetivo terapéutico.

Los fármacos que bloquean CTLA-4 ya están en uso en pacientes con cáncer (113). Sin embargo, el uso de estos fármacos en pacientes infectados con VHC o VHB se ha visto limitado debido a lesiones hepáticas asociadas con la inhibición de CTLA-4 (114), pero se observó una bajada de la carga viral en las muestras analizadas, por lo que se requiere más investigación para determinar la seguridad del bloqueo de CTLA-4 en pacientes infectados con VHB y VHC.

La alta expresión de CTLA-4 en la infección por VIH-1 se correlaciona con una progresión de la enfermedad y con un aumento de agotamiento en las células (55), por lo que el bloqueo

de CTLA-4 debería mejorar la inmunidad de estos pacientes. CTLA-4 se expresa en las células T CD4⁺ infectadas, el bloqueo de este receptor también podría aumentar la replicación viral al activar las células T infectadas e inducir su proliferación. En estudios realizados con SIV, el bloqueo de CTLA-4 durante la infección aguda aumentó la replicación viral en la mucosa y provocó un aumento en la expresión de factores inmunosupresores, lo que resultó en una inmunidad anti-SIV y una respuesta pobre a la vacunación terapéutica (115). Sin embargo, el bloqueo de CTLA-4 en infecciones crónicas fue beneficioso, reduciendo la carga viral y la expresión de factores inmunomoduladores (112). Por lo tanto, es importante el momento en el cual se realiza el bloqueo de CTLA-4, siendo en este caso, más positivo en una infección crónica. Se necesita investigar profundamente si el tratamiento para bloquear CTLA-4 aumenta la replicación viral en pacientes con VIH o mejora la inmunidad, controlando la infección.

El bloqueo único de PD-1 y CTLA-4 ha demostrado una actividad antitumoral en diferentes tipos de neoplasias. Sin embargo, los pacientes que responden bien a este tratamiento son pocos, por lo que es necesario mejorar estas opciones. Debido a esto se plantea realizar estudios con un doble bloqueo de estos receptores. Por ejemplo, en el cáncer de próstata, el bloqueo único tiene un bajo nivel de actividad, por lo que en este caso un bloqueo combinado podría mejorar la respuesta (116).

LAG-3, miembro de la superfamilia de inmunoglobulinas, se expresa principalmente en las células Th1 (59). El bloqueo de LAG-3 provoca una proliferación de las células T y un aumento de las citocinas Th1. En estudios de infección por LCMV, LAG-3 se expresa en células T específicas del virus, pero la inhibición de este receptor no mejoró la función de las células T ni disminuyó la carga viral, a diferencia de PD-1 (59). Sin embargo, el bloqueo de los dos receptores, dio como resultado una mejora sinérgica de las células T CD8⁺ específicas del virus y mejoró el control viral (58). En este mismo estudio analizaron la carga viral tras el bloqueo de los receptores de forma única o en combinación y se demostró que un bloqueo combinado disminuía significativamente la carga viral y con una mejora de las respuestas de las células T.

La expresión de TIGIT en células T en la infección por VIH se correlaciona con una progresión en la enfermedad y células agotadas. Además, la frecuencia de células T CD4⁺ TIGIT⁺ se

correlaciona con el contenido de ADN del VIH en las células T CD4⁺. En cuanto a las células T CD8⁺ en pacientes con VIH coexpresan PD-1 por lo que inhibe aún más la funcionalidad de las células. En un modelo de ratón con infección crónica por VIH-1, el bloqueo de TIGIT y PD-1 mejoró la respuestas de las células T (61).

3. GALECTINAS

3.1. Origen de las Galectinas

El descubrimiento de las galectinas (Gal) se llevó a cabo en los años 70 debido a numerosos estudios de embriogénesis y desarrollo. Sin embargo, fueron descritas por primera vez por Samuel H Barondes en el año 1994 (117,118) en una búsqueda para encontrar proteínas que descodificasen complejos de glucanos de la superficie celular (119). En su inicio, estas lectinas fueron descritas como proteínas independientes y nombradas de diversas formas en base a su función y su descubrimiento (electrolectina, CLL-I y II, L-14, L-29, L-31, CBP35 etc) (120). Estas proteínas pasaron a formar parte de la familia de las galectinas que conocemos actualmente, descritas en los 90, que abarca desde Gal-1 hasta Gal-15, y que presentan una distribución en tres subfamilias (121). Tiempo después se demostró que las galectinas se sintetizan como proteínas citosólicas, residen en el citosol o en el núcleo durante gran parte de su vida y alcanzan sus ligandos galactósidos, después de una secreción no clásica que evita el complejo de Golgi (122).

Actualmente, se definen las galectinas como una familia de proteínas de unión a carbohidrato, con una alta afinidad por la unión de polisacáridos del tipo β -galactósido. Se encuentran dentro de la familia de las lectinas de tipo "S".

3.2. Estructura y tipos

Las galectinas reconocen específicamente unidades repetitivas de disacáridos como N-acetilactosamina ($\text{Gal}\beta 14\text{-GlcNAc}$ o LacNAc), unidades de disacáridos ramificados del tipo N-acetilgalactosamina (GalNAc), ambos presentes en los N-glicanos, o bien otro tipo de formaciones repetitivas de disacáridos del tipo cadenas de poly-N-acetilactosamina presentes en N- y O-glicanos (glicanos unidos a proteínas por residuos de asparagina o de serina respectivamente), (123). La afinidad de unión de las galectinas a este tipo de sacáridos es directamente proporcional a la cantidad de LacNAc y GalNAc que contengan los N-glicanos (123,124). Estas uniones se realizan a través de un dominio de 135 aa y 15 kDa de peso molecular (peso variable de las distintas galectinas). Este dominio altamente conservado se conoce como CRD (Dominio de Reconocimiento de Carbohidratos, del inglés

Carbohydrate recognition domain). Tiene una estructura β -laminar compuesta por 11 láminas β ligeramente dobladas y situadas de forma antiparalela, 5 de ellas forman un lado convexo (F1-F5), y las otras 6 un lado cóncavo (S1-S6). Es ésta última la parte encargada de unir carbohidratos (125,126).

La nomenclatura de las galectinas se sistematizó en 1994 (117). El primer tipo de galectina recibió el nombre de Galectina-1 y todos los demás miembros de esta familia fueron numerados consecutivamente por orden de descubrimiento. En la siguiente figura se muestra una lista de las galectinas (122) (Tabla 4).

Galectina	Distribucion tisular en humanos y roedores	Especies
Gal-1	Expresado en diferentes tejidos y tipos celulares	Vertebrados
Gal-2	Tracto gastrointestinal y placenta	Pájaros y mamíferos
Gal-3	Expresado en diferentes tejidos y tipos celulares, especialmente en macrofagos y células epiteliales	Vertebrados
Gal-4	Intestino, estomago, células epitelio uterino, paredes vasos sanguíneos, hipocampo, neuronas	Vertebrados, excepto pajaros
Gal-5	Pulmón, riñon, reticulocitos, médula ósea y eritrocitos	Ratas
Gal-6	Tracto gastrointestinal, hígado, riñon, bazo y corazón	Ciertas cepas de raton
Gal-7	Tracto gastrointestinal, piel y corazon fetal	Mamíferos
Gal-8	Hígado, riñon, músculo cardíaco, pulmón y cerebro	Vertebrados
Gal-9	Linfocitos T, intestino, hígado, células epitelio uterino, epidermis, epitelio esofágico	Vertebrados
Gal-10	Eosinófilos	Primates,murciélagos
Gal-11	Mucosa y placenta	Primates, rumiantes
Gal-12	Tejido adiposo	Vertebrados
Gal-14	Eosinófilos	Rumiantes
Gal-15	Útero	Rumiantes

Tabla 4. Distribución de galectinas según tejidos y especies. Adaptado (122).

Según su número de CRD y su organización, las galectinas se clasifican en tres grupos:

1. Galectinas prototipo (*proto-type*): Galectinas -1,-2,-5,-7,-10,-11,-13,-14 y -15. Estas proteínas presentan un solo dominio en CRD y pueden formar homodimeros, reconocen estructuras simples de carbohidratos disacáridos (125).

2. Galectinas de tipo quimérico (*quimera-type*): Gal-3. Se caracteriza por tener un solo CRD en su extremo C-terminal y un polipéptido amino-terminal rico en residuos de prolina, glicina y tirosina, a través de los cuales se puede formar oligómeros (125).

3. Galectinas con repetición tipo tándem (*tandem-repeat*): Gal-4,-6, -8, -9 y -12. Se caracterizan por la presencia de dos dominios CRD dentro de la misma cadena polipeptídica, de forma que presentan una estructura bivalente, aunque cada CRD pueda reconocer estructuras sacarídicas sutilmente diferentes. Los dominios CRD se conectan por dominios de unión (*linker*), que aunque de función desconocida, se encuentran ampliamente conservados evolutivamente, lo que sugiere que su estructura y su disposición están íntimamente ligados al correcto funcionamiento de la proteína (125).

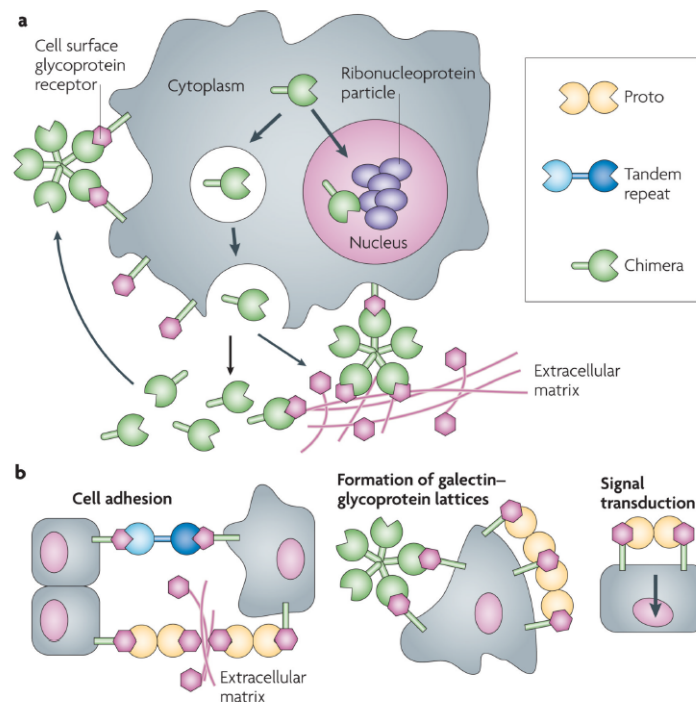


Figura 8. A) Localización y secreción subcelular. Tipos de galectinas: prototipo, quimérica y repetición en tándem. Desde el citosol, las galectinas pueden translocarse en el núcleo o en vesículas o pueden acumularse en zonas subcitosólicas. Una vez en el espacio extracelular pueden unirse a los glicanos de la superficie. B) Actividad de unión en la superficie y roles biológicos. Las galectinas secretadas pueden unirse a la superficie celular en cis o en trans y ejercer una variedad de funciones (127).

Todas las células expresan galectinas, pero el patrón de expresión varía entre los tipos de células y los tejidos.

3.3. Función

Las galectinas son proteínas ampliamente distribuidas en la naturaleza, y se expresan en múltiples órganos y tejidos, por lo que cumplen funciones fisiológicas esenciales (125,126).

Las galectinas ejercen sus efectos biológicos a través del reconocimiento de azúcares específicos en ligandos intracelulares, receptores de membrana y glicoproteínas extracelulares. A nivel intracelular pueden regular la traducción de ARN y la apoptosis mediante la unión de Gal-1 a las proteínas Ras, o la unión de Gal-3 a Bcl-2 y Gemin4 (128). También pueden mediar el ciclo celular mediante la regulación de receptores pro-apoptóticos y receptores de crecimiento (124). A nivel extracelular, pueden llevar a cabo procesos de inmunomodulación, como por ejemplo Gal-3 es capaz de promover la agregación de neutrófilos y fagocitos, Gal-1 estimula la producción del receptor de células T (TCR) que interviene en la respuesta inmune (129).

Las funciones biológicas son distintas según el tejido donde se exprese y la disponibilidad de ligando. De manera resumida, las funciones de las galectinas son: la regulación de la respuesta inmune (adhesión linfocitaria, producción de citoquinas y apoptosis), inflamación aguda y crónica, alergia, infecciones y enfermedades neoplásicas (Figura 9).

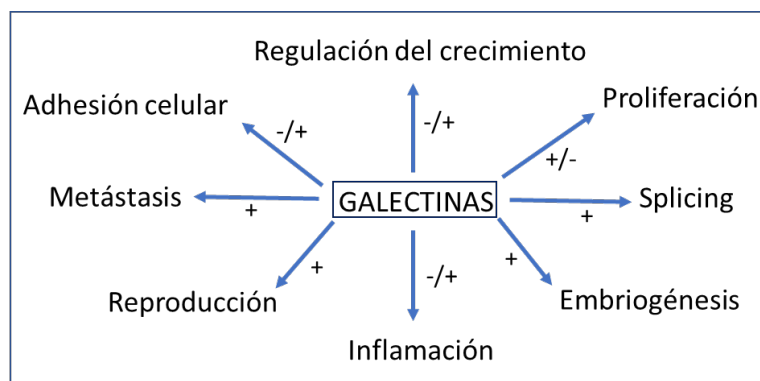


Figura 9. Funciones de las galectinas (130).

Por ejemplo, la adhesión y migración de células inflamatorias a través de la membrana basal y la matriz extracelular es un proceso formado por múltiples etapas y llevado a cabo por

diferentes glicoproteínas, enzimas, quimioquinas y citoquinas pro-inflamatorias. Las galectinas se secretan en este microambiente extracelular, donde reconocen terminales oligosacáridos de poli-N-acetil-lactosamina en componentes principales de la matriz extracelular. En función del reconocimiento de estas glicoproteínas, las galectinas están consideradas como potentes agentes moduladores de las interacciones entre células y matriz extracelular (130).

Otro de los papeles importantes de las galectinas se produce en la hemostasia. Varios estudios han demostrado que Gal-1 desencadena la activación y la agregación de plaquetas *in vitro* a través de interacciones con integrinas $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ (131). Además de regular la hemostasia, los diferentes miembros de la familia de las galectinas parecen jugar un papel crítico en la reparación de tejidos. Por ejemplo, Gal-7 en estudios realizados *in vitro* induce la migración celular y la proliferación para la curación de heridas (132).

En la reparación de lesiones, un componente importante es el desarrollo de vasos sanguíneos, donde las células endoteliales desempeñan un papel fundamental. Estas células expresan diferentes tipos de galectinas (Gal-1, Gal-3 y Gal-9), cuya activación aumenta la expresión de estas proteínas. Este aumento, puede regular las interacciones endoteliales con los leucocitos y la posterior extravasación de leucocitos. Las galectinas parecen impactar directamente en la regulación de la angiogénesis mediada por las células endoteliales (133–135).

Además de regular las vías de señalización en el citosol, las galectinas pueden modular las actividades nucleares dentro de la célula, por ejemplo Gal-1 y Gal-3 regulan el “splicing” del ARN (136). Debido a su papel importante en las actividades nucleares, incluida la regulación transcripcional, este proceso de “splicing” está altamente regulado (137).

Como se ha descrito anteriormente, las galectinas juegan un papel regulador importante clave en la inmunidad, hemostasia, señalización y viabilidad, por lo que no sorprenden que una expresión alterada de las galectinas provoque una progresión neoplásica. Por ejemplo una regulación positiva de Gal-3 reduce significativamente la sensibilidad celular a los estímulos apoptóticos (138,139). Por el contrario, la transformación neoplásica de las células epiteliales queratinizadas se produce debido a una regulación a la baja de Gal-7, lo

que concuerda con su capacidad para inducir apoptosis después de una lesión celular (140). Además, la desregulación de otras vías de galectina afecta la señalización celular, con un efecto significativo sobre el crecimiento celular y la progresión neoplásica (141). Varias galectinas, en particular Gal-3, parece comprometer las células neoplásicas circulantes y mejorar su extravasación, facilitando directamente la metástasis (142).

La concentración intracelular de galectinas en condiciones fisiológicas es 0.01 m(126), mientras que en situaciones patológicas o de estrés los niveles ascienden a 0.1 mM. La expresión de galectinas se modifica drásticamente en respuesta a diferentes agentes (productos de genes oncosupresores y oncogenes, agentes inflamatorios, activadores e infecciosos) (130).

Las galectinas son capaces de regular diferentes tipos de células:

1. Las galectinas no solo regulan la viabilidad de las células T sino también regulan la secreción y activación de las citoquinas. Pueden desempeñar papeles en la activación y diferenciación de las células B, células T y NK, como se muestra en la siguiente imagen (129).

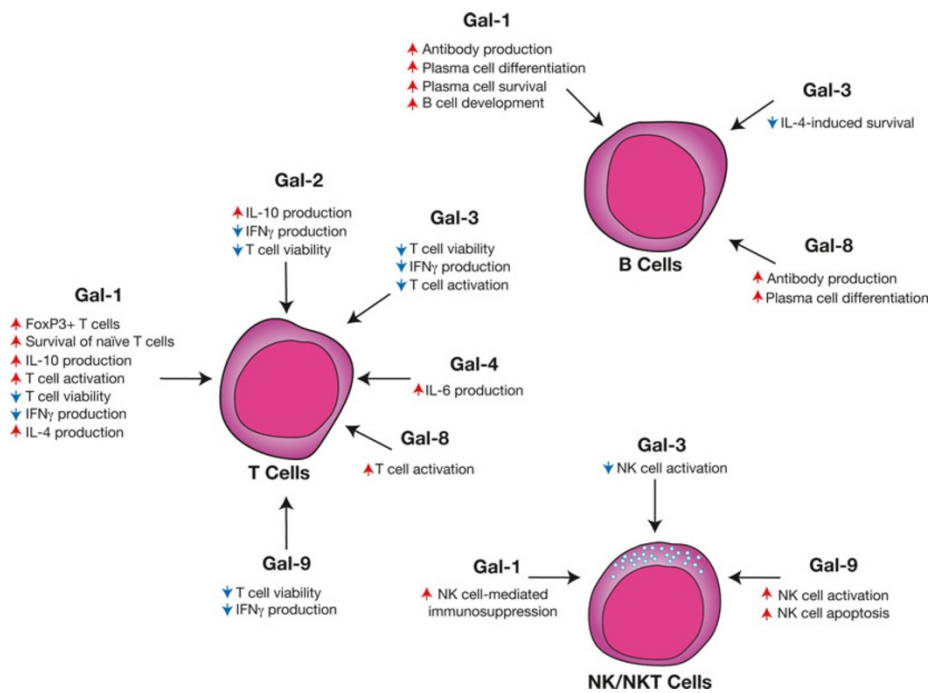


Figura 10. Secreción de citoquinas. (129).

2. Las galectinas regulan monocitos/macrófagos y células dendríticas. Pueden regular las actividades de estas células no solo en procesos de inflamación sino también en la inmunidad adaptativa. Pueden regular las interacciones de las células presentadoras de antígeno (129).

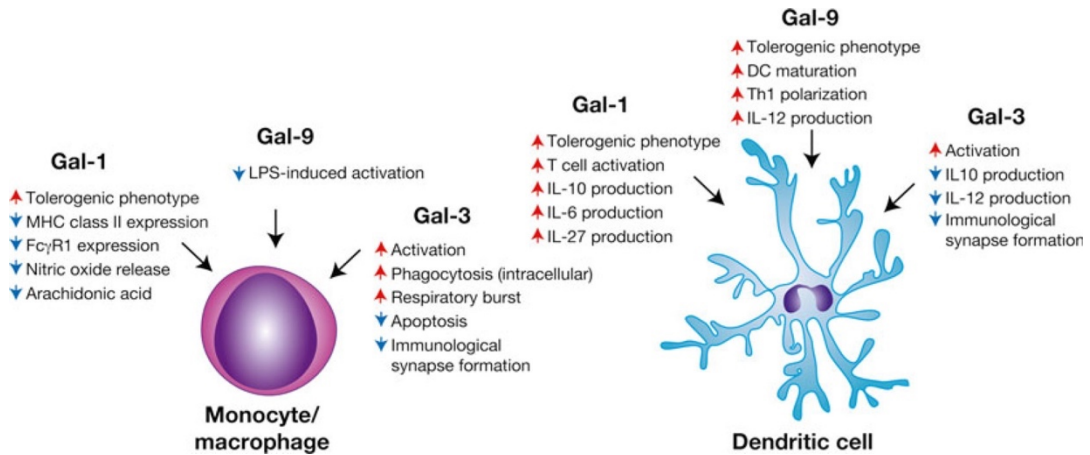


Figura 11. Regulación de monocitos/macrófagos y células dendríticas según las diferentes galectinas (129)

3. Por otro lado, las galectinas también son capaces de activar neutrófilos, eosinófilos y mastocitos, así como regular la quimiotaxis de estas poblaciones de granulocitos (129).

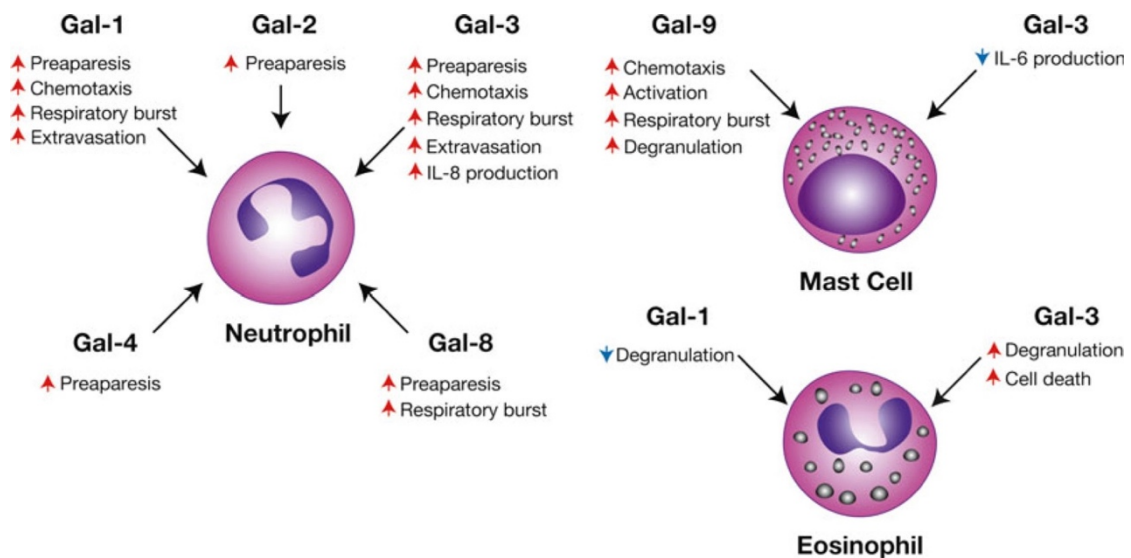


Figura 12. Activación de neutrófilos, eosinófilos y mastocitos. (129).

3.4. Galectina-9

Gal-9 fue descrita por tres grupos independientes. El primer grupo la definió como un autoantígeno derivado de tejido involucrado en el Linfoma de Hodgkin (143), el segundo como una ecalectina, un quimioatrayente y factor de activación de los eosinofilos (144), el tercero como un transportador de urato (145). Más tarde, estas tres proteínas fueron reconocidas como variantes de Gal-9.

Posteriormente, se demostró su participación en distintos procesos biológicos. Gal-9 está ampliamente distribuida en el organismo y se ha detectado en el hígado, intestino delgado, timo, riñón, bazo, pulmón, musculo cardiaco y esquelético y cerebro (146).

Se expresa en diferentes tejidos y células en seres humanos y ratones y puede localizarse en la membrana celular, citoplasma y núcleo. Es una molécula inmunomoduladora versátil que participa en una amplia gama de actividades biológicas tales como la adhesión celular y la migración, la proliferación, la apoptosis, la interacción con los patógenos microbianos, la diferenciación de las células T reguladoras, y las células dendríticas de maduración (DC) e inmunidad antimicrobiana. Gal-9 también ejerce funciones moduladoras esenciales en la biología de las células endoteliales y la angiogénesis (147). Además, Gal-9 puede interactuar con diferentes tipos de receptores entre ellos esta TIM-3 y por lo tanto producir diferentes funciones. Entre ellas, Gal-9 puede inducir el flujo de calcio intracelular, la agregación celular y la muerte de las células Th1, pero no de las células Th2. Este proceso depende de la presencia de TIM-3 en las células Th1, ya que se ha demostrado que las células Th1 deficientes en TIM-3 son relativamente resistentes a la muerte celular inducida por Gal-9 (148). La unión Gal-9: TIM-3 proporciona un circuito de retroalimentación negativo mediante el cual las células Th1 están reguladas para evitar respuestas Th1 no controladas.

3.4.1. Estructura y características bioquímicas de Gal-9

Gal-9 es una proteína de 34-39 KDa de tipo de repetición en tándem, presenta 2 CRD unidos por un polipéptido llamado "linker domain", cuya longitud puede ser variable generando

isoformas de Gal-9 y se une a diferentes unidades de glicano. Esta unión de CDR implica un papel regulador fundamental (149).

Ambos CDRs de Gal-9 están conectados por 14 a 56 aminoácidos, denominado “linker domain” (dominio de unión). Existen tres isoformas de Gal-9 llamados S, M y L (small, medium y long, constituido por 311, 323 y 355 aminoácidos). Esto confiere las diferentes propiedades funcionales de Gal-9. Estudios recientes han visto el papel de la región linker en las interacciones proteína-proteína, inserciones de membrana y regulación de las presentaciones de CDR. Por otra parte, estos linker domain están involucrados en el fortalecimiento de la señal mediante la interacción intermolecular de los CDRs y a través de la multimerización, lo que conduce a la formación de multimeros multivariantes que aumentan la formación de las uniones en la superficie celular. Así, los péptidos pueden dar propiedades multivalentes a Gal-9 que conducen a importantes funciones fisiológicas con una mayor potencia en comparación con las galectinas prototipo (149).

Las propiedades oligoméricas de Gal-9 agrupan módulos homo y heteroproteína-lípido, que pueden actuar de forma acumulativa como una unidad de señalización en diversas ubicaciones, como en la superficie, vesículas entocítica-exocítica, en la cromatina como un factor modificador de histonas, en la unión de dos o más células para las comunicaciones célula-célula y en los exosomas para la señal paracrina en la morfogénesis del tejido (149). Con todas estas propiedades multivalentes, Gal-9 participa en diferentes procesos biológicos, en el siguiente diagrama (Figura 13) se muestra los efectos de Gal-9 en las células y las posibles consecuencias (147).

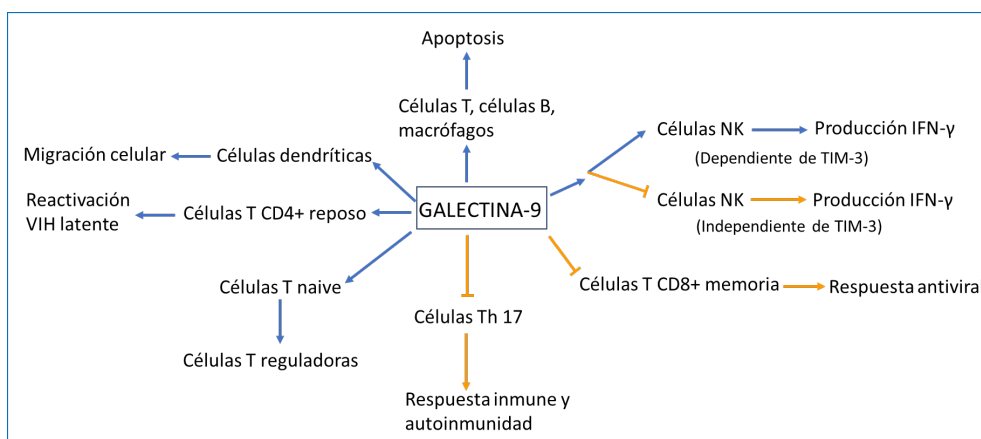


Figura 13. Funciones de Gal-9 (147).

En general, Gal-9 se puede unir a varios receptores de la superficie celular y también podría influir en moléculas intracelulares (150). Estas propiedades de unión multipotentes de Gal-9 se han asignado a sus dos extremos N- y C- terminal CRD (151). La participación de Gal-9 en varias funciones depende de la disponibilidad de ligando en la superficie celular que puede cambiar con diferentes tipos de células o con el estado (activación) del mismo tipo de células. Por lo tanto, Gal-9 puede ejecutar diferentes funciones dependiendo del tipo de célula (149).

Gal-9 participa en una serie de procesos biológicos intracelulares y extracelulares, incluyendo el tráfico de glicoproteínas, interacción célula-célula o interacciones células-matriz extracelular y transducción (152). Gal-9 se distribuye en una amplia variedad de células de mamíferos con algunas especificidades en tejidos debido a que el microambiente y la especificidad de las células influyen en gran medida la expresión de los genes de Gal-9.

Gal-9 tiene una amplia distribución en diferentes sistemas: el S. esquelético (153), S. muscular (145) (154), s. respiratorio (143–145,154,155), S. digestivo (144,155), S. urinario (145,155,156), S. reproductor (145,157), S. cardiovascular (145,155,156), S. linfático (144,145,155), S. nervioso (145), S. tegumentario (158) y S. inmune (143). La diferente localización de Gal-9 está asociada con diferentes funciones.

3.4.2. Gal-9 en procesos biológicos

Gal-9 en homeostasis: Gal-9 tiene un papel importante en el desarrollo de células T y en la homeostasis y esto ha sido demostrado en diferentes estudios. En primer lugar, en estudios con ratones (155), demostraron que Gal-9 estaba involucrada en la selección tímica de las células T, que se expresaba en células epiteliales tímicas y que inducía la apoptosis tanto en timocitos CD4/CD8 dobles negativo como dobles positivo. Posteriormente, se observó que Gal-9 podía promover la diferenciación de células T naïve en células T reguladoras al mejorar la expresión de Foxp3 (factor de transcripción responsable de la diferenciación de las células T reguladoras) (159). Y por último, que Gal-9 podía inducir la apoptosis de células T maduras diferenciadas vía TIM-3, en las células Th1 y Th17 (160). Sin embargo, no provocaba la apoptosis en las células Th2 y en las células T reguladoras (161,162). Una posible razón para este resultado diferencial de la señalización de Gal-9 en los diferentes subconjuntos de

células T, puede ser debido al patrón de glicosilación de los respectivos subconjuntos de células T.

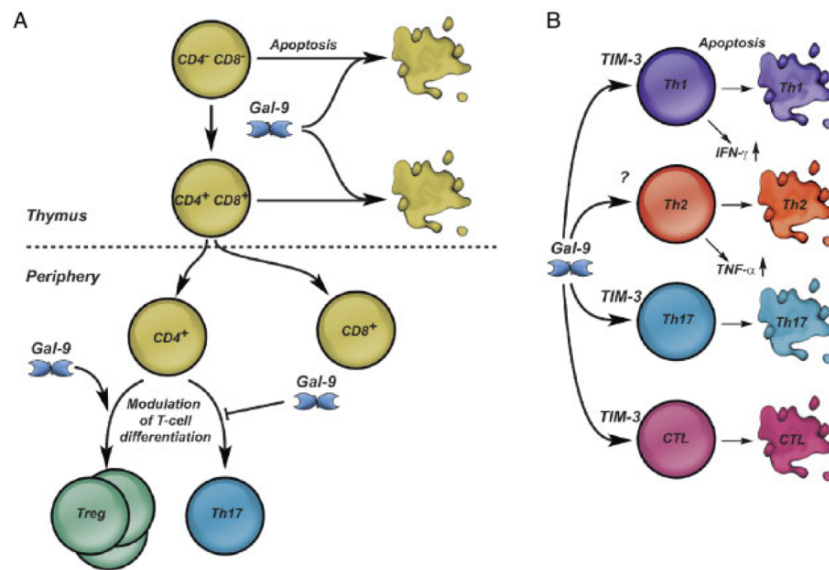


Figura 14. Gal-9 modula la selección de células T tímicas mediante la inducción de apoptosis en timocitos dobles negativos y dobles positivos. Gal-9 modula la diferenciación de células T periféricas al inducir el desarrollo de las células T reguladoras a partir de células T naive mientras reprime la expansión de células Th17 (163).

En resumen, Gal-9 tiene una serie de efectos sobre las diferentes poblaciones de células T que sirven para alterar el equilibrio de éstas al regular negativamente Th1 y Th17, al mismo tiempo que aumenta el número de células T reguladoras. Las células T reguladoras también expresan Gal-9 en la superficie celular, lo que puede contribuir a la actividad supresora de estas células hacia las células Th1 y Th17 (163).

Gal-9 en enfermedades autoinmunes: las reacciones autoinmunes se caracterizan por la expansión y activación de las células Th1 y Th17. Como se ha demostrado en diferentes estudios Gal-9 induce la apoptosis en estas poblaciones celulares por lo que el uso de Gal-9 recombinante podría ser una posible solución para evitar la autoinmunidad (163). Se han realizado modelos preclínicos de diferentes enfermedades autoinmunes con tratamiento de Gal-9 recombinante y demostró ser beneficioso. Por ejemplo, la administración de Gal-9 recombinante a ratones con encefalomiелitis autoinmune resultó en la disminución de la respuesta Th1, de los niveles de $IFN-\gamma$ y una reducción de la gravedad y mortalidad de la enfermedad (148). Se observó unos resultados similares en modelos de artritis autoinmune

y en diabetes autoinmune (159,164). Por el contrario, los niveles de citoquinas de Th2 no se vieron afectadas por el tratamiento con Gal-9, lo que sugiere que las células Th2 no son el objetivo principal de la actividad apoptótica mediada por Gal-9 (159).

Gal-9 en trasplantes: la respuesta inflamatoria al rechazo agudo de aloinjerto comparte varias características con la respuesta autoinmune mediada por las células T. En particular, las células proinflamatorias Th1 y Th17 se activan y las células T CD8⁺ CTL provocan el rechazo del aloinjerto. En este caso la expresión de Gal-9 endógeno así como los niveles de ARNm de TIM-3 se correlacionan con la gravedad del rechazo, lo que sugiere la implicación de Gal-9 al rechazo del aloinjerto (165). El tratamiento con Gal-9 mejoró el rechazo y supervivencia de los injertos en la piel de los modelos de ratón, acompañado por un número reducido de linfocitos en el aloinjerto (166).

En otro estudio con ratones con aloinjertos cardíacos, el tratamiento con Gal-9 mejoró la supervivencia del injerto (167).

Gal-9 en asma alérgico: en modelos de ratón con asma (168), se observó que la expresión de Gal-9 estaba aumentada en el tejido pulmonar y que había un aumento de los niveles de citoquinas Th2 y un acumulo de eosinófilos. También se observó que en pacientes con neumonía había un aumento de la expresión de Gal-9 que se correlacionaba con niveles elevados de Gal-9, lo que puede contribuir a la enfermedad. Por lo que tratamientos con Gal-9 puede mejorar el asma mediada por Th2 a través de interacciones independientes de TIM-3, además puede inducir la apoptosis de eosinófilos (169).

Gal-9 en infecciones microbianas: la infección microbiana provoca un aumento de la expresión de Gal-9 en las células infectadas como se ha observado en diferentes estudios como por ejemplo en las células endoteliales infectadas por el virus del dengue (170) o macrófagos infectados por *Mycobacterium tuberculosis* (171). En este estudio, se demostró que la interacción de TIM-3 con Gal-9 induce una activación de macrófagos que da como resultado la muerte de *M. tuberculosis* en modelos de ratón. Posteriormente se han realizado estudios para ver la expresión de Gal-9 en la tuberculosis pulmonar humana, y demostraron que bloquear la interacción entre TIM-3 y Gal-9 *in vitro* tenía cierto efecto antimicrobiano (172).

La expresión de Gal-9 también puede ser inducida por IFN- γ (173), crítica para la inmunidad contra las infecciones bacterianas y víricas, aumentando los niveles de Gal-9 en monocitos, macrófagos y fibroblastos.

Tanto la infección bacteriana como la vírica, aumenta la expresión de Gal-9 en las células infectadas, ya sea a través de componentes bacterianos/víricos o por citoquinas inflamatorias.

Se ha observado niveles elevados de Gal-9 en pacientes con VHC (174). En este estudio mostraron que la expresión de Gal-9 estaba aumentada principalmente por las células de Kupffer. En este caso, la elevación de Gal-9 en individuos infectados por VHC da como resultado una contracción de las células T CD4⁺ efectoras, apoptosis de las células T CD8⁺ CTL específicos de VHC y la expansión de las células T reguladoras.

Al igual que con otras infecciones, en el caso del virus del dengue, se ha observado niveles significativos de Gal-9 en plasma de pacientes infectados en comparación con individuos sanos (175). Los niveles de Gal-9 detectados en esta infección parecen ser los más altos reportados en infecciones virales humanas. Sin embargo, los niveles de Gal-9 disminuyen tras el tratamiento de forma similar a otras infecciones.

Se ha descrito que Gal-9 presenta dos funciones distintas en la inmunidad antimicrobiana. Primero, Gal-9 es capaz de estimular respuestas inmunes innatas mediante el reclutamiento de eosinófilos y la posterior mejora de las reacciones inflamatorias. Por ejemplo, en infecciones por *Leishmania major*, Gal-9 actúa como un receptor de macrófagos, aumentando la eliminación de éste parásito (176). La segunda función de Gal-9 en la inmunidad antimicrobiana es la inhibición de la respuesta inmune adaptativa, en particular la respuesta de células T. Por ejemplo, en ratones “knock-out” (tiene deletado el gen que codifica para Gal-9), se observó una mejora en la respuesta de las células T contra HSV. Se realizaron 2 tratamientos, unos con lactosa que es un inhibidor competitivo de Gal-9 que mejoró significativamente la respuesta de células T y otro tratamiento con Gal-9 recombinante donde se observó un efecto contrario y una inhibición de la respuesta de las células T (177).

Las infecciones virales inducen la expresión/producción de Gal-9 a través de IFN- γ e IFN- β por diferentes tipos de células (como macrófagos, monocitos, células neuronales...). Gal-9

a través de la interacción con TIM-3 induce la apoptosis de las células T CD4/CD8, suprimen la función CTL y expande las células T reguladoras. Las células T reguladoras a través de la Gal-9: TIM-3 median la supresión de las células T CD8⁺ efectoras, células Th17. Células B y células NK, pero pueden reducir la inflamación excesiva. La elevación de los niveles de Gal-9 y la expresión de TIM-3 en células T en infecciones virales y sus interacciones, podrían mediar la supresión inmune (178).

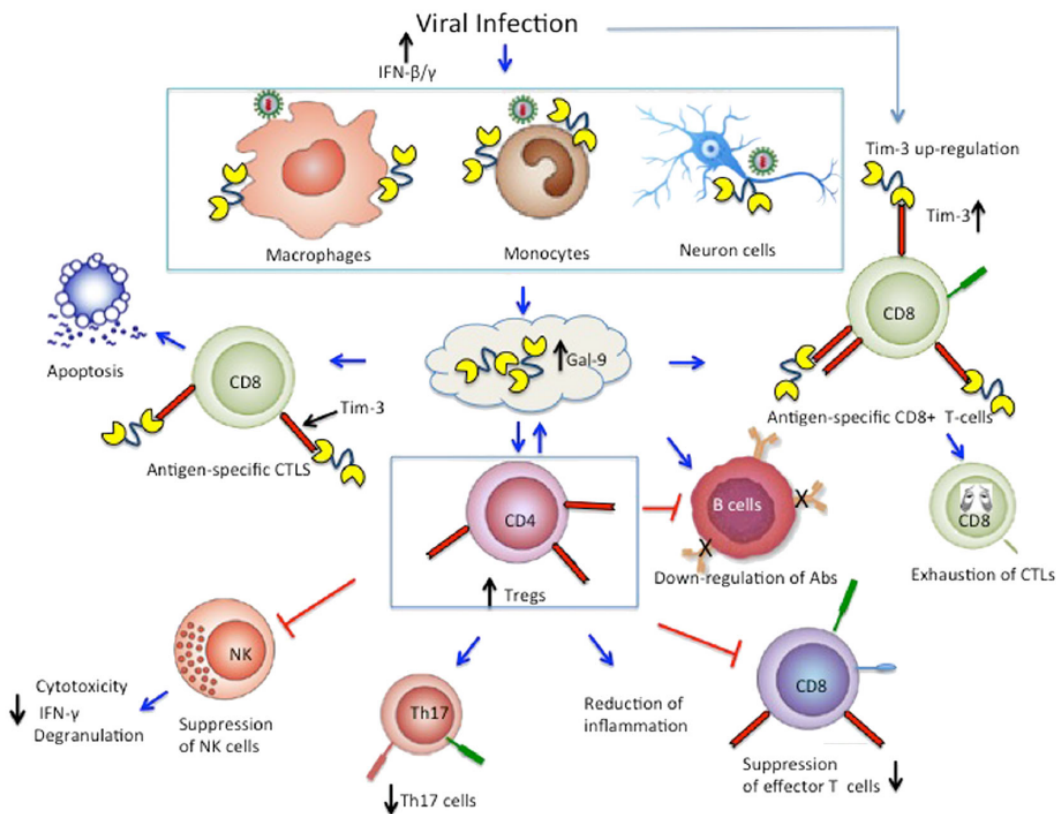


Figura 15. Gal-9 en patogénesis viral. Las infecciones virales inducen la producción de Gal-9 a través IFN- γ e IFN- β a través de diferentes tipos de células. Gal-9 a través de su interacción con TIM-3 induce apoptosis de células T CD4/CD8, suprime la función CTL y expande las células T reguladoras. Las células T reguladoras mediante diferentes mecanismos pueden mediar la supresión de las células T CD8 efectoras, células Th17, células B y células NK, pero pueden reducir la inflamación (178)

Gal-9 en tumores: se ha descrito que la expresión de Gal-9 varía en función del tipo de tumor. La pérdida de la expresión de Gal-9 está asociada con la progresión tumoral y la formación de metástasis en varios tipos de cáncer (179). En el caso del carcinoma primario de mama se caracteriza por altos niveles de Gal-9 endógeno, mientras que la metástasis carece de expresión de Gal-9 (180). En el carcinoma de cuello uterino de bajo grado presenta

niveles altos de Gal-9 mientras que en el mismo tipo de carcinoma de alto grado hay niveles muy bajos de esta proteína (181).

Gal-9 puede mejorar la inmunidad antitumoral mediante la maduración de las células dendríticas y la posterior inducción de la inmunidad antitumoral mediada por Th1 (182). En este mismo estudio, ratones portadores de sarcoma tratados con Gal-9 presentaban altos niveles de células CD8 CTL, que tenían niveles altos de expresión de granzima B y perforina, indicativos de una mayor actividad citolítica. Con todo esto se observó una inmunidad antitumoral aumentada por Gal-9 en estos ratones, lo que lleva a una supervivencia prolongada (182). Además, no se vio afectado el número de células T reguladoras (a diferencia de lo que ocurre en las enfermedades autoinmunes) y un aumento de las células NK.

Gal-9 en VIH-1: el grupo de Chagan-Yatusan demostró por primera vez la presencia de Gal-9 en el plasma de individuos infectados por VIH y su posible papel en la patogénesis de esta enfermedad (183). Posteriormente, diferentes grupos identificaron los niveles de Gal-9 en plasma de individuos infectados con VIH-1 (183–185), observando una correlación directa entre la carga viral en plasma y los niveles de Gal-9 en individuos con infección crónica por VIH-1.

Se ha demostrado que los niveles circulantes de Gal-9 están elevados poco después de la viremia detectable y es uno de los primeros factores de la primera ola de citoquinas en la infección aguda por VIH. Los niveles de Gal-9 en plasma se correlaciona con la carga viral y permanecen elevados a pesar de la supresión viral en la infección crónica (185). Los niveles elevados de Gal-9 en individuos con infección aguda y crónica por VIH-1, sugiere que esta lectina puede desempeñar un papel importante en la patogénesis del VIH-1. Además tras TAR, los niveles de Gal-9 disminuyen considerablemente (186).

El grupo de Mohamed Abdel-Mohsen demostró que Gal-9 es un mediador potencial de la transcripción y reactivación del VIH-1 (187). Como el factor de restricción p21 y el regulador del ciclo celular modulan la transcripción del VIH en individuos infectados por el VIH-1 suprimidos por TAR (188) y a su vez Gal-9 regula la expresión de p21 (184,189,190), demostraron que Gal-9 modula la transcripción y la latencia del VIH-1. Demostró que Gal-

9 es un potente reactivador de la latencia *in vitro* y *ex vivo* a diferencia de otras galectinas analizadas (Gal-1, -3, -4, -7, y -8). De acuerdo con los datos *ex vivo*, se observó que Gal-9 es capaz de modular la expresión de un subconjunto de genes asociados con la regulación de la activación y la proliferación de las células T *in vitro* y regula al alza múltiples genes responsables de la apoptosis de las células T. Otro dato importante de este trabajo es que Gal-9 puede inducir la expresión de varios factores de restricción del huésped anti-VIH como APOBEC3G. Basado en el mecanismo de acción asociado con los factores APOBEC3, se espera que la inducción de APOBEC3 provocada por Gal-9 anule la actividad antagonista de la proteína Vif de VIH-1 y produzca una hipermutación del virus tras la infección de una nueva célula, haciendo que la replicación del virus sea incompetente. En resumen, este trabajo proporciona una importancia de Gal-9 que debe considerarse como una base para nuevas estrategias para eliminar el reservorio de VIH-1 latente.

4. PROTEÍNAS TIM

La familia TIM está formada por ocho genes en ratones (TIM-1 a TIM-8), localizados en el cromosoma 11B.1 murino y tres en humanos (HAVCT1/TIM-1, HAVCR2/TIM-3 y TIMD4/TIM4), localizados en el cromosoma 5q33.2 humano (191–193). Los estudios de expresión, función y estructura confirman que TIM-1, TIM-3 y TIM-4 de ratón son los ortólogos de TIM-1, TIM-3 y TIM-4 humano. No se ha descrito ortólogo humano para TIM-2 (194).

La proteína TIM-1 fue el primer miembro de la familia TIM registrado como receptor celular del virus de la Hepatitis A (HAV). Se identificó inicialmente en células de mono verde africano en el año 1996 (195) y dos años más tarde en humanos (196). En el año 2002, se publicó un trabajo, donde la búsqueda de nuevos marcadores de superficie para distinguir los subtipos Th1 y Th2 de las células T, condujo a la identificación de la familia de genes TIM (162,197).

Se han publicado diversos trabajos acerca de esta familia de proteínas en la regulación de la respuesta inmune y su relación con patologías inmunitarias, como tolerancia en trasplantes, desarrollo de autoinmunidad, asma, alergias e infecciones virales.

4.1. Estructura de las proteínas TIM

La familia TIM son proteínas transmembrana tipo I. La región extracelular de las proteínas TIM está formado por un dominio N-terminal de tipo V, rico en cisteínas, seguido de un dominio de mucina rico en treoninas, serinas y prolina de longitud variable con numerosos sitios potenciales de O-glicosilación y un pequeño dominio D3 próximo a la membrana plasmática, que contiene sitios potenciales de N-glicosilación conservados (197).

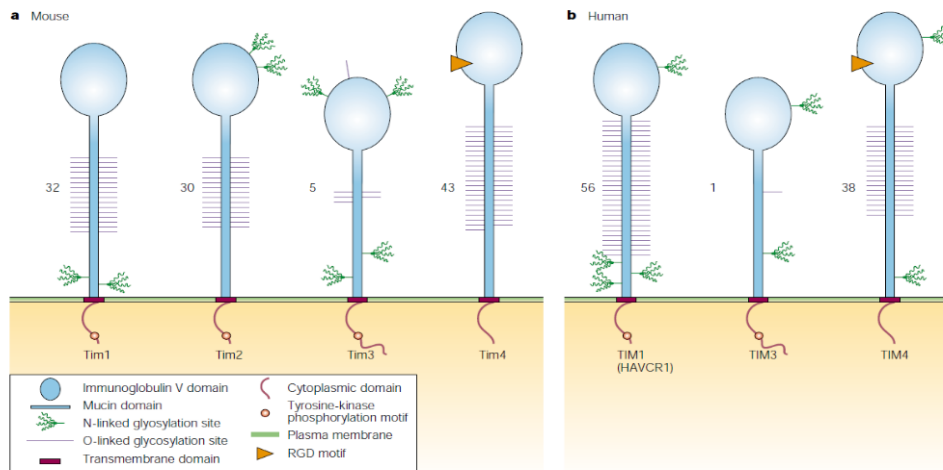


Figura 16. Representación esquemática de la estructura de las proteínas TIM (197).

Estas proteínas están ancladas por una única región transmembrana y presentan un dominio citoplasmático con tirosinas que forman parte de motivos de fosforilación tirosina quinasa. Estos motivos de fosforilación están presentes en todas las proteínas de la familia, excepto en TIM-4, en las que tanto en la humana como en la murina, son las únicas que presentan un motivo RGD (motivo peptídico que consiste en arginina, glicina y ácido aspártico que se unen a las integrinas) en su dominio N-terminal (197).

Los dominios N-terminal de los diferentes miembros de la familia TIM son similares en secuencia, con una identidad que ronda el 40% entre las proteínas de una misma especie y del 60% entre proteínas homologas de ratón y humano. La región N-terminal es crítica para la unión de proteínas a sus ligandos (194).

El dominio citoplasmático de las proteínas TIM es el más conservado entre los ortólogos humanos y murino. Su longitud puede variar entre 42 y 77 residuos. El motivo de fosforilación tirosina quinasa que presentan TIM-1, TIM-2 y TIM-3 está implicado en la transducción de señales al interior célula tras el reconocimiento de ligandos. La proteína TIM-4 es la única de la familia que no posee motivo de tirosina quinasa en su dominio citoplasmático, por lo que no transmite señales intracelulares tras la interacción con sus ligandos (194).

En cuanto a los dominios de mucina, existen diferencias muy marcadas en la longitud y el número de glicosilaciones. No está claro cuál es la función del dominio mucina. Este dominio puede ser importante para la oligomerización de las proteínas, para la interacción con ligandos o simplemente para presentar el dominio N-terminal a ligandos (197). El motivo de fosforilación tirosina quinasa que presenta TIM-1, TIM-2 y TIM-3 está implicado en la transducción de señales al interior celular tras el reconocimiento de ligandos. Por el contrario, TIM-4 no posee motivo de tirosina quinasa en su dominio citoplasmático, por lo que no transmite señales intracelulares tras la interacción con sus ligandos (197).

TIM-1, TIM-3 y TIM-4 son receptores de reconocimiento de patrones especializados para el reconocimiento de fosfatidilserina (PtdSer), como se demuestra en las interacciones TIM-PtdSer altamente conservadas observadas en las estructuras cocristal TIM/PtdSer (198). La fosfatidilserina es un fosfolípido cuya localización está restringida a la cara interna de la membrana celular. Esta localización está determinada por una compleja maquinaria celular que mantiene y genera cierta simetría en la membrana plasmática, se expone en la membrana externa cuando una célula sufre apoptosis (194). PtdSer en células apoptóticas proporciona una señal clave, ya que el reconocimiento de las células apoptóticas es un componente esencial de la homeostasis tisular y la regulación inmune (197).

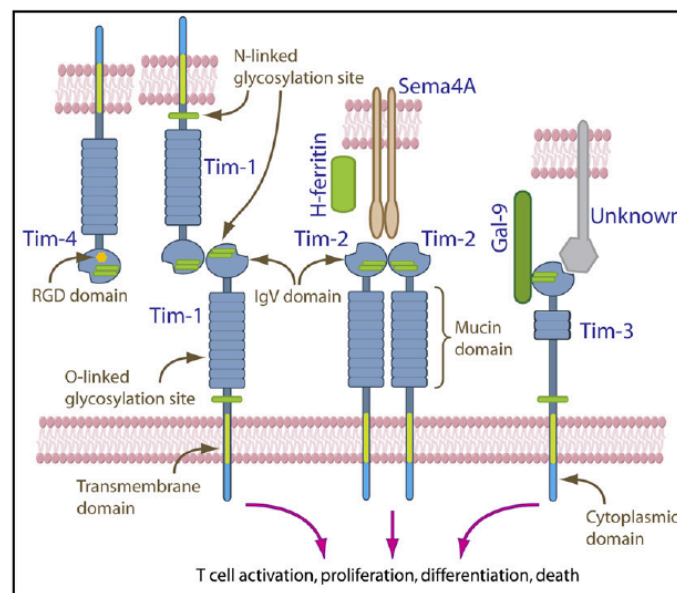


Figura 17. TIM-4 puede unirse a TIM-1 para estimular la activación y la expresión de las células T. Las proteínas TIM-2 pueden formar un dímero que evita la unión homofílica. Semaforina 4A y H-ferritina son ligandos de TIM-2. Gal-9 se une a TIM-3 a través de carbohidratos presentes en el dominio IgV. La existencia de múltiples ligandos para las proteínas TIM, provoca la regulación de las respuestas de las diferentes células. (199).

La proteína TIM-1 se expresa en células T CD4⁺ cooperadoras y su expresión pasa a estar restringida a las células de tipo Th2 cuando las células T CD4⁺ se diferencian (200). También se ha observado expresión de TIM-1 en células NK, células T reguladoras y en menor medida en mastocitos y en células B (201–203). La función de TIM-1 está relacionada con la activación y proliferación celular, procesos que pueden provocar inflamación de las vías respiratorias y asma (203). El primer ligando descrito para TIM-1 fue HAV, virus que utiliza esta proteína como receptor celular para unirse e infectar la célula huésped (195). Se han identificado varios ligandos naturales de TIM-1. Además de ser el receptor de HAV, TIM-1 es capaz de reconocer la cadena pesada de la inmunoglobulina A (IgA) (204) y Tim-3 (205).

La proteína TIM-2 es la única de la familia TIM que está presente solamente en ratón. La secuencia de TIM-2 murino es muy homóloga a la de TIM-1 murino, pero difiere en que carece de residuos críticos que se coordinan con los iones metálicos y el PtdSer (206). Esto conduce a una superficie relativamente plana en esta región y en consecuencia TIM-2 no se une a PtdSer(194). La expresión de TIM-2 no se ha observado en células T naïve, se expresa moderadamente en células T activadas, especialmente en células Th2 (207) y también se expresa en las células B de los centros germinales de los ganglios y del bazo (208). TIM-2 parece funcionar como un regulador negativo de la activación de las células T (194).

El primer ligando de TIM-2 descubierto fue la semaforina 4A, proteína expresada en la superficie de las células B, macrófagos y células dendríticas (209). La interacción entre TIM-2 y semaforina 4A en las células T activadas origina la fosforilación del motivo tirosina quinasa que posee TIM-2 en su dominio citoplasmático. El bloqueo de esta interacción con la proteína TIM-2-Fc provoca un aumento de la respuesta Th2 y una inhibición de la respuesta Th1 (209).

La proteína TIM-3 se descubrió en 2002 como una molécula expresada específicamente en células Th1 y células T CD8⁺ citotóxicas en el ratón (162). Más tarde, se descubrió que también se expresaba en células T en humanos (210). Actualmente, sabemos que TIM-3 no solo se expresa en las células T sino que también en otros tipos de células, como las células dendríticas, monocitos (211) y mastocitos (200).

TIM-4 fue identificada de manera independiente a las proteínas TIM como SMUCKLER (spleen, mucin-containing, knockout of lymphotoxin), un gen que se inhibía en el bazo de

ratones deficientes para linfotoxina- α y linfotoxina- β (212). TIM-4 se expresa en células presentadoras de antígeno. En humano se expresa en macrófagos CD11b⁺ y CD169⁺ localizados en las amígdalas y en la zona marginal del bazo (212,213). Tanto TIM-4 humano como de ratón se ha demostrado que son receptores para PtdSer, en base de estudios de unión y mutagéneis (214). También TIM-1 es un ligando de TIM-4 pero para formar un puente través de un exosoma (194).

4.2. TIM-3

En humanos, TIM-3 se expresa en un subconjunto de células T CD4⁺ activadas, en células Th1 diferenciadas, células T CD8⁺ y células Th17 (215). También se expresa en células del sistema innato, subpoblaciones de macrófagos, células dendríticas, monocitos y células NK (211). Se ha examinado el papel de los factores de transcripción asociados con Th1 en la regulación de la expresión de TIM-3 y se ha observado que la expresión de TIM-3 está en parte regulada por el factor de transcripción específico de Th1 T-bet tanto en las células T como en las células dendríticas (216). T-bet se une directamente al promotor TIM-3 (217). En estudios con modelos de células T-bet^{-/-} se ha observado que no son completamente deficientes en la expresión de TIM-3 por lo que se sugiere la participación de otros factores de transcripción (218).

4.2.1. Estructura de TIM-3

La proteína TIM-3 que encontramos en el ratón es una glucoproteína transmembrana de tipo I de 281 aminoácidos que contiene un dominio variable de inmunoglobulina distal (IgV) y un dominio de mucina. TIM-3 humano tiene una longitud de 302 aminoácidos y comparte una identidad del 63% con el TIM-3 de ratón (162).

La proteína TIM-3 pertenece a la superfamilia de inmunoglobulinas (IgSF). Los dominios IgV de TIM-3 consisten en dos láminas β antiparalelas que están unidas por un enlace disulfuro, además presenta dos enlaces disulfuro adicionales formados por cuatro cisteínas no canónicas que no varían dentro de las proteínas TIM y son únicas entre los miembros de las IgSF. Estos enlaces estabilizan el dominio IgV de TIM-3 y reorientan el bucle CC por lo que

está muy cerca del bucle FG, lo que da como resultado la formación de una estructura “hendida” o de “bolsillo”. Esta estructura única no se encuentra en otras proteínas IgSF y se sugiere que está involucrada en la unión del ligando (206,219).

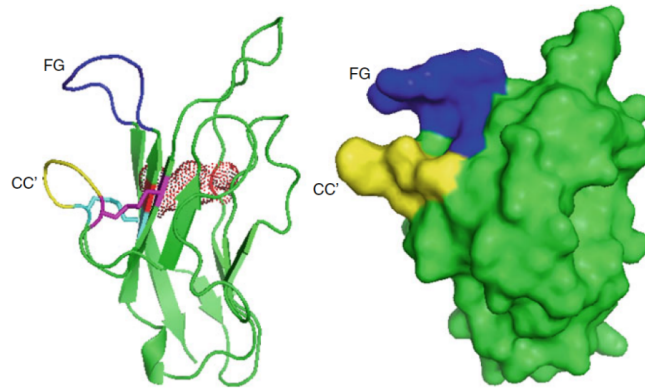


Figura 18. Dominio IgV de TIM-3 ratón. A) Las barras representan dos enlaces disulfuro no canónicos que reorientan el bucle CC' formando la estructura “hendida” o “de bolsillo” junto con el bucle FG. Los puntos representan el enlace disulfuro que existe en todas las proteínas IgSF. B) Representación de superficie (217).

Los residuos de tirosina en el dominio citoplasmático de TIM-3 se conservan y están agrupados en regiones proximales y distales de la cola citoplasmática. La fosforilación de los residuos Y235 e Y242 de TIM-3 son los responsables de la potenciación de la transducción de señal iniciada por la activación TCR, “upstream” de las vías NFAT/AP1. La expresión de TIM-3 es diferente entre las células T y las células dendríticas/macrófagos (211)

4.2.2. Ligandos de TIM-3

Gal-9: Para identificar los ligandos de TIM-3 se seleccionaron varias líneas de células T y linfomas por su capacidad para unir la proteína de fusión Tim-3-Ig. Se descubrió que las células T CD8⁺ del linfoma presentaba una fuerte unión a la proteína de fusión TIM-3-Ig, lo que sugiere un alto nivel de expresión del ligando de TIM-3 en este tipo de células (217). Se identificó como una molécula de 35kDa que sólo unía TIM-3-Ig. Más tarde se determinó que esta molécula era Gal-9 mediante espectrometría de masas (148).

La unión de Gal-9 a TIM-3 depende de su dominio de reconocimiento de carbohidratos que reconoce las cadenas de oligosacáridos del dominio IgV de TIM-3 (217).

Fosfatidilserina: La hendidura única presente en las proteínas de la familia TIM participa en la unión del ligando. PtdSer se une a esta región de TIM-1 y TIM-4 y está implicada en el reconocimiento y la captación de células apoptóticas (214,220). Sin embargo TIM-3 presenta una estructura de bucle FG diferente, por lo que la hendidura de TIM-3 es diferente de la de las otras proteínas TIM (214). Más tarde, se demostró, que a pesar de que la hendidura de TIM-3 es diferente, PtdSer también es un ligando de TIM-3(221). Sin embargo, su afinidad de unión es más débil que la de TIM-1 o TIM-4.

Ligandos de carbohidratos: Estudios de TIM-3 demostraron que esta proteína también se puede unir a restos de carbohidratos (205). Sin embargo, estas interacciones siguen en estudio.

4.2.3. TIM-3 en enfermedades

TIM-3 en enfermedades autoinmunes: la importancia de TIM-3 en la regulación de la respuesta inmune fue sugerida por primera vez en modelos experimentales de diferentes enfermedades (162,222). Desde entonces, estudios de la expresión y función de TIM-3 respaldan aún más la importancia de TIM-3 en la regulación inmune. Por ejemplo, en pacientes con esclerosis múltiple se ha observado que la expresión de TIM-3 está desregulada, presentando niveles más bajos de esta proteína en relación a los pacientes sanos (223). La falta de regulación de la expresión de TIM-3 en zonas inflamatorias puede representar un defecto intrínseco que contribuye a la patogénesis de la esclerosis múltiple y de otras enfermedades autoinmunes.

Pacientes con esclerosis múltiple (EM) que han recibido tratamiento con glatiramer o IFN- β muestran una mejora en la expresión de TIM-3 y de la producción de IFN- γ (224). Estos datos respaldan que TIM-3 es un regulador negativo importante de la función de las células T y que la baja expresión de TIM-3 en células T de pacientes con EM permite que las células autorreactivas escapen de la regulación negativa de TIM-3. La secreción de IFN- γ de las células Th1 regula al alza la expresión del ligando TIM-3, es decir de Gal-9. Sin embargo, la baja expresión de TIM-3 permite a las células escapar de la muerte inducida por Gal-9, provocando que las células proinflamatorias autorreactivas se expandan (217).

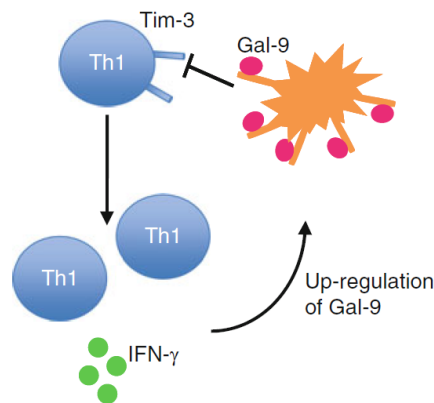


Figura 19. TIM-3 en autoinmunidad. La secreción de IFN- γ por las células Th1 regula la expresión del ligando de TIM-3, Gal-9. Sin embargo, la baja expresión de TIM-3 permite a las células escapar de la muerte inducida por Gal-9. En consecuencia, las células proinflamatorias autorreactivas se expanden. Los tratamientos que aumentan la expresión de TIM-3 restablecen la regulación negativa mediada por Gal-9 de las células Th1 secretoras de IFN- γ (217).

TIM-3 en enfermedades infecciosas: Una enfermedad donde TIM-3 parece jugar un papel crítico como regulador negativo en las células T es en la infección viral crónica. En estos casos, se ha observado que las células T específicas de virus desarrollan un fenotipo deteriorado o disfuncional caracterizado por la incapacidad de proliferar y ejercer funciones efectoras como la citotoxicidad y la secreción de citocinas en respuesta a la estimulación antigénica (agotamiento inmunológico) (217).

En estudios con pacientes infectados con el virus de la hepatitis C, la expresión de TIM-3 está alterada en células tanto en células T CD4⁺ como en células T CD8⁺ (225). En el carcinoma nasofaríngeo asociado al virus de Epstein-Barr, las células del carcinoma liberan Gal-9 que a su vez provoca una apoptosis de las células T CD4⁺ específicas del virus, y que puede ser inhibido mediante los anticuerpos frente a TIM-3 y Gal-9 (226).

En el caso de la infección por VIH-1, una población de células T CD8⁺ TIM-3⁺ se identifica fácilmente en pacientes con VIH-1, ya que la expresión de TIM-3 se correlaciona positivamente con la progresión de la enfermedad e inversamente con el control viral (227,228). En estos mismos estudios se observó que la estimulación *ex vivo* de estas células T CD8⁺ agotadas asociadas al VIH en presencia de un anticuerpo frente a TIM-3 podía

mejorar parcialmente su función. Sin embargo, la terapia antirretroviral puede reducir la expresión de TIM-3 (229).

Como ya hemos visto, en condiciones crónicas, la expresión de TIM-3 en las células T CD8⁺ con o sin la coexpresión de otros ligandos inhibitorios como PD-1 o Lag-3, está asociado con el agotamiento celular. El bloqueo de TIM-3 restaura la función efectora de las células T.

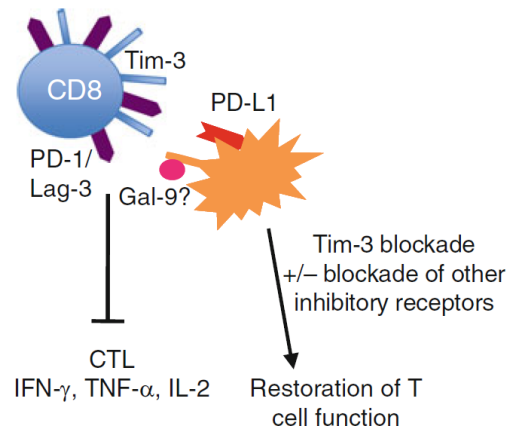


Figura 20. TIM-3 en enfermedades crónicas. La expresión de TIM-3 en las células T CD8⁺ con o sin coexpresión de otros ligandos inhibitorios se asocia con el agotamiento de las células. El bloqueo de las interacciones TIM-3 con su ligando solo o en combinación, restaura la función efectora de las células T (217).

TIM-3 en respuestas inmunes innatas: como hemos visto, TIM-3 juega un papel importante en las células T donde regula negativamente la respuesta de estas células. Sin embargo, la expresión de TIM-3 en las células del sistema inmune innato puede tener un papel diferente en la inmunoregulación. Diferentes estudios indican que la expresión de TIM-3 en las células dendríticas o en los macrófagos mejora la respuesta inflamatoria, junto con la señalización TLR (211). En este mismo estudio, observaron que en modelos de ratón wild type (sin modificaciones) donde se llevó a cabo la estimulación de células dendríticas con Gal-9 mejoró la producción de TNF- α a diferencia de los ratones con deficiencia de TIM-3. El uso del anticuerpo frente a TIM-3 en mastocitos provoca la producción de citoquinas Th2 como IL-4, IL-6 e IL-13, que exacerban la inflamación de las vías respiratorias (200).

La expresión de TIM-3 en las células del sistema inmune innato se regula al alza tras estímulos inflamatorios. En un modelo de miocarditis inducida por el virus coxsackie, se produjo una alta expresión de TIM-3 en mastocitos y en macrófagos. El uso de un anticuerpo frente a TIM-3 en el momento de la infección provocó un aumento de la inflamación cardíaca, lo que nos indica un papel de TIM-3 en la reducción de la inflamación en este modelo (230).

Por lo tanto, la expresión de TIM-3 es regulada al alza en células dendríticas y macrófagos debido a la exposición de diferentes estímulos provocando la producción de citoquinas proinflamatorias como TNF- α .

TIM-3 en la tolerancia: Además de inducir la muerte celular de las células Th1, la interacción de TIM-3 con su ligando puede afectar al establecimiento de la tolerancia. La tolerancia a los injertos alogénicos se puede lograr mediante el bloqueo de la coestimulación y la transfusión específica del donante (DST) (222). Al bloquear la coestimulación de CD40 con su ligando CD40L al mismo tiempo que se administra DST, es posible inducir tolerancia indefinida a los aloinjertos trasplantados no coincidentes con su MHC, efecto debido a la supresión mejorada de las células T reguladoras específicas del donante. El bloqueo de la inmunorregulación mediada por TIM-3 mediante la administración de TIM-3-Ig provocó la generación de células T reguladoras funcionales específicas del donante y evitó la inducción de la tolerancia a los injertos. El bloqueo de la vía TIM-3 empleando TIM-3-Ig durante la inducción de la tolerancia fue suficiente para prevenir la tolerancia y condujo a una mayor proliferación y producción de citoquinas (222). Por lo tanto, TIM-3 regula negativamente las respuestas de las células T induciendo la eliminación de las células efectoras Th1 e induciendo también la tolerancia. Aún no se conoce si estos dos efectos están relacionados.

5. VIH-1. INTERACCIÓN GAL-9: TIM-3

Como ya se ha visto anteriormente, existe un aumento de los niveles de Gal-9 en individuos infectados con VIH-1 (183–185). Gal-9 puede regular el ambiente redox de las células T mediante su unión a PD1 y a la integrina β potenciando la infección de VIH-1 (231). Además, las interacciones de Gal-9 con PD1 en células T CD4⁺ no estimuladas mejoran la entrada de VIH-1 y por lo tanto la infección (184), un aumento en el número de interacciones de Gal-9:PD1 en la superficie celular provoca un cambio en la conformación y actividad de diferentes moléculas de la superficie como las integrinas y puede activar la migración de las células T.

En contraste, se observó que la interacción de Gal-9 con TIM-3 en células T CD4⁺ estimuladas con fitohemaglutinina inhibió significativamente la infección por VIH-1 tanto en aislado X4-trópico como R5-trópico (184). En este mismo estudio, observaron que Gal-9 reduce significativamente la expresión de la superficie de los correceptores CCR5, CXCR4 y $\alpha 4\beta 7$ en las células T CD4⁺ activadas de una forma tiempo-dependiente, proporcionando un mecanismo potencial para hacer que las células T CD4⁺ activadas sean menos propensas a la infección por VIH-1. Además, las interacciones Gal-9: TIM-3 redujeron significativamente la replicación viral en las células T CD4⁺.

Los niveles elevados de Gal-9 en pacientes infectados por el VIH-1 (agudas y crónicas) sugieren que esta lectina puede jugar un papel importante en la patogénesis del VIH-1. Sin embargo, la rápida reducción de los niveles de Gal-9 en plasma después de la terapia antirretroviral sugiere que Gal-9 puede estar asociada con la mejora clínica de la infección (186). Las interacciones Gal-9: TIM-3 son beneficiosas o perjudiciales para el VIH, ya que depende en gran parte del tipo de célula y de la etapa de la infección. Seguramente, durante la infección temprana, la interacción Gal-9: TIM-3 sea beneficiosa en las células T CD4⁺ activadas ya que es la principal diana. Sin embargo, en la infección crónica, esta interacción puede ser perjudicial para las células T CD8⁺ debido a la supresión de la respuesta específica celular al VIH-1 (178).

Gal-9 soluble reduce la infección por VIH-1 a través de interacciones con TIM-3 de las células T CD4⁺ en infección aguda, mientras que la interacción con PD-1 aumenta la infección. Las células T reguladoras suprimen las células T CD8⁺ que expresan altos niveles de TIM-3 a través de las interacciones Gal-9: TIM-3 (178).

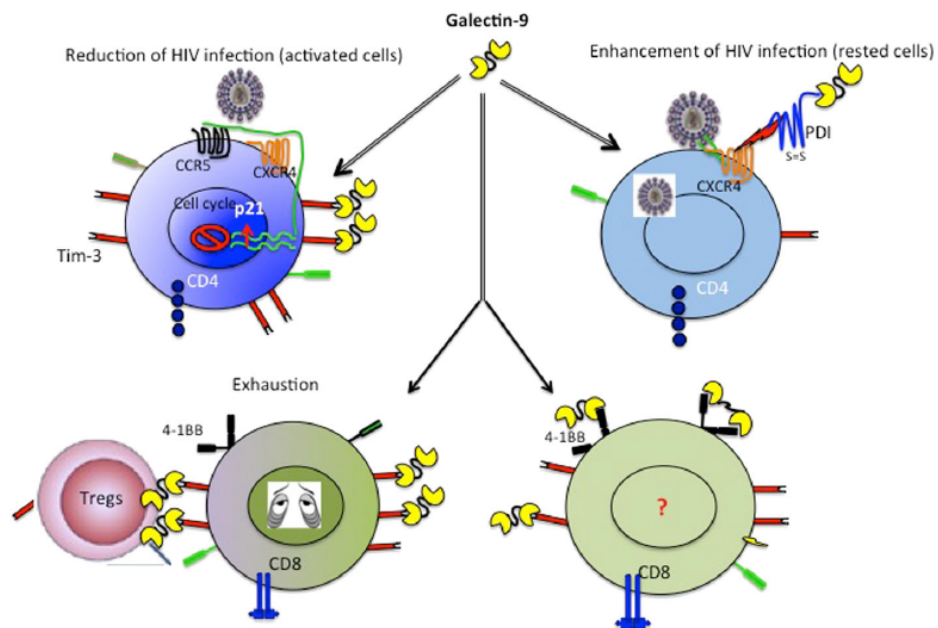


Figura 21. Funciones inmonomoduladoras que media Gal-9 en la infección por VIH-1. Gal-9 soluble a través de interacciones con TIM-3 expresado en células T CD4⁺ activadas reduce la infección por VIH, mientras que su unión con PDI en células T CD4⁺ en reposo aumenta la infección por VIH. Las células T reguladoras suprimen las células T CD8⁺ que expresan altos niveles de TIM-3 a través de las interacciones Gal-9: TIM-3 (178).

Justificación, Hipótesis y Objetivo

JUSTIFICACIÓN

Uno de los principales obstáculos para la curación de la infección por VIH-1 es la existencia de un reservorio de células T CD4⁺ de memoria latentemente infectadas. Por esto, los métodos propuestos para lograr la curación se centran en encontrar medios para reactivar la replicación del virus latente. El conocimiento de los mecanismos que mantienen la latencia ha permitido identificar diversas dianas frente a las que dirigir fármacos con mecanismos de acción diversos. De hecho, en la actualidad, la mayor parte de la investigación se basa en la identificación de los denominados fármacos anti-latencia. Para tener éxito, esta estrategia se basa en que las células infectadas serán eliminadas tras la reactivación de los provirus latentes por el efecto citopático de la expresión de genes del VIH-1 o por el efecto lítico de los linfocitos T citotóxicos (CTL) específicos de VIH-1. Las células T citolíticas son un componente importante de la respuesta frente a VIH-1, ya que pueden limitar parcialmente la replicación vírica, tanto en la fase aguda como crónica de la infección.

Gal-9 ha despertado un gran interés dado su potencial para modular la transcripción del VIH-1 y la capacidad de reactivar al virus latente. Pero, como con otros agentes anti-latencia, esto no es suficiente para la erradicación del VIH-1 y se precisa un sistema inmune potente para su eliminación. Como se ha visto en diferentes estudios basados en esta estrategia, conocida por su denominación en inglés *Shock and Kill*, la potencia de la respuesta CTL-VIH-1 específica es insuficiente para la eliminación de las células en las que ha sido reactivado el virus latente. Esto hace que se tenga que buscar estrategias que mejore este agotamiento inmunológico. Una de estas estrategias evaluadas es la inhibición de diferentes receptores que resultan ser marcadores de agotamiento funcional. En diversos estudios se ha comprobado que bloqueando estos receptores se puede restaurar la función CTL.

TIM-3 es un tipo de proteína transmembrana que se expresa en múltiples células del sistema inmune, incluyendo las células T activadas/agotadas y los monocitos. Entre los ligandos conocidos de TIM-3 se ha identificado Gal-9. En años recientes, se ha investigado el papel de la vía galectina-9/TIM-3 en la regulación de la respuesta celular T CD8⁺ aguda y de memoria en respuesta a infecciones vírica. La presencia de infección vírica continua se asocia con una sobreexpresión de TIM-3 en la superficie celular, con agotamiento y muerte celular consiguiente. La unión de Gal-9 a TIM-3 se asocia con la apoptosis de células CD8⁺,

aunque si se bloquea la unión de Gal-9 y TIM-3 se mejora la respuesta CTL. Parece, por tanto, que la manipulación de la interacción de la galectina con su receptor usando azúcares sencillos podría mejorar las respuestas celulares a las infecciones víricas.

Este trabajo tiene un claro carácter translacional. Aunque el objetivo final de identificar una estrategia terapéutica para curar la infección por VIH-1 no se alcanzara, la demostración de una activación eficaz del virus latente o la restauración de la actividad CTL de los linfocitos T CD8⁺ podría ser de gran utilidad clínica, ya que cualquiera de las 2 estrategias se podría asociar con otras con un potencial sinérgico.

HIPOTESIS

El reservorio celular de linfocitos T CD4⁺ en reposo latentemente infectados constituye el principal obstáculo para la curación de la infección por VIH-1. Esto justifica los esfuerzos para erradicar el virus, enfocados hacia la reactivación de los provirus latentes. Sin embargo, solo la reactivación del VIH-1 latente no es suficiente para la eliminación del reservorio y sería esencial potenciar la respuesta de los linfocitos T citolíticos específicos de VIH-1. Actualmente no existe estrategia conjunta para conseguir este objetivo.

Nuestra hipótesis se basa en las siguientes premisas:

1. Gal-9 puede inducir la transcripción y reactivación del VIH-1 en células T CD4⁺ primarias latentemente infectadas por VIH-1.
2. La inhibición del receptor celular TIM-3 puede mejorar la actividad citotóxica específica de los linfocitos T CD8⁺.
3. La adición de Gal-9 y el bloqueo simultáneo de TIM-3 puede eliminar las células latentemente infectadas.

OBJETIVO

Evaluar la eficacia de la manipulación de Gal-9 y su interacción con TIM-3 en la reducción del reservorio celular latentemente infectado por VIH-1 como estrategia para la curación de la infección por VIH-1 en modelos *in vitro* y *ex vivo*.

Materiales y Métodos

El estudio se llevó a cabo en tres partes, en primer lugar, se analizó el efecto de Gal-9 como agente reactivador en un modelo células Jurkat-LAT-GFP y en modelos de latencia basado en IL-7; en segundo lugar, se evaluó el efecto del bloqueo de TIM-3 en la restauración de la actividad CTL de los linfocitos T CD8⁺ y las células NK tanto en modelos *in vitro* como *ex vivo*. Finalmente se evaluó el efecto del bloqueo de TIM-3 y el uso de Gal-9 como estrategia conjunta en modelos *in vitro* y *ex vivo*.

1. Toxicidad de Gal-9 y α -TIM3 en células Vero

Para medir la posible citotoxicidad de Gal-9 y α -TIM3 (ambos de R&D Systems, Minneapolis, MN, EE. UU.), se emplearon células VERO (C1008 [Vero 76, clone E6, Vero E6] (ATCC® CRL-1586™). Es una línea celular derivada, procedente de riñón de mono verde africano adulto (Japón, 1962). Es una de las líneas celulares más común para comprobar la citotoxicidad de diferentes fármacos.

Para el cultivo celular se utilizó medio DMEM (Gibco, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, EE. UU.) y se distribuyeron las células VERO en una placa de 6 pocillos (100.000 células/pocillo) y se incubaron en estufa a 37°C, 5% de CO₂ y 90% de humedad. Se observaron durante varios días hasta que se formó una monocapa que nos permitiese poder evaluar el efecto citotóxico.

El efecto de las diferentes concentraciones de Gal-9 (2 nM y 200 nM) y α -TIM3 (2,5 μ g/ml, 5 μ g/ml, 7 μ g/ml y 10 μ g/ml) se observaron a las 8, 20, 24, 40 y 48 horas y se tomaron fotografías en cada tiempo. Como control positivo las propias células VERO y como control negativo se añadió DMSO (Dimetilsulfóxido) (1 μ l/ml).

2. Reactivación de VIH-1 latente mediada por Gal-9

2.1. Evaluación de la actividad reactivadora de Gal-9 en el sistema celular Jurkat-LAT-GFP

Para evaluar la actividad de Gal-9 en la transcripción del VIH-1 latente, se empleó un modelo de células Jurkat (J-LAT-TaT-GFP) latentemente infectadas. Las células Jurkat fueron obtenidas de NIH, AIDS [J-Lat-GFP cells (A72)], cedidas por el Dr. Verdin (232,233). Están

2.2. Reactivación de VIH-1 mediada por Gal-9 en modelos de latencia en células T CD4⁺ basado en IL-7

2.2.1. Generación del sobrenadante viral NL4.3

Dado que para algunos experimentos precisamos llevar a cabo una infección con una cepa de virus pNL4.3 (Figura 23), generamos un stock de dicho virus.

Para la obtención de sobrenadante viral, se realizó una transformación del plásmido pNL4.3 en *Escherichia coli* DH5 α mediante choque térmico a 42°C durante 45 segundos y a -20°C durante 2 minutos. Para reconstituir la pared, el cultivo se incubó en medio SOC durante 1h a 37°C y 200 rpm. Realizada la transformación, se sembró el cultivo en placas con medio LB con ampicilina, tras 24 h de incubación en estufa a 37°C. Se seleccionaron varias colonias transformantes y crecieron durante 12 h en medio LB con ampicilina.

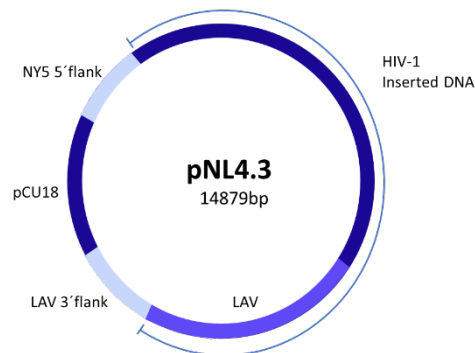


Figura 23. Vector pNL4.3: clon recombinante de las cepas NY5 (5') y LAV (3') que contiene el genoma completo del VIH-1 y genera una progenie viral infecciosa tras su transfección en numerosas líneas celulares (234).

El plásmido se purificó empleando Qiagen Plasmid Maxi[®] kit (Qiagen, Hilden, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante (Figura 24). Este método se basa en una lisis alcalina y en una purificación del ADN plasmídico mediante columnas de intercambio iónico.

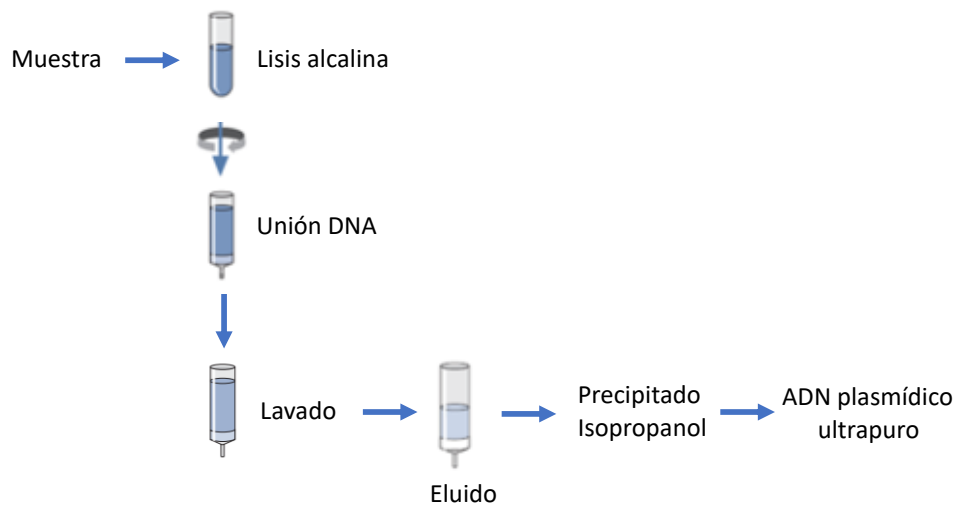


Figura 24. Esquema extracción de ADN plasmídico. Esquema de la extracción de ADN con el kit Qiagen Plasmid Maxi[®]. Muestra los pasos seguidos en el proceso de extracción.

Las partículas virales de NL4.3 se generaron mediante una transfección en las células 293T con el plásmido pNL4.3. Las células HEK 293 T (American Type Culture Collection, ATCC[®]) (235) se cultivaron durante 24 horas en una placa de 6 pocillos a una concentración de 5×10^5 células por pocillo. Las células se mantuvieron en medio DMEM (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, EE. UU.) durante 4 horas antes de realizar la transfección. La mezcla de transfección de 200 μ l de HBS (HEPES 50mM, Na₂HPO₄ 1.5mM, NaCl 140mM, pH 7.05), 200 μ l de CaCl₂ 250 mM y 4 μ g del plásmido pNL4.3 se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente y se añadió poco a poco al cultivo celular 293T. Tras una incubación de 18 horas a 37°C, 5% CO₂ y 90% de humedad, se eliminó el sobrenadante y se añadió medio DMEM fresco. Tras 18 h de incubación se recogió el cultivo celular y se centrifugó durante 5 minutos a temperatura ambiente a 1500 rpm. Con el sobrenadante obtenido se realizaron alícuotas en criotubos de 500 μ l y se guardaron a -80°C. La titulación del virus se llevó a cabo mediante una técnica de ELISA (Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas del inglés Enzyme-Linked Immunosorbent Assay).

2.2.2. Detección de la proteína p24 del VIH-1

Los niveles de la proteína p24 del VIH-1 fueron cuantificados en los sobrenadantes de los experimentos *in vitro* correspondientes a los modelos de latencia y a los co-cultivos mediante una técnica de ELISA (INNOTEST® HIV Antigen mAb Innogenetics, Barcelona, España).

2.2.3. Obtención y cultivo de células mononucleares de sangre periférica

A partir de sangre de donantes sanos (procedente del Centro de Transfusiones de Madrid) se llevó a cabo la separación de las PBMCs (células mononucleares en sangre periférica) empleando un gradiente de densidad con Ficoll Hypaque (Rafer S.L., Zaragoza, España) mediante centrifugación a 2000 rpm durante 30 minutos. A continuación, se recogió la fase intermedia y se realizó un lavado con tampón fosfato salino (PBS, del inglés *Phosphate Saline Buffer*) (Lonza, Verviers, Bélgica) mediante centrifugación a 1500 rpm durante 10 minutos. Para la eliminación de eritrocitos se añadió solución de lisado (Red Blood Cell Lysis, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, EE. UU.) durante 10 minutos a 4°C. Finalmente se realizaron dos lavados con PBS mediante centrifugación a 1500 rpm durante 10 minutos. Las células obtenidas se cuantificaron en cámara de Neubauer (Incyto, Chungnam-do, Corea), se resuspendieron y se cultivaron a 37°C, 5% CO₂ y 90% humedad en medio RPMI completo a una concentración de 5x10⁶ células/mL.

2.2.4. Purificación de las poblaciones celulares T CD4⁺ memoria reposo

Los linfocitos T CD4⁺ de memoria en reposo se aislaron a partir de PBMCs mediante una separación magnética llevada a cabo en tres pasos (Miltenyi Biotec, Bergisch Galdbach, Alemania). En primer lugar, se realizó una selección negativa para evitar la activación de los linfocitos T CD4⁺. Para ello se utilizó un cóctel de anticuerpos monoclonales marcados con biotina carente de anti-CD4 que reconocen diferentes antígenos de superficie (anti-CD8, -CD14, -CD16, -CD19, -CD36, -CD56, -CD123, -CD235a, anti-TCR γ/δ y anti-glicoporina A). A continuación, se llevó a cabo una segunda separación empleando un coctel de anticuerpos monoclonales anti-biotina y anticuerpo monoclonal anti-CD61. Por último, se realizó una

tercera separación magnética mediante una selección negativa en la que se emplearon anticuerpos anti-HLA-DR y anti-CD25, para obtener finalmente linfocitos T CD4⁺ CD25⁻ HLA-DR⁻ (linfocitos T CD4⁺ en reposo).

2.2.5. Modelo celular basado en IL-7

Debido a la baja frecuencia de células infectadas de forma latente en pacientes con TAR, empleamos un modelo de latencia *in vitro* para poder probar nuestra estrategia de reactivación con Gal-9. Los modelos de latencia de VIH-1 en células T CD4⁺ en reposo deben permitir la integración viral mientras que se mantienen bajos los niveles de expresión viral. Se ha descrito recientemente un modelo de latencia basado en el tratamiento con la interleuquina 7 (IL-7) (R&D Systems, Minneapolis, MN) en células T CD4⁺ en reposo. La IL-7 es la citoquina responsable de la proliferación homeostática de los linfocitos T de memoria de transición en pacientes con VIH-1 (236). La concentración de IL-7 empleada en el modelo de latencia es la necesaria para inducir la activación celular pero suficiente para la proliferación homeostática (237).

El modelo de latencia (236) se realizó a partir de las células T CD4⁺ de memoria en reposo obtenidas según el apartado 6. Las células se cultivaron con RPMI completo a 37°C, 5% CO₂ y 90% humedad, durante 5 días en presencia de IL-7 (1nM) para facilitar la entrada del virus y sin añadir IL-7 que es el control del experimento. Tras este periodo de incubación se llevó a cabo la infección con el virus X4-NL4.3 obtenido como se describe en el apartado 1 y tratado con DNasa (Quiagen, Hilden, Alemania) y MgCl₂ antes de realizar la infección. Las células se infectaron con 10pg de p24 de virus NL4.3 por millón de células y se incubaron mediante rotación durante 2 h a temperatura ambiente y se centrifugaron durante 2h 2000 rpm a 25°C. Tras una serie de lavados con PBS 1 x, las células infectadas se cultivaron con RPMI completo suplementado con IL7 (1nM) y sin IL-7, más IL-2 (Sigma Aldrich, San Luis, Misuri, EE. UU.) (10 IU/ml) y se incubaron a 37°C al 5% de CO₂ y al 90% de humedad durante 5 días. Este modelo lo utilizaremos en diferentes experimentos que se describen a continuación.

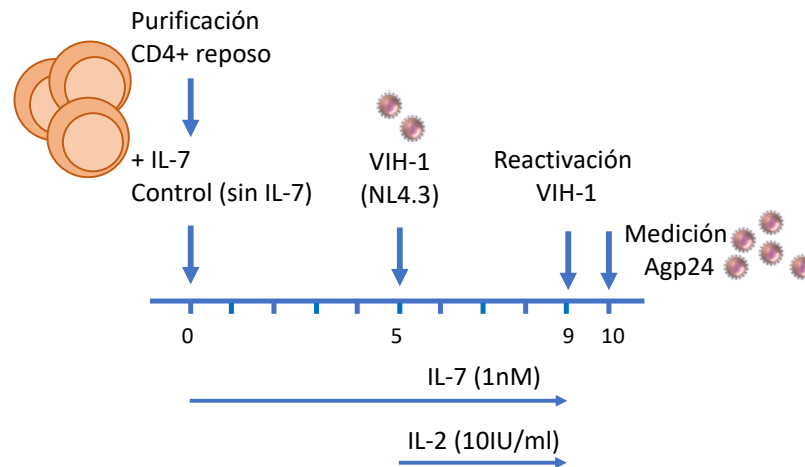


Figura 25. Esquema de la realización del modelo de latencia. Adaptado de (106).

Reactivación mediada por Gal-9: Se llevó a cabo la reactivación en las células T CD4⁺ de VIH-1 empleando un modelo de latencia basado en IL-7 (apartado 7, Figura 3.). En una placa de 96 pocillos (800.000 céls/pocillo en RPMI), se añadió Gal-9 a diferentes concentraciones (2 nM, 5 nM, 200 nM, 500 nM y 1000 nM), sola o en combinación con el anticuerpo frente a TIM-3 (5µg/ml), como control positivo 100 nM de PMA y como control negativo 1µl/ml DMSO y se incubó en estufa a 37°C, 5% de CO₂ y 90% de humedad durante 18 horas. Transcurrido el tiempo de incubación, la reactivación del VIH-1 se determinó mediante la cuantificación de los niveles del antígeno p24 del VIH-1 en los sobrenadantes del cultivo.

Reactivación mediada por Gal-9 en combinación con tunicamicina: Como se ha comentado anteriormente, la reactivación que realiza Gal-9 no está mediada a través de TIM-3, sino que parece que interacciona con un patrón de superficie de oligosacáridos. Para demostrarlo se utilizó tunicamicina, un antibiótico que destruye este patrón de oligosacáridos y, en consecuencia, debe provocar que Gal-9 no pueda llevar a cabo la reactivación.

Empleando la misma técnica se llevó a cabo la reactivación del virus con Gal-9 sola o en combinación con tunicamicina (R&D Systems, Minneapolis, MN, EE. UU.) y en presencia o ausencia del anticuerpo frente a TIM-3. Se incubó durante 18h a 37°C, 5% CO₂ y 90% humedad y se cuantificó los niveles de Agp24 (antígeno p24).

Reactivación mediada por Gal-9 en combinación con ARLs: Por otro lado, evaluamos el papel reactivador de Gal-9 en combinación con otros ARLs (Tabla 5A) solos y en combinaciones sencillas o múltiples (Tabla 5B) durante 18 h en el modelo de células T CD4⁺ latentemente infectadas. La reactivación del VIH-1 se midió por producción de Agp24.

A)

ARL ÚNICOS	COMBINACIÓN SENCILLA	COMBINACIÓN MÚLTIPLE
Gal-9	-	-
MVC	Gal-9+MVC	Gal-9+ MVC +JQ1+Bry
JQ1	Gal-9+JQ1	Gal-9+ JQ1+Vor +Bry
Vor	Gal-9+Vor	Gal-9+ Vor+ JQ1+MVC
Bry	Gal-9+Bry	Gal-9+ Bry +Vor +MVC
RMD	Gal-9+RMD	-
DS	Gal-9+DS	-

B)

ARL	Concentración
Gal-9	2nM
Maraviroc (MVC)	25mg/ml
JQ1	1µM
Vorinostat (Vor)	500nM
Briostatina (Bry)	100nM
Romidepsina (RMD)	40nM
Disulfiram (DS)	500nM

Tabla 5. A) Combinación de los diferentes ARLs. B) Concentración empleada de los ARLs.

2.2.6. Extracción del ADN total

Para la realización de la extracción de ADN total se empleó el “QuiAmp DNA blood mini Kit® (Qiagen, Hilden, Alemania). La extracción de ADN se realiza en diferentes pasos (Figura 26). En primer lugar, se lleva a cabo la lisis del pellet celular empleando el tampón de lisis AL y proteasa y se incuba durante 10 minutos a 56°C. A continuación, se añade etanol al 100%. Esta mezcla se pasó a través de una columna que posee una membrana de sílice a la que se unirá el ADN mediante centrifugación. El siguiente paso es la eliminación de los contaminantes mediante un lavado con la solución AW1 y un lavado con AW2. Finalmente, se eluye con 25 µl de tampón AE.

Se determinó la concentración y la pureza del ADN mediante el espectrofotómetro Nanodrop® ND-2000 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, EEUU). Las muestras de DNA se guardaron a -80°C para su posterior utilización.

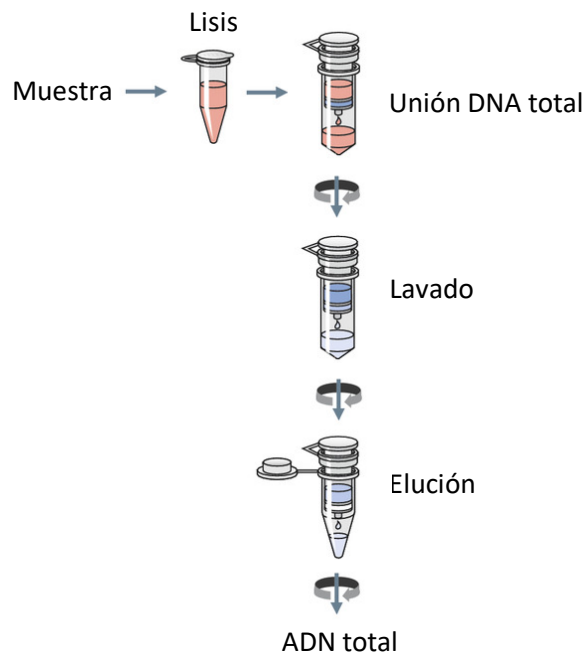


Figura 26. Esquema de la extracción de ADN con el kit QuiAmp DNA blood mini® (Qiagen). Muestra los pasos seguidos en el proceso de extracción empleando columnas de sílice.

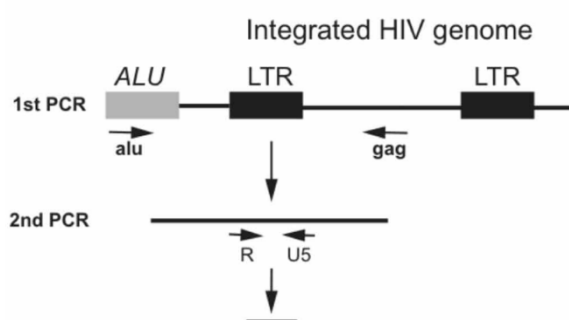
2.2.7. Cuantificación de la integración del VIH-1

El análisis del ADN integrado se llevó en dos partes. En primer lugar, se realizó una PCR de integración utilizando 20 ng de ADN obtenido según el apartado 9 y se mezclaron con varios cebadores (tabla 2) y con TaqDNA en un volumen final de 20 µl. Las condiciones de PCR son las siguientes: 8 min a 95°C, 1 min a 95°C, 1 min a 60°C. 10 min a 72°C, 15 min a 72°C durante 12 ciclos.

Las secuencias Alu son secuencias de ADN repetitivas que están ampliamente dispersas dentro del genoma humano. El nombre Alu deriva del sitio de la enzima de restricción, Alu I, dentro de la secuencia repetitiva. Las secuencias de Alu se emplean como marcadores para cuantificar el ADN de VIH-1 integrado. Se utilizaron los cebadores que flanquean la

secuencia Alu y gag del gen estructural de VIH-1 para amplificar dicha secuencia del gen. Solo la forma integrada de las copias genómicas del VIH-1 se amplifican exponencialmente.

En la segunda PCR, qPCR (PCR cuantitativa), se empleó el cebador directo R y el cebador inverso U5, que flanquean la región LTR viral (238). Se empleó una curva estándar de ADN integrado de la línea celular 8E5 con los cebadores Lambda T, AA55M y MH603 y el gen CCR5 como mantenimiento con los cebadores forward and reverse y se cuantificó empleando un LightCycler 480 Instrument II (Roche Applied Science, Penzberg, Alemania).



Alu 1	TCCCAGCTACTGGGGAGGCTGAG
Alu 2	GCCTCCCAAAGTGCTGGGATTAC
M667	ATGCCACGTAAGCGAAACTCTGGCTAACTAGGGAACCCACTG
MH603	ACACTACTTTGAGCACTCAA
Lambda T	ATGCCACGTAAGCGAAACT
AA55M	GCTAGAGATTTCCACACTGACTAA
CCR5_F	GCTGTTTGCCTCTCTCCAGGA
CCR5_R	CTCACAGCCCTGTGCCTCTCTTC

Tabla 6. Cebadores utilizados para cuantificar la integración del DNA.

3. Evaluación del bloqueo de la unión de Gal-9 a TIM-3 en la restauración de la actividad CTL de los linfocitos T CD8⁺ y NK

Para evaluar la mejora de la respuesta CTL mediante la interacción de Gal-9 con TIM-3 se emplearon diferentes tipos de co-cultivos (CD4⁺t (totales):CD8⁺, CD4⁺t: NK, CD4⁺t:CD8⁺: NK).

3.1. Purificación de las poblaciones celulares T CD4⁺ t, células T CD8⁺ y células NK

A partir de las PBMCs obtenidas según el apartado 2.2.3., se llevó a cabo la purificación de las células T CD4⁺ totales, células T CD8⁺ y células NK mediante una separación magnética de selección positiva (Miltenyi Biotec, Bergisch Galdbach, Alemania). Para ello se utilizan anticuerpos anti-CD4 para los linfocitos T CD4⁺ t, anticuerpos anti-CD56 para las células NK y anticuerpos anti-CD8 para los linfocitos CD8⁺.

Los diferentes tipos celulares aislados se cultivaron en RPMI completo en estufa a 37°C a 5% CO₂ y 90% humedad a una concentración de 5x10⁶ células/mL.

3.2. Modelo *in vitro*. Co-cultivos CD4⁺t:CD8⁺, CD4⁺t: NK, CD4⁺t:CD8⁺: NK

Las células se cultivaron en RPMI completo, y sólo a las células T CD4⁺ se les añadió IL2 (10µl/ml) y PHA (Sigma Aldrich, San Luis, Misuri, EE. UU.) (1µl/ml) para su activación durante 2 días. Tras los 2 días, se pusieron en co-cultivo las células T CD4⁺t:CD8⁺, CD4⁺t: NK, CD4⁺t:CD8⁺: NK, (ratio 1:1) en placas de 96 pocillos (800.000 células/pocillo) en RPMI completo suplementado con IL2 (10µl/ml) y se trataron durante 20h con Gal-9 sola o en combinación con el anticuerpo frente a TIM-3 a diferentes concentraciones. Tras el tiempo de incubación de 20h se llevó a cabo una infección con el virus VIH-1 BaL (5µl/millón de células) mediante centrifugación 2500 rpm 22°C durante 1 hora. A continuación, se incubó la placa durante 1 hora a 37°C, 5% de CO₂ y 90% de humedad. Tras el tiempo de incubación de realizaron 2 lavados con medio RPMI. Finalmente, se resuspendieron las células con RPMI completo y suplementado con IL-2 (10µl/ml). Se recogieron sobrenadantes a diferentes tiempos, 3, 7 y 10 días (Figura 5).

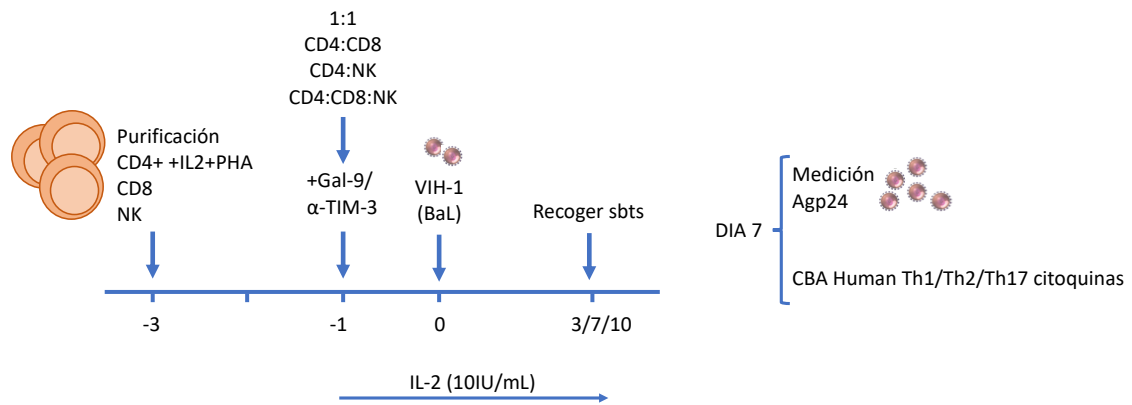


Figura 27. Esquema de los pasos seguidos en los experimentos de co-cultivo *in vitro*.

Con los sobrenadantes de los co-cultivos recogidos a día 7 se midió la actividad CTL por producción de Agp24 y además se llevó a cabo la medición de citoquinas, empleando kit BD™ Cytometric Bead Array (CBA) Human Th1/Th2/Th17 Cytokine (BD Biosciences, San Jose, CA, EE. UU.), descrito a continuación.

3.2.2. Determinación de citoquinas Th1/Th2/Th17 por Cytometric Bead Array

Esta técnica está basada en el uso de unas microesferas de tamaño y fluorescencia conocida que permite ser detectada mediante citometría de flujo. Cada microesfera está conjugada con un anticuerpo específico. Por otro lado, se emplea ficoeritrina combinada con anticuerpos que proporciona una señal fluorescente proporcional a la muestra analizada. Las microesferas y el reactivo de ficoeritrina se incuban con la muestra durante 3h y tras una serie de lavados se lleva a cabo la medición mediante citometría de flujo. En el citómetro se emplea un programa específico que nos permite detectar las diferentes citoquinas interleuquina-2 (IL-2), interleuquina-4 (IL-4), interleuquina-6 (IL-6), interleuquina-10 (IL-10), Factor de Necrosis tumoral-alfa (TNF-α), interferón gamma (IFN-γ) e interleuquina-17A (IL-17A).

Para la medición de citoquinas se emplearon los sobrenadantes obtenidos en los co-cultivos realizados según el apartado 3.2 a día 7.

De forma específica la técnica se llevó a cabo en dos pasos:

1. Preparación de los estándares siguiendo los pasos siguiendo de acuerdo a las recomendaciones de la casa comercial.

2. Preparación de las muestras:

-Teniendo en cuenta el número de muestras a analizar, se mezclaron los reactivos *capture beads*.

-La preparación de las muestras se llevó a cabo como se describe a continuación:

-Curva: 50µl PE+ 50µl mix microesferas +50µl de la dilución correspondiente

-Muestra: 50µl PE +50µl mix microesferas +50µl de la muestra correspondiente

-Se incubó durante 6h 30 min a temperatura ambiente y protegido de la luz

-Pasado el tiempo de incubación se añadió 1ml de la solución de lavado, se centrifugó 5 minutos a 1250 rpm y se decantó con cuidado. Para finalizar se añadió 300µl de la solución de lavado.

-Las muestras se analizaron con un citómetro de flujo Beckman Coulter (Bra,CA,EE. UU.).

3.3. Modelo *in vitro*. Co-cultivos CD4 reposo latentemente infectadas y células CD8⁺

Empleando el modelo de latencia obtenido según el apartado 7 se realizó el co-cultivo con las células T CD8⁺. En placas de 96 pocillos (800.000 células/pocillo) se añaden las células T CD4⁺ en reposo latentemente infectadas y las células T CD8⁺ y un ratio 1:1, se tratan con el anticuerpo frente a TIM-3 durante 18h y se incuban en estufa 37°C, 5% CO₂ y 90% de humedad. Transcurrido este tiempo de incubación se añade Gal-9. Se recogen los sobrenadantes en diferentes tiempos, 3, 7 y 10 días. Se analizó la actividad CTL de los linfocitos T CD8⁺ mediante producción de Agp24 mediante una técnica de ELISA.

3.4. Modelo *ex vivo*. Co-cultivos CD4⁺:CD8⁺, CD4⁺: NK, CD4⁺:CD8⁺: NK

Para llevar a cabo estos experimentos se obtuvieron células T CD4⁺, células T CD8⁺ y células NK a partir de las PBMCs obtenidas de pacientes con infección por VIH-1. Los pacientes se seleccionaron entre los atendidos en las Consultas Monográficas de Infección por VIH del Servicio de Enfermedades Infecciosas del Hospital Ramón y Cajal, tras la firma del consentimiento informado.

Para este objetivo de la tesis, los pacientes debían estar recibiendo tratamiento antirretroviral y con carga viral suprimida (<37 copias/ml) durante al menos 12 meses. A los pacientes se les realizó una extracción mediante venopunción de 200 mL de sangre total en tubos de 10mL con EDTA (ácido etilendiamino tetracético) como anticoagulante (BD Vacutainer® Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EE. UU.). A partir de la sangre obtenida, se llevó a cabo el aislamiento de PBMCs según se describe en el apartado 5 y posteriormente se realizó el aislamiento de las subpoblaciones celulares T CD4⁺, T CD8⁺ y NK (apartado 6) y se incubaron en RPMI completo. Sólo en el caso de las células T CD4⁺ se suplementó el medio con IL2 (10µl/ml) y PHA (1µl/ml) para su activación durante dos días en estufa a 37°C, 5% de CO₂ y 90% de humedad. Transcurrido los dos días, se llevó a cabo el tratamiento de las células T CD8⁺ y NK con el anticuerpo frente a TIM-3 y se incubó durante 24 horas. Pasado el tiempo de incubación se llevó a cabo el co-cultivo CD4⁺:CD8⁺, CD4⁺: NK, CD4⁺:CD8⁺: NK, (ratio 1:1) en placas de 96 pocillos (800.000 células/pocillo) en RPMI completo suplementado con IL2 (10µl/ml). A continuación, se realizó la infección con el virus VIH-1 BaL (5µl/millón de células) mediante centrifugación 2500 rpm 22°C durante 1 hora. A continuación, se incubó la placa durante 1 hora a 37°C, 5% de CO₂ y 90% de humedad. Tras el tiempo de incubación se realizaron 2 lavados con medio RPMI. Finalmente, se resuspendieron las células con RPMI completo y suplementado con IL-2 (10µl/ml) y se añadió Gal-9 en los pocillos correspondientes. Se recogieron sobrenadantes a diferentes tiempos, 3, 7 y 10 días.

Con los sobrenadantes recogidos se llevó a cabo la medición de Ag24 con el kit Zeptometrix y la medición de citoquinas con el Kit ProcartaPlex™ Multiplex Immunoassay (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, EE. UU.).

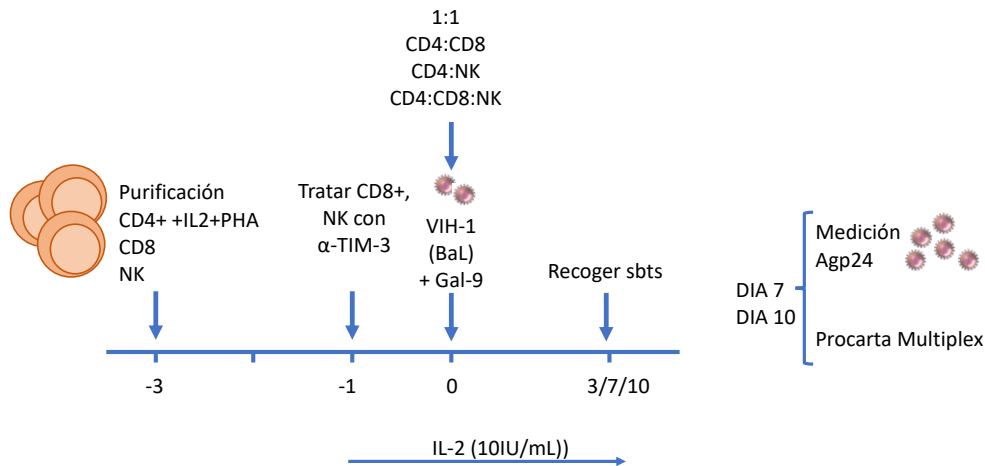


Figura 28. Esquema de los pasos seguidos en los experimentos de los co-cultivos *ex vivo*.

3.4.1. Detección de la proteína p24 del VIH-1

Para el análisis del antígeno p24 de los sobrenadantes de los experimentos *ex vivo* empleamos la técnica de ELISA HIV Type 1 p24 2.0 (Zeptometrix, Buffalo, NY, USA).

3.4.2. Determinación de citoquinas Th1/Th2/Th17. ProcartaPlex™ Multiplex Immunoassay

Los inmunoensayos ProcartaPlex Multiplex Immunoassay (ThermoFisher Scientific Inc., Waltham, MA, EE.UU.) incorporan unas microesferas magnéticas que permite la detección simultánea y cuantificación de diferentes proteínas. En primer lugar, se prepara la curva de los estándares siguiendo los pasos del protocolo, a continuación se añaden las microesferas de las citoquinas a analizar (IL-2, IL1-7A, IL-4, IL-6, IL-10, Granzima A, Granzima B, Perforina, TNF- α , IFN- γ), se realizan 2 lavados con solución de lavado y se añaden las muestras a analizar, se incuban durante 1h 30 min a temperatura ambiente y en agitación. Se realizan 2 lavados y se añade el anticuerpo de detección, incubando la placa durante 30 min a temperatura ambiente y en agitación. A continuación, se realizan 2 lavados y se añade Estreptavidina llevando a cabo una incubación de 30 minutos a temperatura ambiente en agitación. Finalmente se realizan 2 lavados y se añade solución de lectura. Se mide el nivel de citoquinas en Labscan3D one Lambda Luminex™200™ (Rafer, España).

4. Consideraciones éticas

El estudio fue aprobado por el CEIC (Comité Ético de Investigación Clínica) del Hospital Universitario Ramón y Cajal y durante su realización se respetaron los principios de la declaración de Helsinki. Todos los pacientes incluidos en el estudio firmaron un consentimiento informado.

5. Análisis estadístico

El análisis estadístico utilizado para examinar las diferencias entre las diferentes muestras analizadas fue la prueba t para muestras independientes (T test). Los valores $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos.

El análisis de los datos se llevó a cabo utilizando el software GraphPad Prism v5.0 y el paquete estadístico SPSS IBM versión 21.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL, EE. UU.).

Resultados

1. Toxicidad de Gal-9 y α -TIM-3 en células VERO

Para comprobar tanto si Gal-9 como el anticuerpo para bloquear TIM-3 producían toxicidad celular, se emplearon las células VERO, utilizadas para probar la citotoxicidad de diferentes fármacos. Las imágenes fueron tomadas tras una incubación de 48h con los diferentes reactivos. Como control positivo se utilizó DMSO. En él se observó a las 24 h cierta citotoxicidad y a partir de las 48 h una destrucción total de las células en los pocillos control.

En cuanto a Gal-9 hubo una conservación total de la monocapa celular tanto a una concentración de 2 nM como 200 nM (Figura 29). Cuando evaluamos el efecto tóxico del anticuerpo frente a TIM-3, sólo la concentración de 10 μ g/ml, que es el doble de la que nosotros usamos en los diferentes experimentos, fue la única con la que observamos cierta destrucción celular (Figura 30). Esto nos demostró la baja toxicidad tanto de Gal-9 como de α -TIM-3 usados en cultivos celulares.

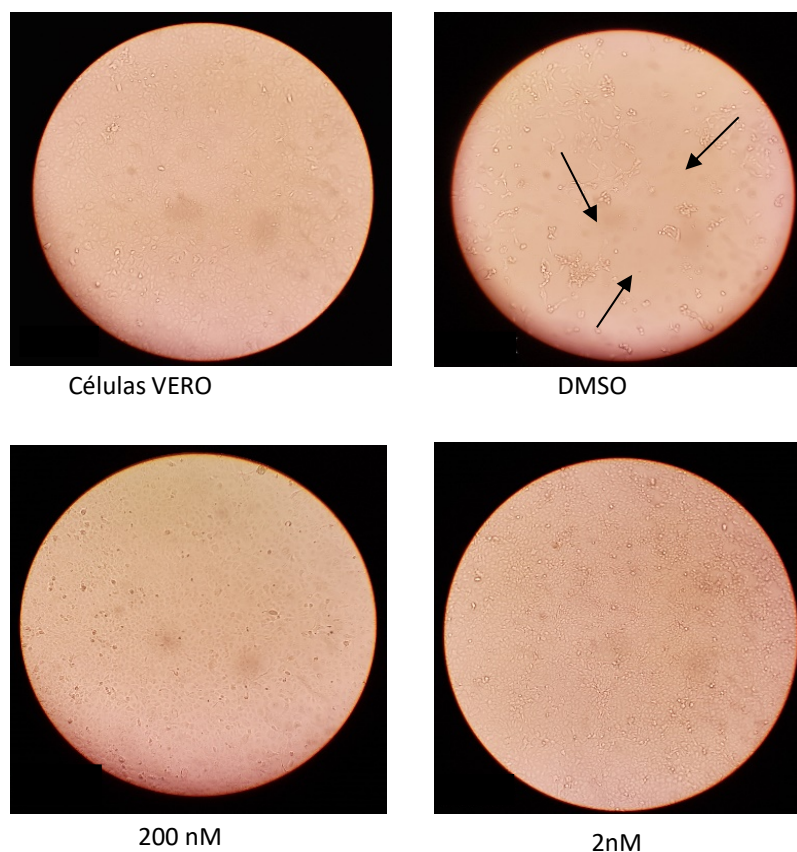


Figura 29. Imágenes de toxicidad en células VERO con Gal-9 a diferentes concentraciones (200nM y 2nM). Control negativo solo células VERO, control positivo añadiendo DMSO.

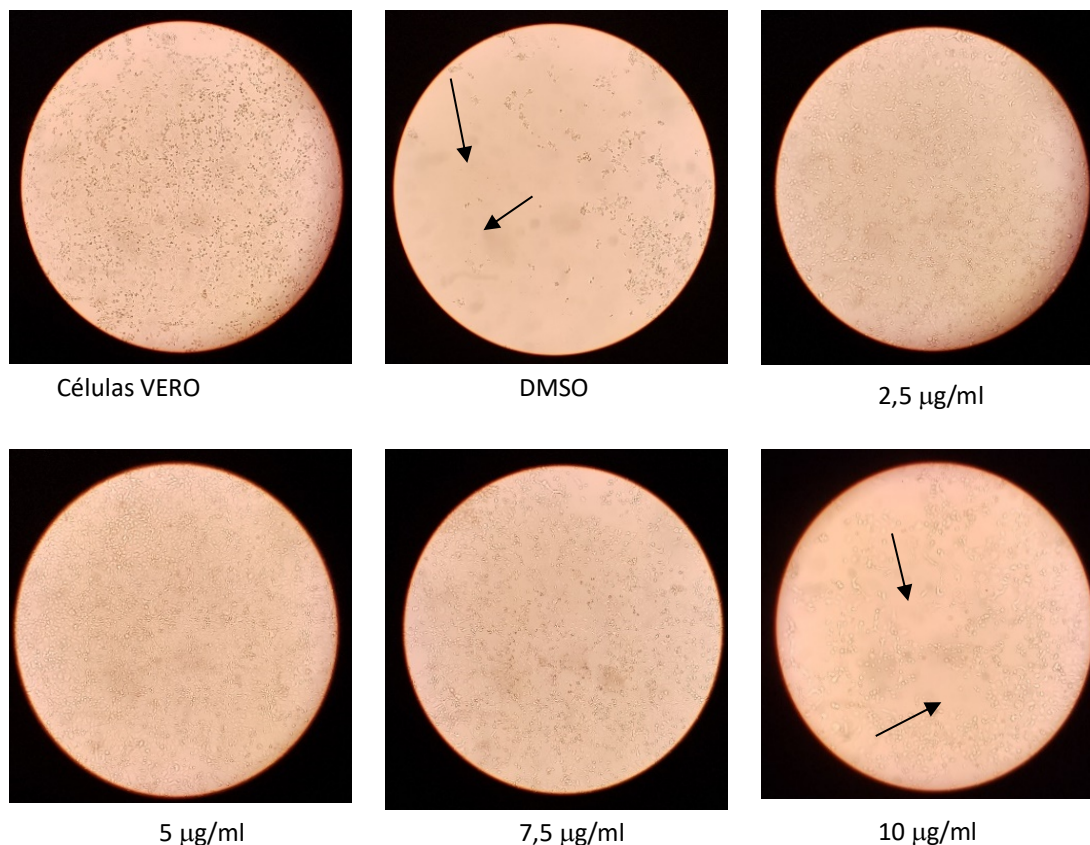


Figura 30. Imágenes de toxicidad en células VERO con α -TIM-3 a diferentes concentraciones (2,5 μ g/ml, 5 μ g/ml, 7,5 μ g/ml, 10 μ g/ml). Control negativo solo células VERO, control positivo añadiendo DMSO.

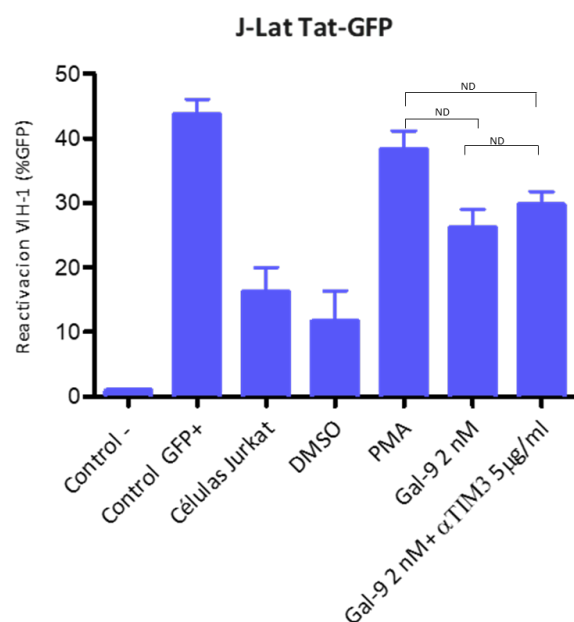
2. Reactivación de VIH-1 latente mediada por Gal-9

2.1. Reactivación de VIH-1 mediada por Gal-9 en células Jurkat-LAT-GFP

Para evaluar la reactivación del VIH-1 se emplearon las células Jurkat latentemente infectadas (Jurkat-LAT-GFP). Estas células presentan una construcción retroviral LTR-Tat-IRES-GFP en la que se ha sustituido el gen de la envuelta viral por el gen de la proteína GFP. De esta manera una reactivación viral tras estimulación se asociaría con un incremento de GFP pudiendo medir la expresión de la misma mediante citometría de flujo. El porcentaje de expresión de GFP en el control positivo tras una incubación de 18h con PMA fue de un 38,3%, mientras que con Gal-9 a una concentración 2 nM fue de un 28% ($p=0,065$) y en presencia del anticuerpo frente a TIM-3 de un 31% ($p=0,089$) (Figura 31).

Estos resultados nos indican que la reactivación mediada por Gal-9 no se llevó a cabo vía TIM-3 sino mediante una vía independiente ya que el bloqueo del mismo mediante un

anticuerpo no afectó al porcentaje de reactivación viral, no observándose diferencia significativa ($p=0,3$).



Condiciones	Reactivación VIH (%GFP)
Control -	0,96
Control GFP+	43,7
Células Jurkat	16,18
DMSO	11,64
PMA	38,27
Gal-9 2nM	26,25
Gal-9 2nM+αTIM-3 5μg/mL	29,71

Figura 31. Reactivación de VIH-1 en las células Jurkat-LAT-GFP. ND=no hay diferencias significativas ($p<0,05$) entre las muestras analizadas.

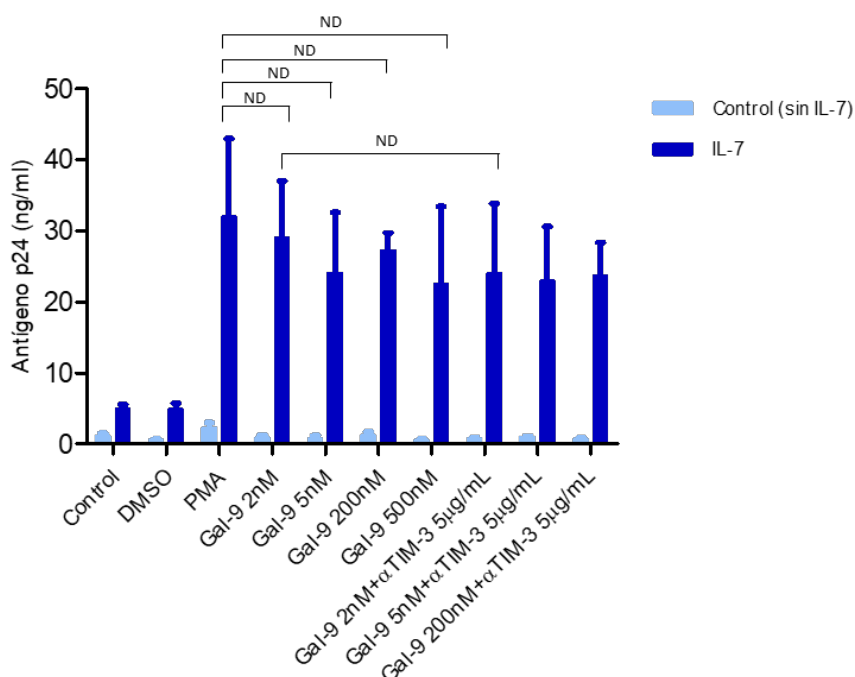
2.2. Reactivación de VIH-1 mediada por Gal-9 en modelos de latencia en células T CD4⁺ basado en IL-7

2.2.1 Reactivación mediada por Gal-9

Para probar nuestra estrategia de reactivación de Gal-9, utilizamos un modelo de latencia *in vitro* basados en la IL-7 (Interleuquina 7), citoquina responsable de la proliferación homeostática de las células T de memoria. Por lo tanto, es un modelo de latencia de VIH-1 en células T CD4⁺ que permite la integración viral y mantiene bajos los niveles de expresión

viral. Utilizamos diferentes concentraciones de Gal-9 (2nM, 5nM, 200nM y 500nM) para comprobar si existían diferencias y cuál tiene mayor potencia de reactivación.

La reactivación del VIH en el modelo de latencia llevada a cabo por Gal-9 2 nM fue de 29 ng/ml frente a 32ng/ml que presentó el control positivo PMA ($p=0,64$). En cuanto a las diferentes concentraciones empleadas de Gal-9 no se observó ninguna diferencia significativa entre la capacidad reactivadora de cada una de ellas (Gal-9 5nM 24ng/ml $p=0,21$, Gal 200 nM 27.3 ng/ml $p=0,36$, Gal-9 500 nM 23ng/ml $p=0,41$) ni en combinación con el anticuerpo frente a TIM-3 (Gal-9 2 nM+ α -TIM-3 24ng/ml $p=0,39$, Gal-9 5 nM+ α -TIM-3 23ng/ml $p=0,38$, Gal-9 200 nM+ α -TIM-3 36.6 ng/ml $p=0,41$). Este resultado nos confirma que Gal-9 es un potente reactivador de la latencia y que actúa a través de una vía independiente de TIM-3 (Figura 32).



Condiciones	Control (Sin IL-7) Agp24 (ng/mL)	IL-7 Agp24 (ng/mL)
Control	1,09	4,89
DMSO	0,53	5,02
PMA	2,28	32
Gal-9 2nM	0,85	29,08
Gal-9 5nM	0,71	24,05
Gal-9 200nM	1,17	27,24
Gal-9 500nM	0,58	22,46
Gal-9 2nM+ α TIM-3 5 μ g/mL	0,83	24,08
Gal-9 5nM+ α TIM-3 5 μ g/mL	0,97	22,98
Gal-9 200nM+ α TIM-3 5 μ g/mL	0,74	23,64

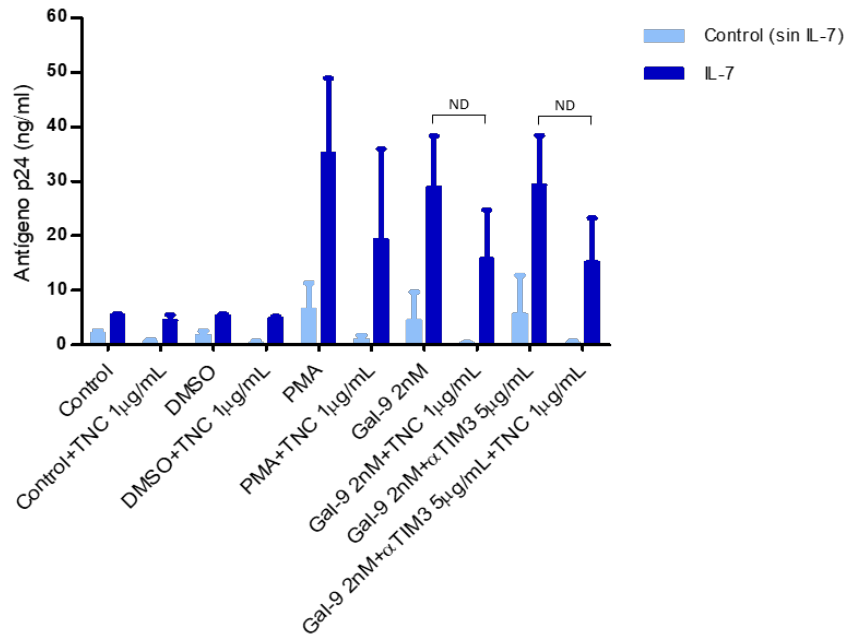
Figura 32. Reactivación de VIH-1 en el modelo de latencia basado en IL-7. ND=no hay diferencias significativas ($p<0,05$) entre las muestras analizadas.

2.2.2. Reactivación mediada por Gal-9 en combinación con tunicamicina

Para confirmar que Gal-9 reconoce un patrón específico de las células T CD4⁺ latentemente infectadas y que no reactiva vía TIM-3, empleamos un fármaco (antibiótico) tunicamicina (TNC), que destruye este patrón de oligosacáridos que reconoce Gal-9 en las células de memoria en reposo dando lugar a la posterior reactivación viral. Era esperable por tanto que tras el tratamiento con TNC la reactivación de VIH fuese menor o nula.

Empleando un modelo de latencia basado en IL-7, observamos una reactivación del VIH-1 llevado a cabo por Gal-9 2 nM de 29 ng/ml, no habiendo diferencias significativas con el control positivo PMA 32 ng/m ($p=0,12$) ni con Gal9 2 nM+ α -TIM-3 29.4 ng/ml ($p=0,23$). Sin embargo, cuando se trató de forma combinada con TNC la reactivación bajó considerablemente. La medición del antígeno p24 con Gal9 2nM+TNC fue de 15 ng/ml y Gal9 2 nM+ α -TIM-3+TNC de 15,2 ng/mL (Figura 33). Esto nos confirmó que el reconocimiento que hace Gal-9 de este patrón específico de oligosacáridos que presentan las células TCD4⁺ latentemente infectadas es necesario para llevar a cabo una correcta reactivación del VIH-1.

Al comparar las diferentes concentraciones empleadas de Gal-9 observamos que no había diferencias significativas ($p=0,45$) en los porcentajes de activación viral, por lo que para los diferentes experimentos descritos a continuación empleamos la menor concentración de Gal-9, es decir, 2nM.



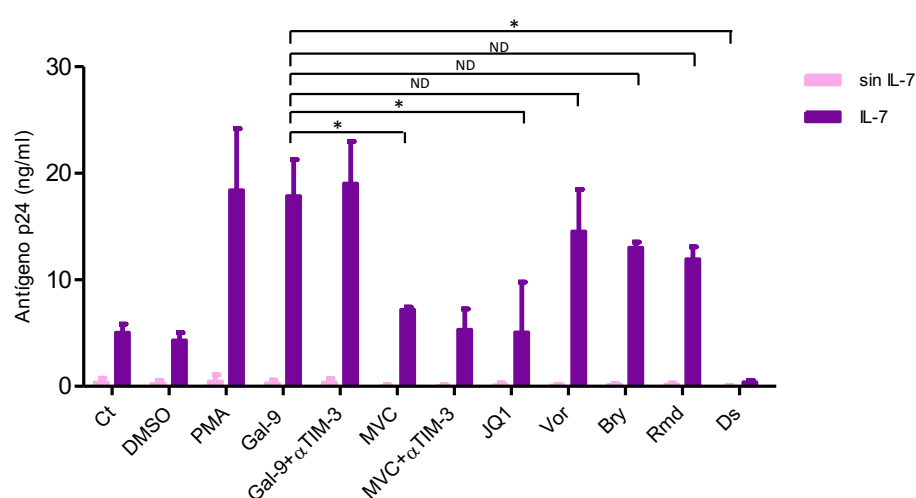
Condiciones	Control (Sin IL-7) Agp24 (ng/mL)	IL-7 Agp24 (ng/mL)
Control	2,13	5,58
Control+TNC	0,6	4,48
DMSO	1,7	5,38
DMSO+TNC	0,38	4,87
PMA	6,53	35,14
PMA+TNC	0,98	19,3
Gal-9 2nM	4,47	29,04
Gal-9 2nM+TNC	0,35	15,1
Gal-9 2nM+αTIM-3 5µg/mL	5,63	29,33
Gal-9 2nM+αTIM-3 5µg/mL+TNC	0,45	15,24

Figura 33. Reactivación de VIH-1 en un modelo de latencia basado en IL-7 mediado por Gal-9 en combinación con tunicamicina. ND=no hay diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las muestras analizadas.

2.2.3. Reactivación mediada por Gal-9 en combinación con diferentes ARLs

Estudios previos han analizado el potencial de diferentes ARLs no observándose en ningún caso tasas de reactivación del 100%, por lo que en este experimento nos hemos planteado evaluar el papel reactivador de Gal-9 en combinación con otros ARLs con el fin de comprobar si la combinación de los mismos podría incrementar el porcentaje de reactivación viral.

Empleando el mismo modelo de latencia basado en IL-7, comprobamos en un primer lugar la reactivación del virus latente mediada por los diferentes ARLs de forma individual cada uno de ellos. Obtuvimos una media de producción de Agp24 tras reactivar con PMA y Gal-9 de 18,43 ng/mL y 17,87 ng/mL respectivamente. Con el resto de los ARLs las tasas de producción de Agp24 fueron: DS (Disulfiram) 0,45 ng/mL ($p=0.001$), RMD (Romidepsina) 11,96 ng/mL ($p=0,007$), Bry (Briostatina) 13,04 ng/mL ($p=0,0018$), Vor (Vorinostat) 14,57 ng/mL ($p=0,028$), JQ1 5,09 ng/mL ($p=0,001$) y MVC (Maraviroc) 7,20 ng/mL ($p=0,001$)(Figura 34). De forma individual observamos que el ARL que presentó una mayor reactivación del VIH-1 fue Gal-9.

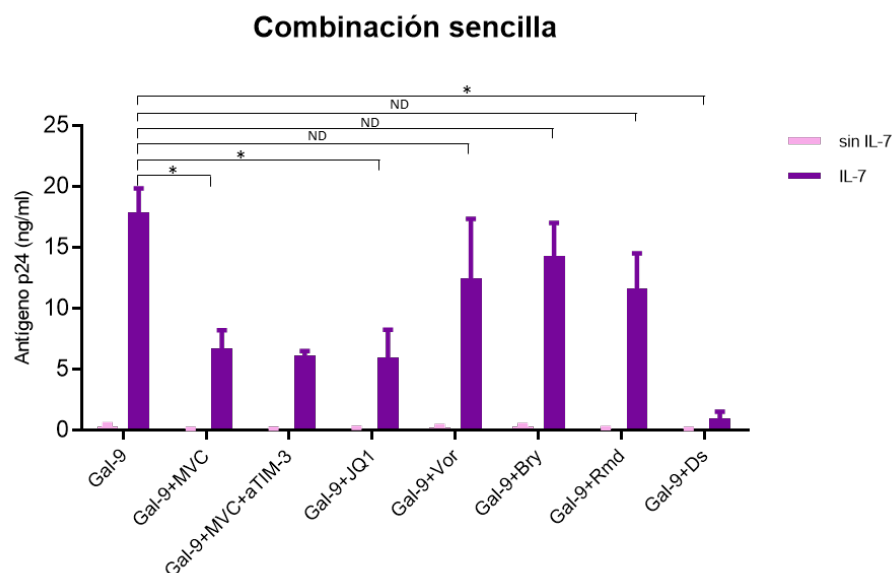


Control	Control (Sin IL-7) Agp24 (ng/mL)	IL-7 Agp24 (ng/mL)
Control	0,38	5,06
DMSO	0,26	4,35
PMA	0,49	18,43
Gal-9 2nM	0,31	17,87
Gal-9+αTIM-3	0,38	19,05
MVC	0,25	7,2
MVC+αTIM-3	0,27	5,33
JQ1	0,34	5,09
Vor	0,25	14,57
Bry	0,31	13,04
Rmd	0,29	11,96
Ds	0,22	0,42

Figura 34. Reactivación de VIH-1 en modelos de latencia basado en IL-7 mediada por diferentes ARLs. ND=no hay diferencias significativas ($p<0,05$) entre las muestras analizadas. El símbolo* indica que existe significación estadística ($p<0,05$).

Resultados

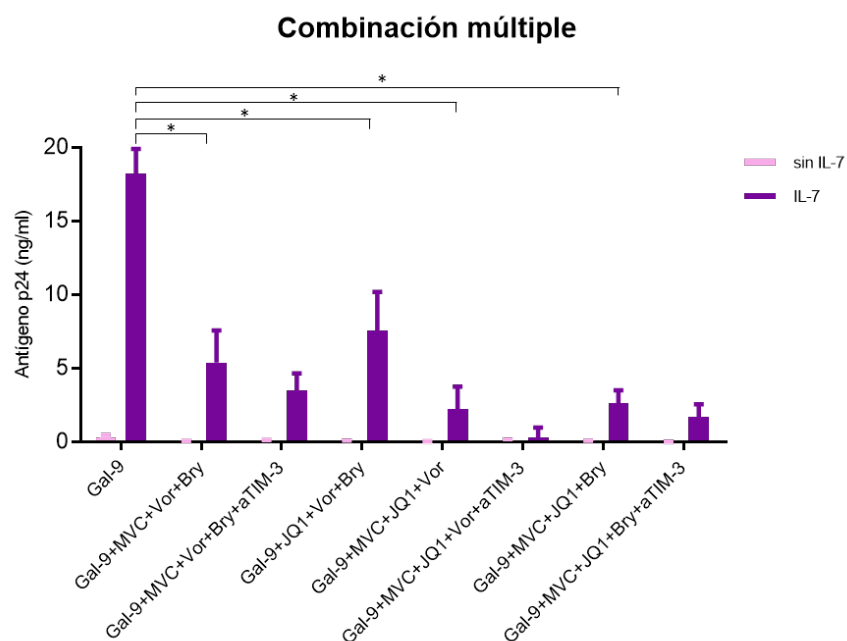
Dentro de las combinaciones sencillas las que implicaron una mayor reactivación del virus fueron: Gal-9 + Vor (12,49 ng/mL, $p=0,4$); Gal-9 + Bry (14,27 ng/mL, $p=0,37$) y Gal-9 + RMD (11,60 ng/mL, $p=0,17$) como se puede observar en la figura 3, pero en ningún caso llegaron a los valores alcanzados por Gal-9 de forma individual (Figura 35).



Condiciones	Control (Sin IL-7) Agp24 (ng/mL)	IL-7 Agp24 (ng/mL)
Gal-9+MVC	0,25	6,69
Gal-9+MVC+α-TIM-3	0,39	6,15
Gal-9+JQ1	0,45	5,99
Gal-9+Vor	0,52	12,49
Gal-9+Bry	0,59	14,27
Gal-9+Rmd	0,39	11,61
Gal-9+Ds	0,33	0,99

Figura 35. Reactivación de VIH-1 en modelos de latencia basado en IL-7 mediada por la combinación sencilla de ARLs. ND=no hay diferencias significativas ($p<0,05$) entre las muestras analizadas. El símbolo* indica que existe significación estadística ($p<0,05$).

En cuanto a las combinaciones múltiples, lejos de mostrar un sinergismo o efecto aditivo, observamos cierta tendencia antagónica ya que, en todas las combinaciones analizadas, los valores de producción de Agp24 bajaron considerablemente por debajo de los valores de cada uno de ellos individualmente (Figura 36).



Condiciones	Control (Sin IL-7) Agp24 (ng/mL)	IL-7 Agp24 (ng/mL)
Gal-9+MVC+Vor+Bry	0,21	5,39
Gal-9+MVC+Vor+Bry+α-TIM-3	0,28	3,5
Gal-9+JQ1+Vor+Bry	0,22	7,54
Gal-9+MVC+JQ1+Vor	0,35	2,24
Gal-9+MVC+JQ1+Vor+α-TIM-3	0,27	0,3
Gal-9+MVC+JQ1+Bry	0,31	2,62
Gal-9+MVC+JQ1+Bry+α-TIM-3	0,22	1,69

Figura 36. Reactivación de VIH-1 en modelos de latencia basado en IL-7 mediada por la combinación múltiple de ARLs. El símbolo* indica que existe significación estadística ($p < 0,05$).

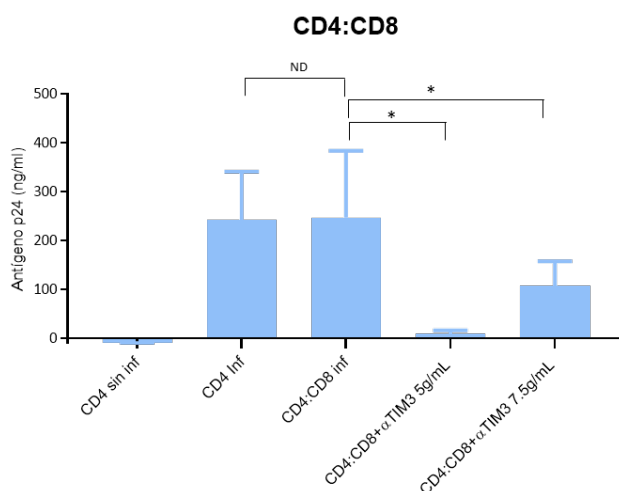
3. Efecto del bloqueo de TIM-3 en la restauración de la actividad CTL de los linfocitos T CD8⁺ y las células NK

Para evaluar la mejora de la respuesta CTL mediante el bloqueo de la interacción de Gal-9 con TIM-3 se emplearon diferentes tipos de co-cultivos *in vitro*, CD4⁺t:CD8⁺, CD4⁺t: NK, CD4⁺t:CD8⁺: NK, CD4 reposo latentemente infectada:CD8⁺ y por último co-cultivos *ex vivo* CD4⁺t:CD8⁺, CD4⁺t: NK, CD4⁺t:CD8⁺: NK.

3.1. Modelos *in vitro*

3.1.1. Co-cultivo de células T CD4⁺ totales y células T CD8⁺

El bloqueo de la interacción Gal-9: TIM-3 en las células T-CD8⁺ condujo a una disminución significativa ($p=0,014$) en la producción de Agp24 y por tanto a un control de la replicación vírica, es decir una mejora en la actividad CTL de los linfocitos T CD8⁺, empleando la concentración más baja del anticuerpo frente a TIM-3 (5 μ g/mL) (Figura 37).

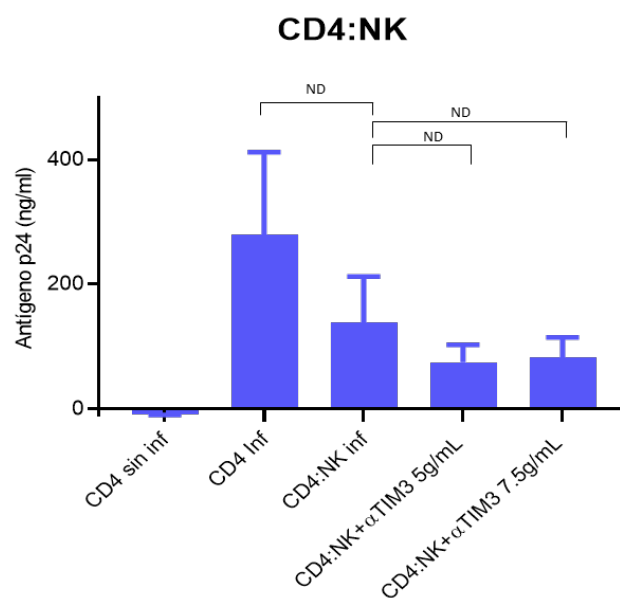


Co-Cultivos	Agp24(ng/mL)
CD4 sin infectar	-12,01
CD4 infectadas	242,48
CD4:CD8	246,87
CD4:CD8+α-TIM-3 5 μ g/mL	10,02
CD4:CD8+α-TIM-3 7,5 μ g/mL	107,84

Figura 37. Co-cultivo de células T CD4⁺t y células T CD8⁺. Efecto del bloqueo de TIM-3. ND=no hay diferencias significativas ($p<0,05$) entre las muestras analizadas. El símbolo* indica que existe significación estadística ($p<0,05$).

3.1.2. Co-cultivo de células T CD4⁺ totales y células NK

Sin embargo, en el caso del co-cultivo con las células NK, el bloqueo de la interacción Gal-9:TIM-3 ($p=0,5$) no provoca una mejora en el control de la replicación vírica como puede observarse en la figura 38, donde los valores de Agp24 son muy similares en las diferentes condiciones.



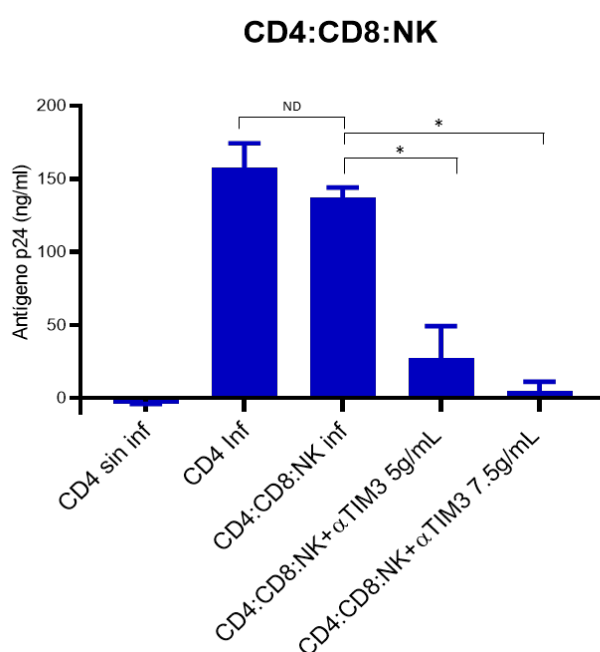
Co-Cultivos	Agp24(ng/mL)
CD4 sin infectar	-9,11
CD4 infectadas	280,18
CD4:NK	138,28
CD4:NK+α-TIM-3 5μg/mL	74,59
CD4:NK+α-TIM-3 7,5μg/mL	83,07

Figura 38. Co-cultivo de células T CD4⁺ y células NK. Efecto del bloqueo de TIM-3 ND=no hay diferencias significativas ($p<0,05$) entre las muestras analizadas.

3.1.3. Co-cultivo de células T CD4⁺ totales, células T CD8⁺ y células NK

En los co-cultivos de células T CD4⁺ junto con las T CD8⁺ y NK, observamos que el bloqueo de TIM-3 en las células NK no parece tener un efecto negativo sobre la actividad de las células T-CD8⁺ en su conjunto, mejorada por su bloqueo de TIM-3 (Figura 39). Esto nos pone de manifiesto la mejora de la respuesta CTL y por lo tanto el control de la replicación vírica (p=0,002).

No se observan diferencias significativas en cuanto a las diferentes concentraciones empleadas del anticuerpo p=0,028).

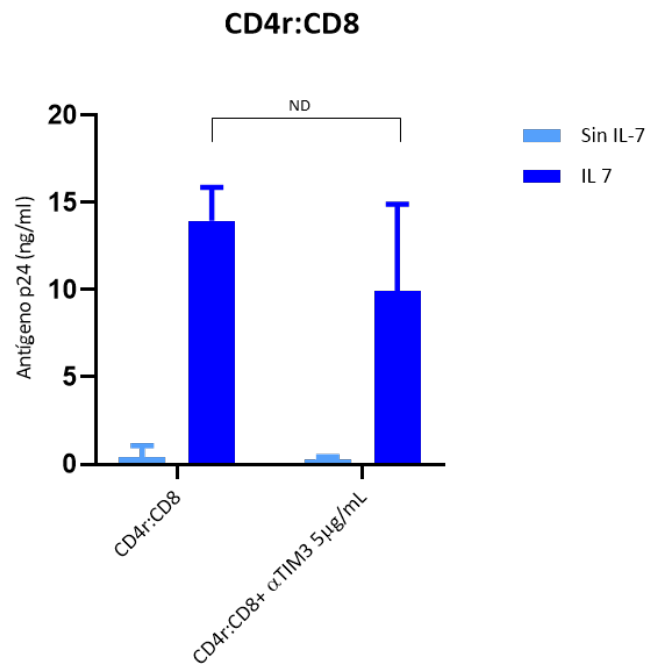


Co-Cultivos	Agp24(ng/mL)
CD4 sin infectar	-3,66
CD4 infectadas	157,71
CD4:CD8:NK	137,14
CD4:CD8:NK+α-TIM-3 5μg/mL	27,26
CD4:CD8:NK+α-TIM-3 7,5μg/mL	4,61

Figura 39. Co-cultivo de células T CD4⁺ y células T CD8⁺. Efecto del bloqueo de TIM-3. ND=no hay diferencias significativas (p<0,05) entre las muestras analizadas. El símbolo* indica que existe significación estadística (p<0,05).

3.1.4. Co-cultivos de células T CD4 reposo latentemente infectadas y células T CD8⁺

En este tipo de co-cultivo, empleamos células T CD4⁺ en reposo latentemente infectadas (modelo de latencia basado en IL7), como podemos observar en la gráfica (Figura 40), no existe diferencia significativa al utilizar el anticuerpo frente a TIM-3, ya que necesitamos un ARL para poder activar el virus.



Co-Cultivos	Control (Sin IL-7) Agp24 (ng/mL)	IL-7 Agp24 (ng/mL)
CD4r:CD8	0,4	13,96
CD4r:CD8+α-TIM-3 5µg/mL	0,26	9,93

Figura 40. Co-cultivo células T CD4⁺ latentemente infectadas con células T CD8⁺. Efecto del bloqueo de TIM-3. ND=no hay diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las muestras analizadas.

3.2. Modelo *ex vivo*

3.2.1. Características de los pacientes

Los pacientes que se incluyeron en la parte *ex vivo* fueron seleccionados en la Consulta Monográfica de VIH del Servicio de Enfermedades Infecciosas del Hospital Universitario Ramón y Cajal (Madrid). Se consideraron como criterios de inclusión que estuviesen en tratamiento antirretroviral (TAR) desde al menos 6 meses antes de la extracción analítica y que presentasen una CV plasmática indetectable (< 37 copias/mL). A su vez no debían contar con ninguna contraindicación para someterse a una extracción de sangre de 200mL.

Se incluyeron un total de 15 pacientes, de los cuales finalmente fueron evaluables 10. En el momento del estudio, todos los pacientes estaban con TAR, presentando una CV indetectable, la media de células T CD4⁺ era de 661 células/mm³, la media de células T CD8⁺ era de 920 células/mm³ y la media de nadir de las células T CD4⁺ fue de 327 células/mm³. El tiempo medio con TAR fue de 88 meses. Todos los pacientes incluidos en el estudio eran hombres (tabla 7).

Características	Pacientes									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Edad (años)	50	63	33	57	53	33	38	61	26	52
CD4 ⁺ nadir (cél/mm ³)	392	365	479	272	250	NO DATO	186	50	633	234
CD4 ⁺ (cél/mm ³)	1029	504	522	970	773	700	603	502	774	417
Ratio CD4 ⁺ /CD8 ⁺	1,07	1,04	0,8	0,7	0,99	1,2	0,4	0,6	0,8	0,4
CV (copias de ARN de VIH-1/mL)	<37	<37	<37	<37	<37	<37	<37	<37	<37	<37
Duración de TAR (meses)	41	185	48	324	43	72	72	270	12	12
TAR	RPV	RPV	DTG	DTG	RPV	DRV	EVG	DRV	DTG	EVG
	TAF	DTG	ABC	ABC	DTG	COBI	COBI	RTV	ABC	COBI
	FTC		3TC	3TC		FTC	FTC	3TC	3TC	FTC
						TAF	TAF			TAF

Tabla 7. Características de los pacientes incluidos en el estudio. RPV: Rilpivirina, TAF: Tenofovir alafenamida, FTC: Emtricitabina, DTG: Dolutegravir, ABC: Abacavir, 3TC: Lamivudina, DRV: Darunavir, COBI: Cobicistat, EVG: Elvitegravir.

3.2.2. Co-cultivo de células T CD4⁺ totales, células T CD8⁺ y células NK

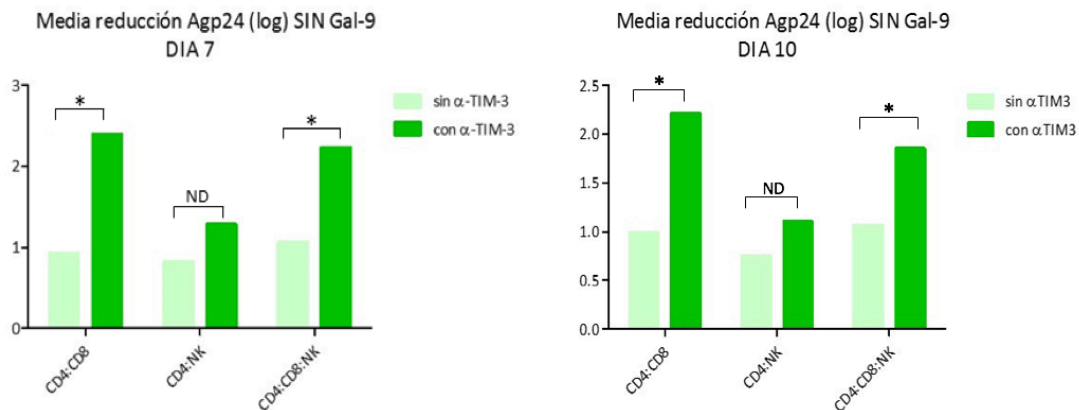
Para llevar a cabo estos experimentos se obtuvieron células T CD4⁺, células T CD8⁺ y células NK a partir de las PBMCs obtenidas de los pacientes con infección por VIH-1 tras extracción de 200mL de sangre total por venopunción.

En primer lugar, se llevó a cabo el tratamiento de las células T CD8⁺ y las células NK con el anticuerpo frente a TIM-3 para modificarlas antes del co-cultivo. Tras 24h de tratamiento se realizaron los diferentes co-cultivos (CD4⁺t:CD8⁺, CD4⁺t:NK, CD4⁺t:CD8⁺:NK) en ratio 1:1 y se llevó a cabo la superinfección con un virus VIH-1 BaL, necesario para la estimulación de las células T CD8⁺ ya que los pacientes se encontraban durante bastante tiempo en una situación de supresión virológica. Los sobrenadantes recogidos a día 7 y 10 se utilizaron para llevar a cabo una técnica ELISA para la medición de antígeno p24 y para la medición de un panel de citoquinas, así como de granzima/perforina.

La capacidad CTL de los linfocitos T CD8⁺ se basó en los niveles de producción de antígeno p24. Una reducción de p24 \geq 2log se consideró como una buena respuesta T CD8⁺ - VIH-1 específica (239).

Como puede observarse en las gráficas hay una reducción de p24 \geq 2log en las condiciones de bloqueo de TIM-3 en comparación con las condiciones control ($p=0,007$). En los co-cultivos CD4⁺t:CD8⁺, se observó una baja capacidad supresora de las células T CD8⁺ (media de Agp24 de 0,9 log), pero mejoró significativamente después del bloqueo de TIM-3 con el anticuerpo (media de Agp24 de 2,4 log) y por lo tanto un control de la replicación vírica. En el caso del co-cultivo CD4⁺t: NK, el bloqueo de la interacción Gal-9: TIM-3 no provocó una disminución del Agp24 (media de Agp24 de 0,8 log frente a 1,2 log con anticuerpo; $p=0,41$). Sin embargo, en los co-cultivos de células CD4⁺t junto con CD8⁺ y NK, el bloqueo de TIM-3 en las células NK no afectó la actividad CTL de las células T CD8⁺, observando de nuevo una disminución significativa ($p=0,011$) cuando se lleva a cabo el bloqueo de la interacción Gal-9: TIM-3 (media de Agp24 de 1 log frente a media de Agp24 de 2,3 log con el anticuerpo).

Por otro lado, no encontramos diferencias significativas entre los resultados obtenidos a día 7 y a día 10 (Figura 41).



Co-cultivos	Media reducción Agp24 (Log) sin Gal-9	
	DIA 7	DIA 10
CD4:CD8	0,92	0,99
CD4:CD8+α-TIM-3	2,39	2,21
CD4:NK	0,82	0,75
CD4:NK+α-TIM-3	1,28	1,11
CD4:CD8:NK	1,06	1,06
CD4:CD8:NK+α-TIM-3	2,23	1,85

Figura 41. Media reducción de Agp24 (log), día 7 y día 10. Efecto del bloqueo de TIM-3. ND=no hay diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las muestras analizadas. El símbolo* indica que existe significación estadística ($p < 0,05$)

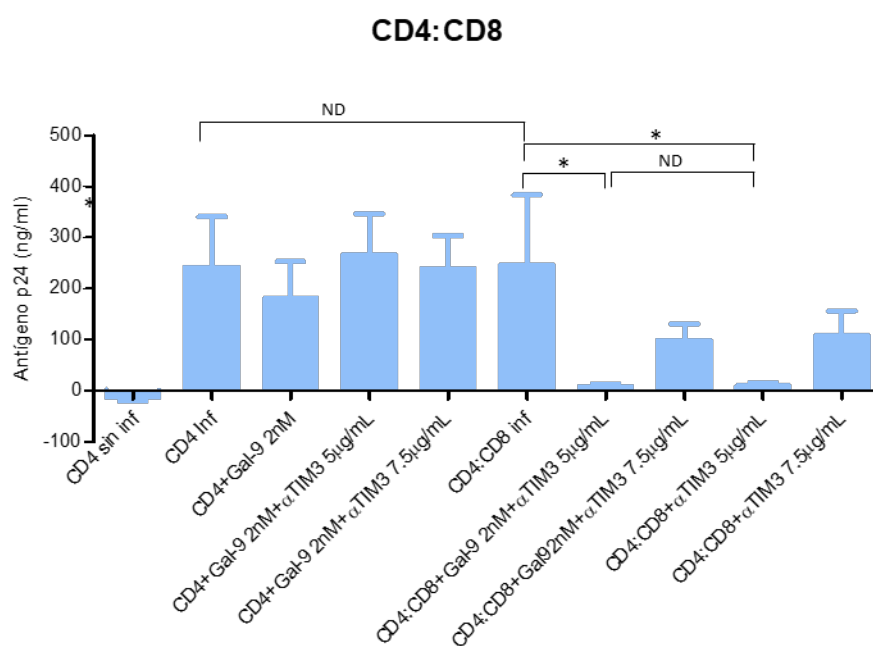
4. Evaluación del bloqueo TIM-3 y uso de Gal-9

Con los resultados anteriores hemos confirmado el potencial del anticuerpo frente a TIM-3 en la restauración de la respuesta CTL, en los siguientes experimentos evaluamos si el uso de Gal-9 puede afectar la respuesta CTL

4.1. Modelos *in vitro*

4.1.1. Co-cultivo de células T CD4⁺ totales y células T CD8⁺

Como podemos observar en la siguiente gráfica (Figura 42), el uso de Gal-9 no provoca un efecto negativo en la respuesta CTL de las células T CD8⁺, no hay diferencia significativa entre las muestras analizadas con o sin Gal-9 ($p=0,41$), de nuevo observamos un control en la replicación vírica con el uso del anticuerpo frente a TIM-3.

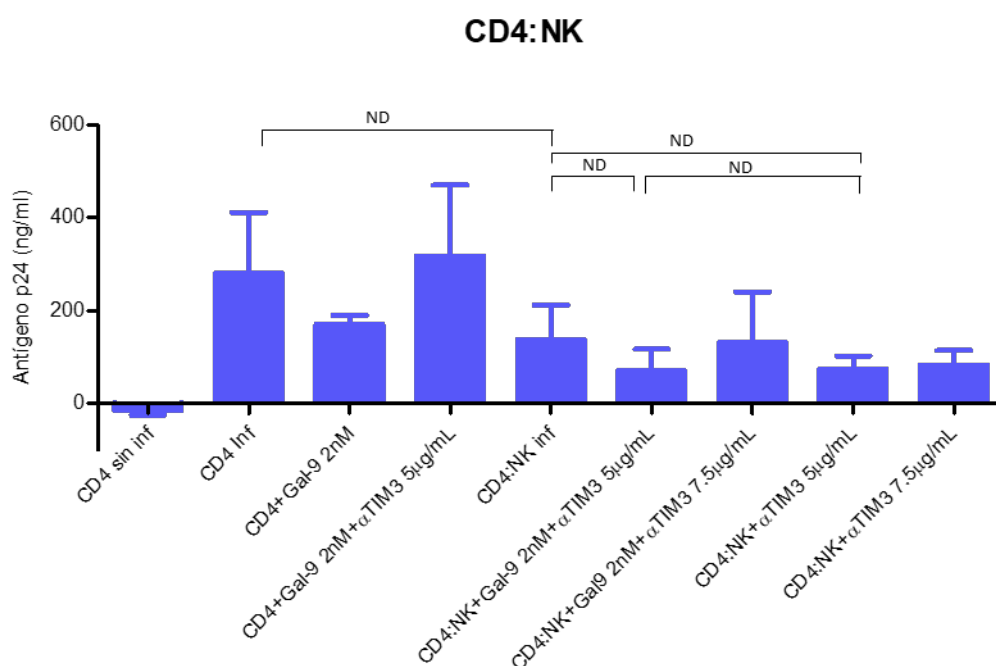


Co-Cultivos	Agp24(ng/mL)
CD4 sin infectar	-12,01
CD4 infectadas	242,48
CD4+Gal-9 2nM	180,87
CD4+Gal-9 2nM+α-TIM-3 5µg/mL	265,15
CD4+Gal-9 2nM+α-TIM-3 7,5µg/mL	239,04
CD4:CD8	246,87
CD4:CD8+ Gal-9 2nM+α-TIM-3 5µg/mL	9,32
CD4:CD8+ Gal-9 2nM+α-TIM-3 7,5µg/mL	99,05
CD4:CD8+α-TIM-3 5µg/mL	10,02
CD4:CD8+α-TIM-3 7,5µg/mL	107,84

Figura 42. Co-cultivo de células T CD4⁺ y células T CD8⁺. ND=no hay diferencias significativas ($p<0,05$) entre las muestras analizadas. El símbolo* indica que existe significación estadística ($p<0,05$).

4.1.2. Co-cultivo de células T CD4⁺ totales y células NK

El uso del anticuerpo frente a TIM-3 en las células NK ($p=0,42$) no provoca una mejora en el control de la replicación vírica, como puede observarse en la gráfica (Figura 43), no hay diferencias significativas entre las diferentes muestras analizadas ($p=0,5$). Tampoco hay diferencias significativas con el uso de Gal-9 ($p=0,46$).

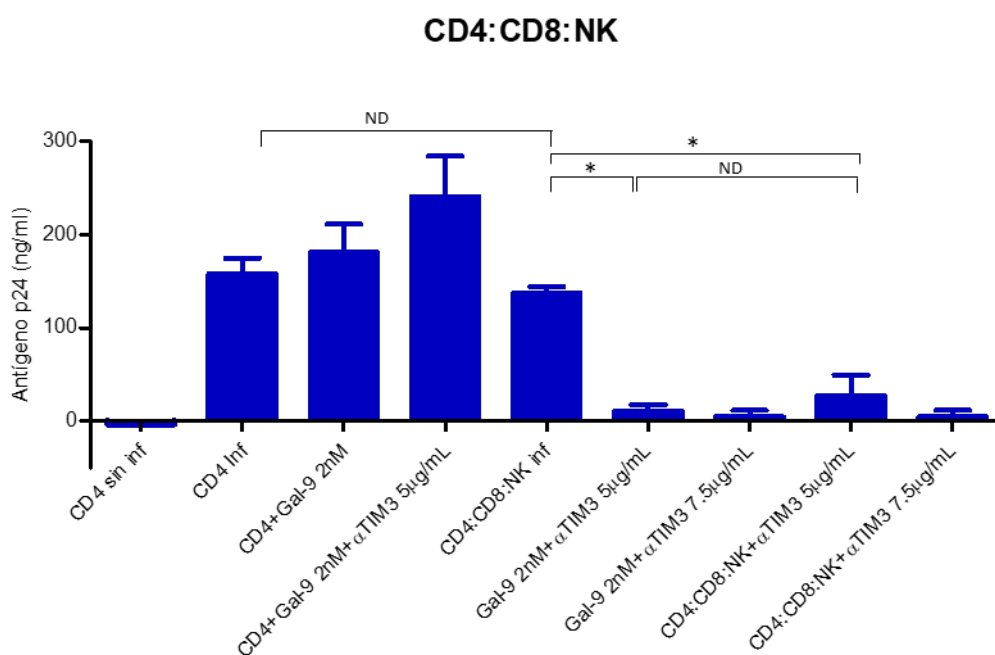


Co-Cultivos	Agp24(ng/mL)
CD4 sin infectar	-9,11
CD4 infectadas	280,18
CD4+Gal-9 2nM	170,08
CD4+Gal-9 2nM+α-TIM-3 5µg/mL	317,54
CD4:NK	138,28
CD4:NK+ Gal-9 2nM+α-TIM-3 5µg/mL	70,86
CD4:NK+ Gal-9 2nM+α-TIM-3 7,5µg/mL	131,5
CD4:NK+α-TIM-3 5µg/mL	74,59
CD4:NK+α-TIM-3 7,5µg/mL	83,07

Figura 43. Co-cultivo de células T CD4⁺ y células NK. ND=no hay diferencias significativas ($p<0,05$) entre las muestras analizadas.

4.1.3. Co-cultivo de células T CD4⁺ totales, células T CD8⁺ y NK

En este tipo de co-cultivos, el bloqueo de TIM-3 en las células NK no afecta la actividad de las células T CD8⁺ (Figura 44) esto nos pone de manifiesto el control de la replicación vírica ($p=0,002$). Por otro lado, el uso de Gal-9 no afecta la respuesta CTL ($p=0,35$).



Co-Cultivos	Agp24(ng/mL)
CD4 sin infectar	-3,66
CD4infectadas	157,71
CD4+Gal-9 2nM	180,93
CD4+Gal-9 2nM+α-TIM-3 5µg/mL	240,31
CD4:CD8:NK	137,14
CD4:CD8:NK+ Gal-9 2nM+α-TIM-3 5µg/mL	10,53
CD4:CD8:NK+ Gal-9 2nM+α-TIM-3 7,5µg/mL	4,79
CD4:CD8:NK+α-TIM-3 5µg/mL	27,26
CD4:CD8:NK+α-TIM-3 7,5µg/mL	4,61

Figura 44. Co-cultivo de células T CD4⁺, células T CD8⁺ y células NK. ND=no hay diferencias significativas ($p<0,05$) entre las muestras analizadas. El símbolo* indica que existe significación estadística ($p<0,05$).

Efecto sobre la producción de citoquinas y granzima/perforina

La infección de VIH-1 provoca una activación del sistema inmune y por lo tanto una variación en los niveles de las citoquinas tanto pro- como anti-inflamatorias. Con este experimento queríamos ver si había alguna variación en los niveles de citoquinas al mejorarse la respuesta CTL con el bloqueo Gal-9: TIM-3.

Para ello utilizamos un panel de citoquinas Th1/Th2/Th17 (IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17) empleando para la medición de las mismas los sobrenadantes procedentes de los diferentes co-cultivos (CD4⁺t:CD8⁺, CD4⁺t: NK, CD4⁺t:CD8⁺: NK) y utilizando el kit de determinación de citoquinas Th1/Th2/Th17 por CBA.

No se observaron diferencias en los niveles de citoquinas analizadas en los diferentes co-cultivos entre las muestras con o sin anticuerpo (Figuras 45, 46 y 47).

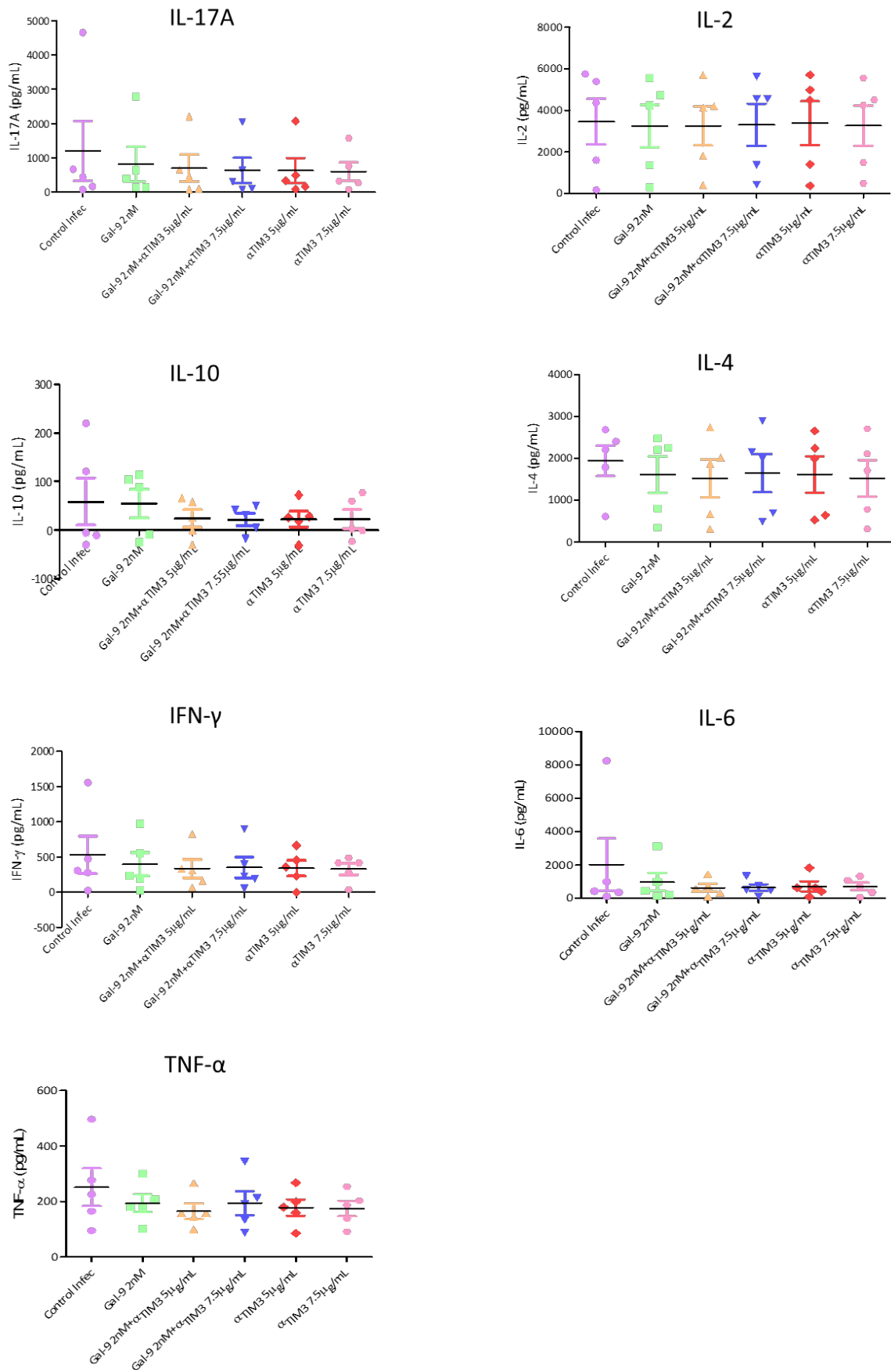


Figura 45. Citoquinas analizadas en los sobrenadantes de los co-cultivos CD4⁺t:CD8⁺.

Resultados

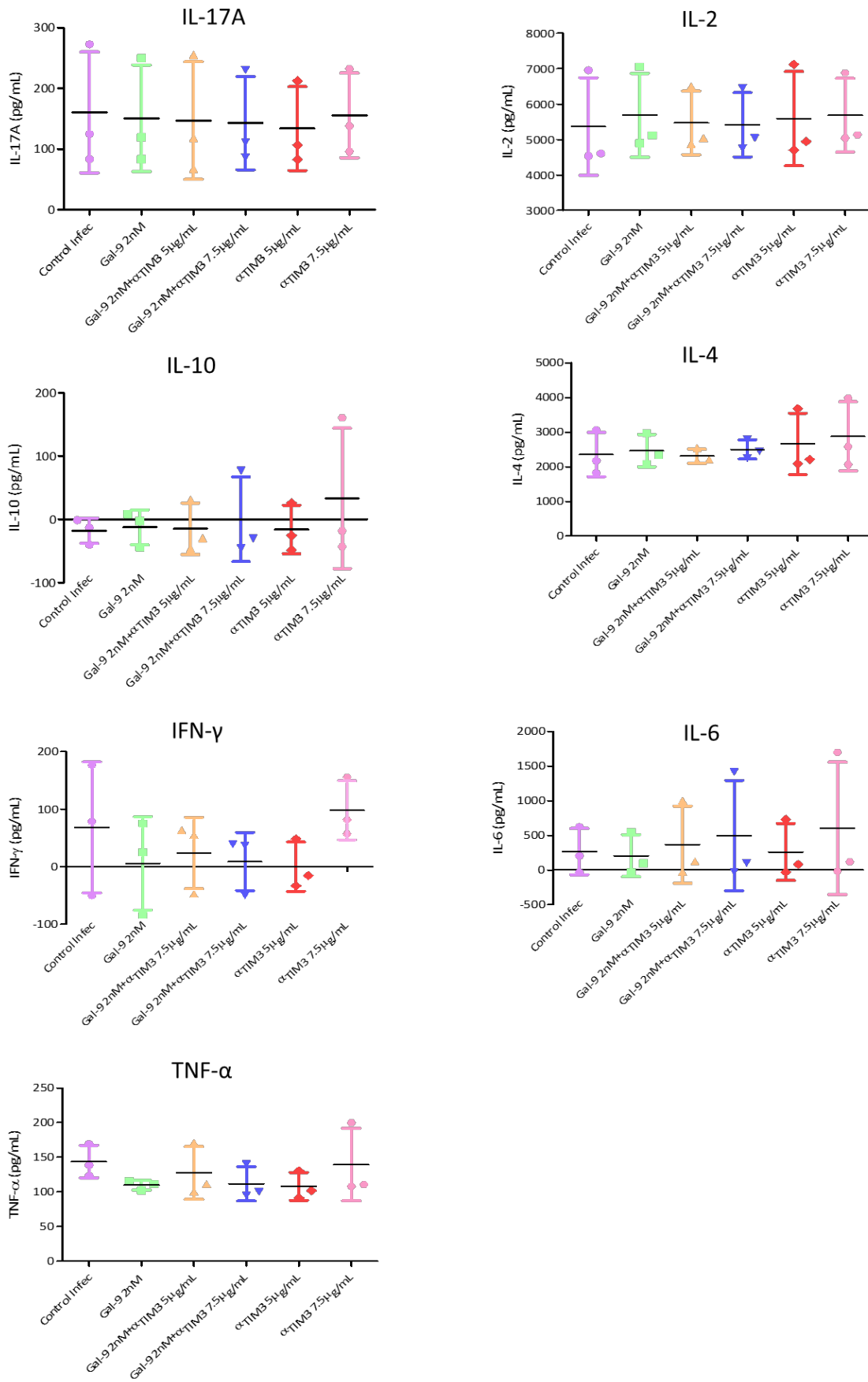


Figura 46. Citoquinas analizadas en los sobrenadantes de los co-cultivos CD4⁺t: NK.

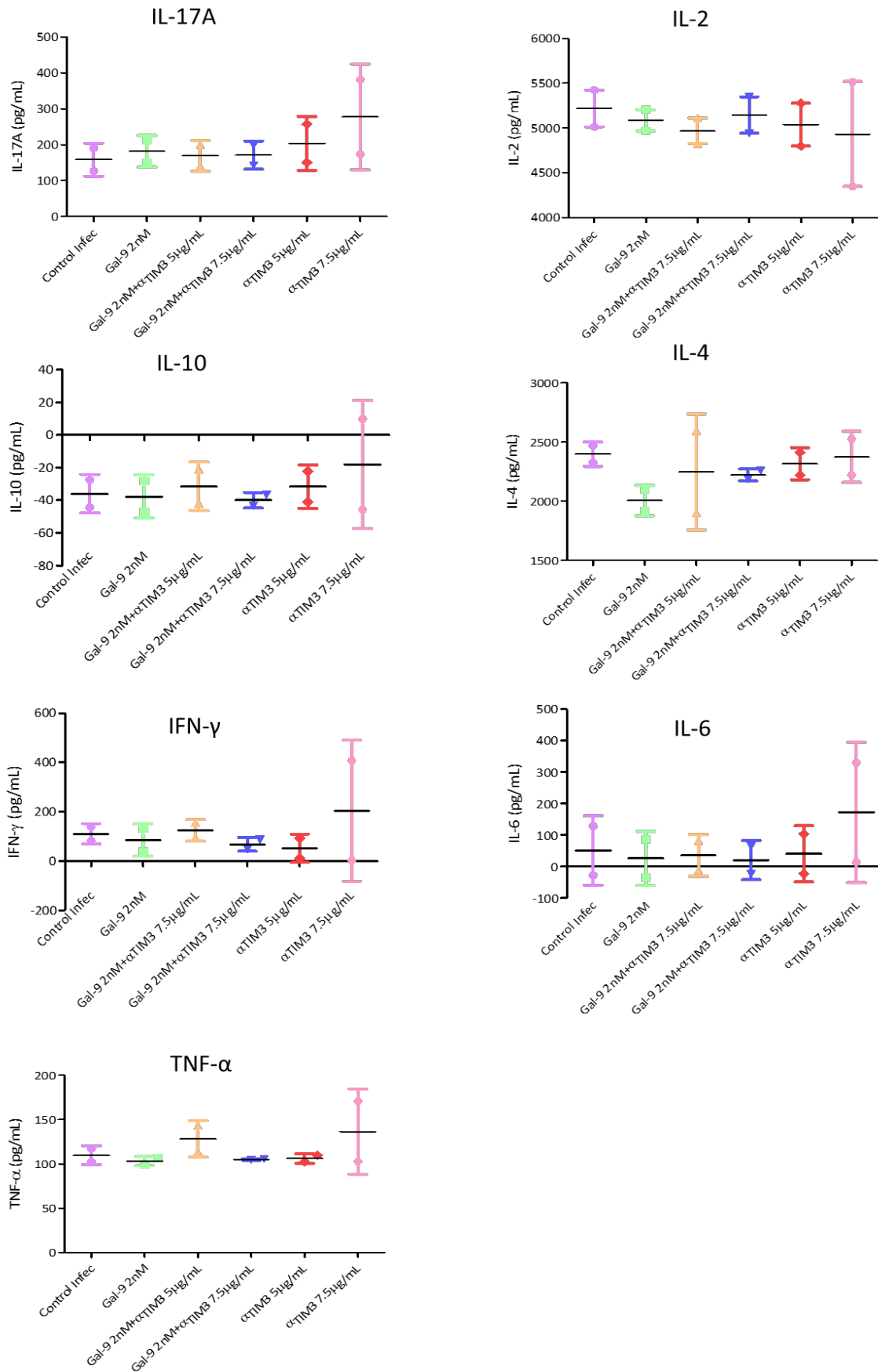
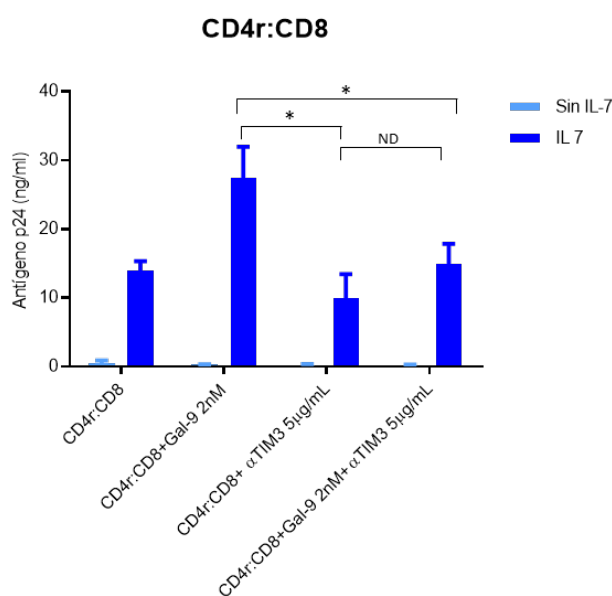


Figura 47. Citoquinas analizadas en los sobrenadantes de los co-cultivos CD4⁺t:CD8⁺: NK.

4.1.4. Co-cultivos de células T CD4 reposo latentemente infectadas y células T CD8⁺

Con los resultados anteriores habíamos confirmado el potencial de Gal-9 en la reactivación del virus en las células latentemente infectadas, por lo que con este experimento quisimos evaluar la mejora de la respuesta CTL de las células T CD8⁺, si tras añadir Gal-9 para la reactivación del virus y bloquear su interacción con TIM-3 mediante el uso de anticuerpo específico frente a este, se conseguía mejorar la respuesta CTL de las células T CD8⁺.

Como se puede observar en la figura (Figura 48), en un modelo de latencia basado en IL-7 tras añadir Gal-9 sobre las células latentes, el antígeno p24 fue de 27.5 ng/mL frente a 13 ng/mL sin añadirlo, mientras que la adición del anticuerpo frente a TIM-3 fue de 9ng/mL ($p=0,036$), resultado que nos indica que añadir el anticuerpo mejora la respuesta CTL y por lo tanto un control de la replicación vírica.



Co-Cultivos	Control (Sin IL-7) Agp24 (ng/mL)	IL-7 Agp24 (ng/mL)
CD4r:CD8	0,4	13,96
CD4r:CD8+Gal-9 2nM	0,27	27,43
CD4r:CD8+α-TIM-3 5µg/mL	0,26	9,93
CD4r:CD8+Gal-9 2nM+α-TIM-3 5µg/mL	0,19	14,88

Figura 48. Co-cultivo células T CD4⁺ latentemente infectadas con células T CD8⁺. ND=no hay diferencias significativas ($p<0,05$) entre las muestras analizadas.

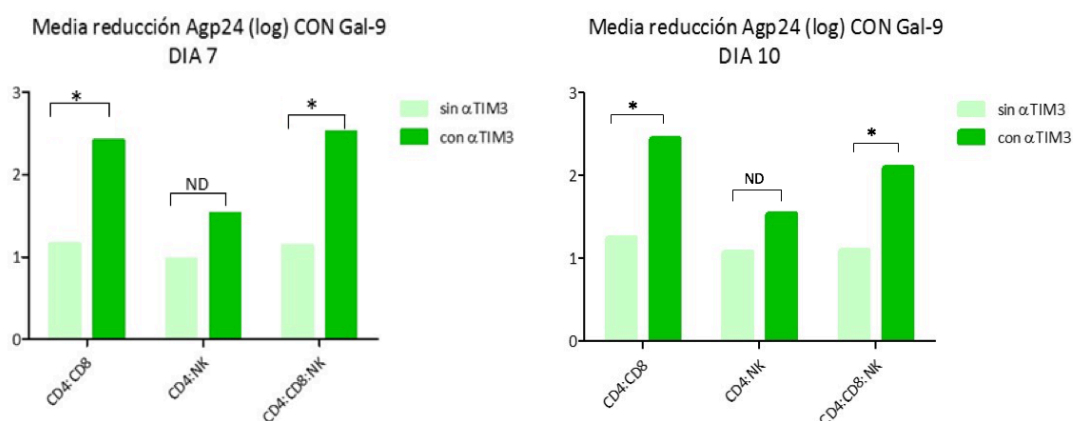
4.2. Modelo *ex vivo*

4.2.1. Co-cultivo de células T CD4⁺ totales, células T CD8⁺ y células NK

Como se ha comentado en el apartado 3.4, para la realización de estos experimentos se obtuvieron las células a partir de las PBMCs obtenidas de los pacientes con infección por VIH-1 tras extracción de 200mL de sangre total por venopunción. Las características de los pacientes pueden observarse en el apartado 3.2.1.

Como se ha comentado anteriormente, primero se realizó un tratamiento de las células T CD8⁺ y las células NK con el anticuerpo frente a TIM-3 para modificarlas antes del co-cultivo. Tras realizar el co-cultivo (CD4⁺t:CD8⁺, CD4⁺t: NK, CD4⁺ t:CD8⁺: NK) y la superinfección con un virus BaL, se añadió Gal-9 para confirmar el efecto del exceso de la misma tras bloquear TIM-3.

La capacidad CTL de los linfocitos T CD8⁺ se basó en los niveles de producción de antígeno p24. Una reducción de p24 ≥ 2 log se consideró como una buena respuesta T CD8⁺ - VIH-1 específica (239). Además, comparamos el efecto de la adición o ausencia de Gal-9 en los diferentes puntos. Como se observa en las gráficas hay una reducción de p24 ≥ 2 log en las condiciones de bloqueo de TIM-3 en comparación con las condiciones control ($p=0,007$) en los co-cultivos con las células T CD8⁺, si observamos la tabla de la figura 49 no observamos diferencias entre añadir Gal-9 o sin añadirla. En el caso del co-cultivo CD4⁺: NK, el bloqueo de la interacción Gal-9: TIM-3 no provocó una disminución del Agp24 ($p= 0,41$) ni hay diferencias en el uso de Gal-9. Por último, en los co-cultivos de células CD4⁺ junto con CD8⁺ y NK, el bloqueo de TIM-3 en las células NK no afectó la actividad CTL de las células T CD8⁺, observando de nuevo una disminución significativa ($p=0,011$) cuando se lleva a cabo el bloqueo de la interacción Gal-9: TIM-3. Añadir Gal-9 no afecta la respuesta CTL de las células T CD8⁺.



Co-cultivos	Media reducción Agp24 (Log) con Gal-9	
	DIA 7	DIA 10
CD4:CD8	1,16	1,25
CD4:CD8+ α -TIM-3	2,41	2,45
CD4:NK	0,97	1,08
CD4:NK+ α -TIM-3	1,53	1,54
CD4:CD8:NK	1,14	1,12
CD4:CD8:NK+ α -TIM-3	2,52	2,1

Figura 49. Media reducción de Agp24 (log), día 7 y día 10. ND=no hay diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las muestras analizadas. El símbolo* indica que existe significación estadística ($p < 0,05$).

Efecto sobre la producción de citoquinas

Como ya hemos comentado anteriormente, la infección de VIH-1 provoca la activación del sistema inmune y una variación en los niveles de las citoquinas. Con los sobrenadantes obtenidos de los co-cultivos de las células de los pacientes, queríamos comprobar si se producía algún cambio en los niveles de citoquinas al mejorarse la respuesta CTL con el bloqueo Gal-9: TIM-3.

Para ello utilizamos un panel de citoquinas (IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, Granzima y perforina) utilizando el kit ProcartaPlex™ Multiplex Immunoassay.

No se observaron diferencias en los niveles de citoquinas analizadas en los diferentes co-cultivos entre las muestras con o sin anticuerpo. Por otro lado, analizamos las citoquinas de las células T CD8⁺ con el anticuerpo frente a TIM-3 sin observarse diferencia en ausencia de éste (Figuras 50,51,52,53,54 y 55).

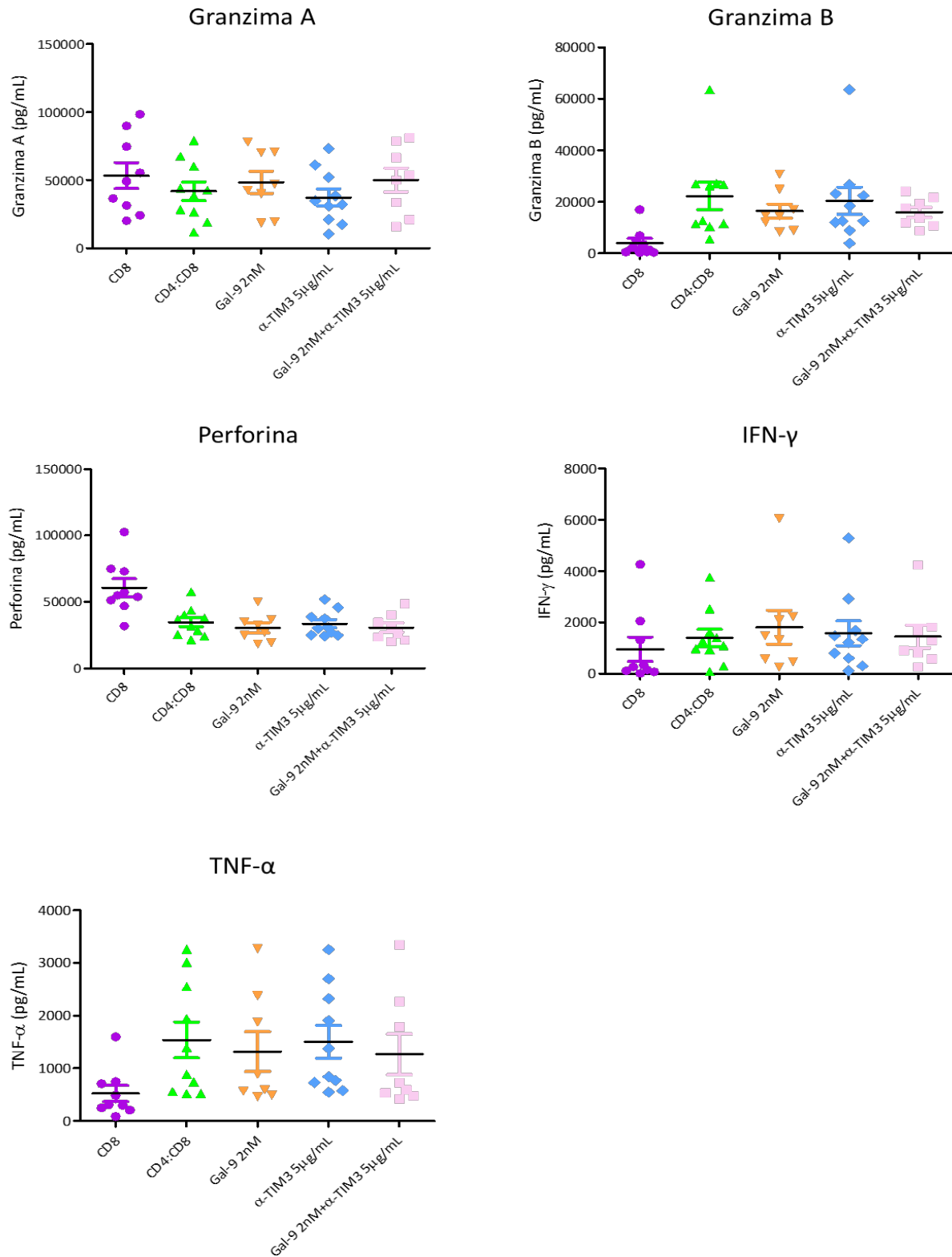


Figura 50. Citoquinas analizadas en los sobrenadantes de los co-cultivos CD4⁺:CD8⁺.

Resultados

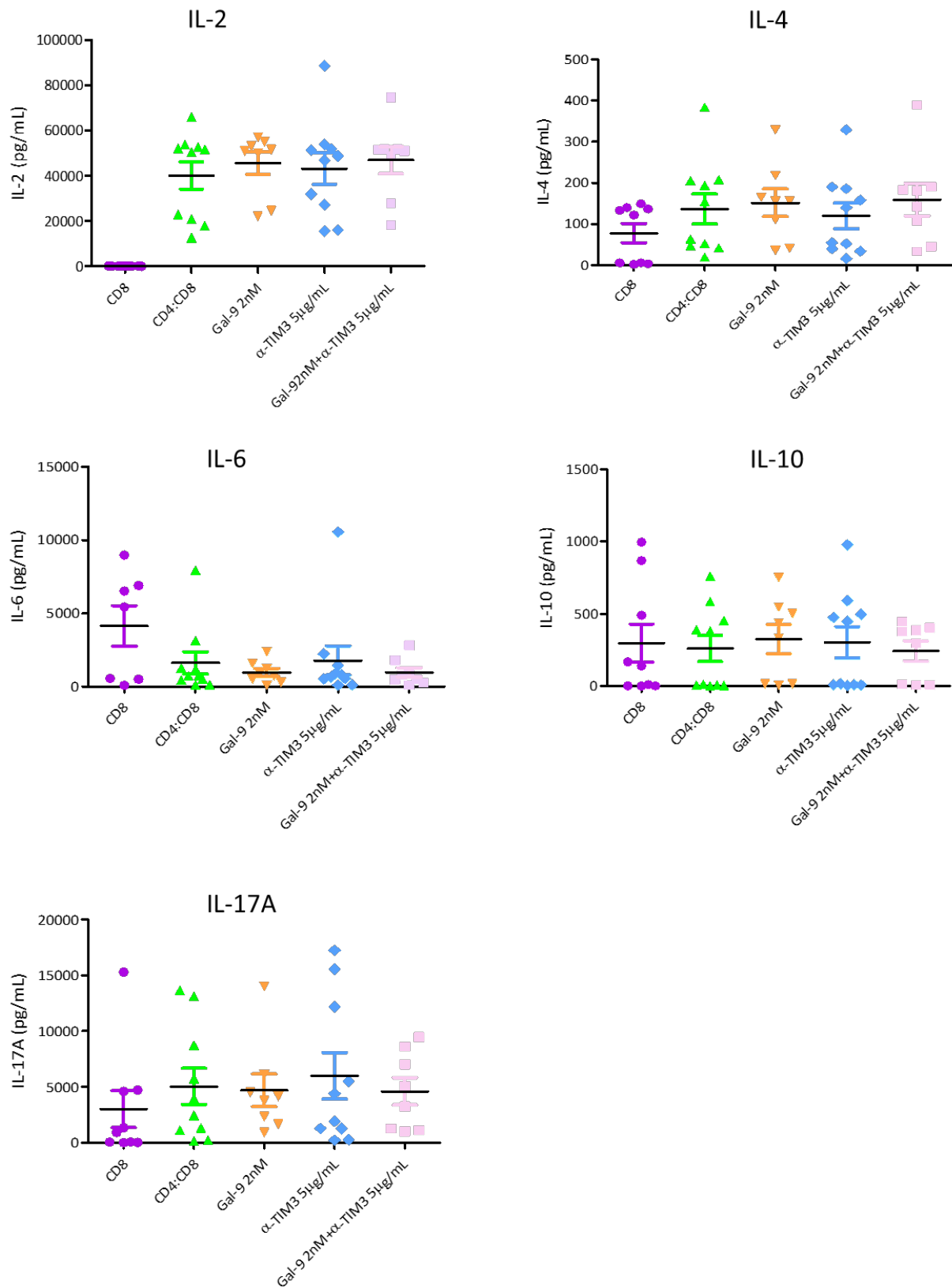


Figura 51. Citoquinas analizadas en los sobrenadantes de los co-cultivos CD4⁺:CD8⁺.

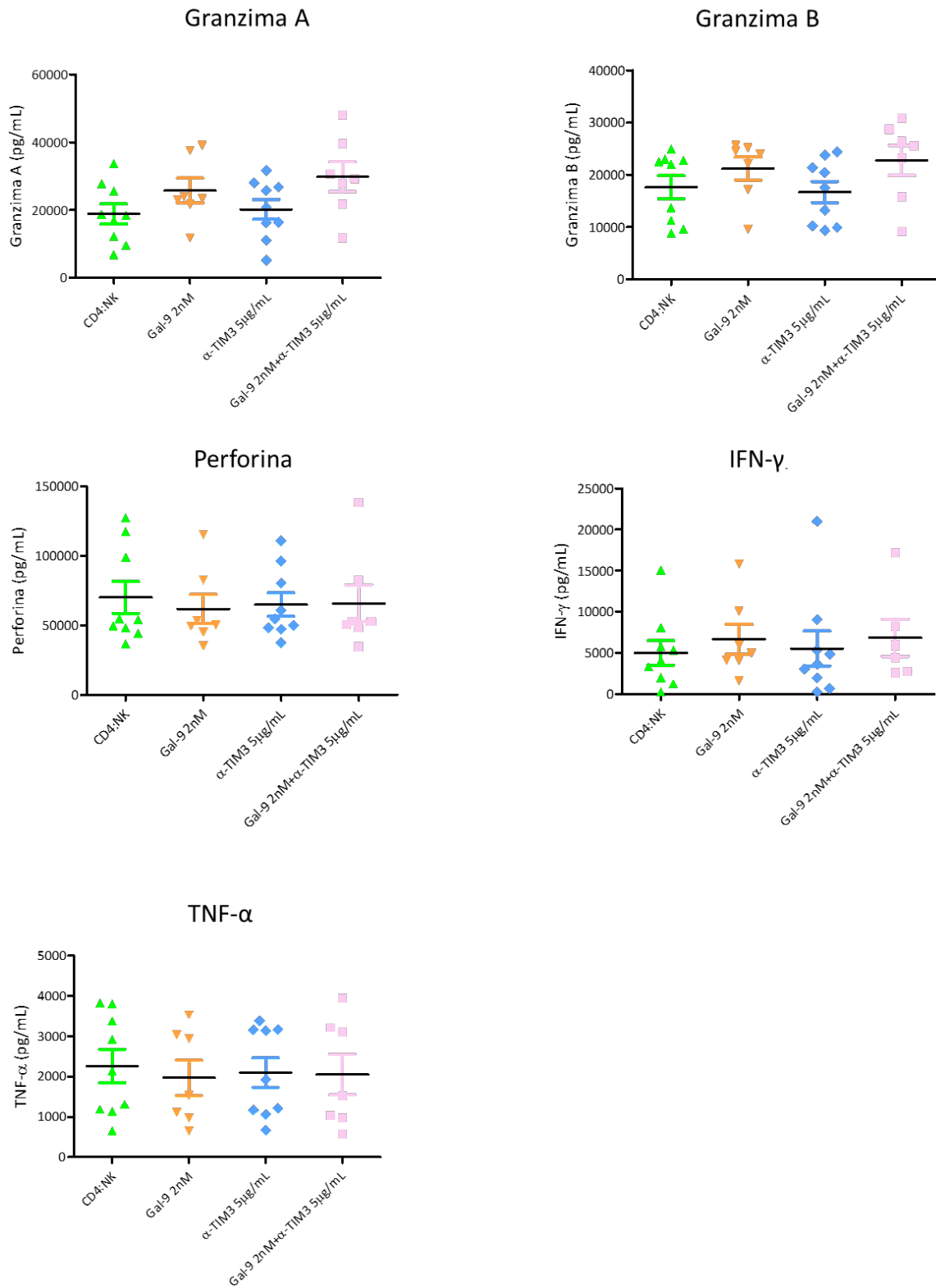


Figura 52. Citoquinas analizadas en los sobrenadantes de los co-cultivos CD4⁺: NK.

Resultados

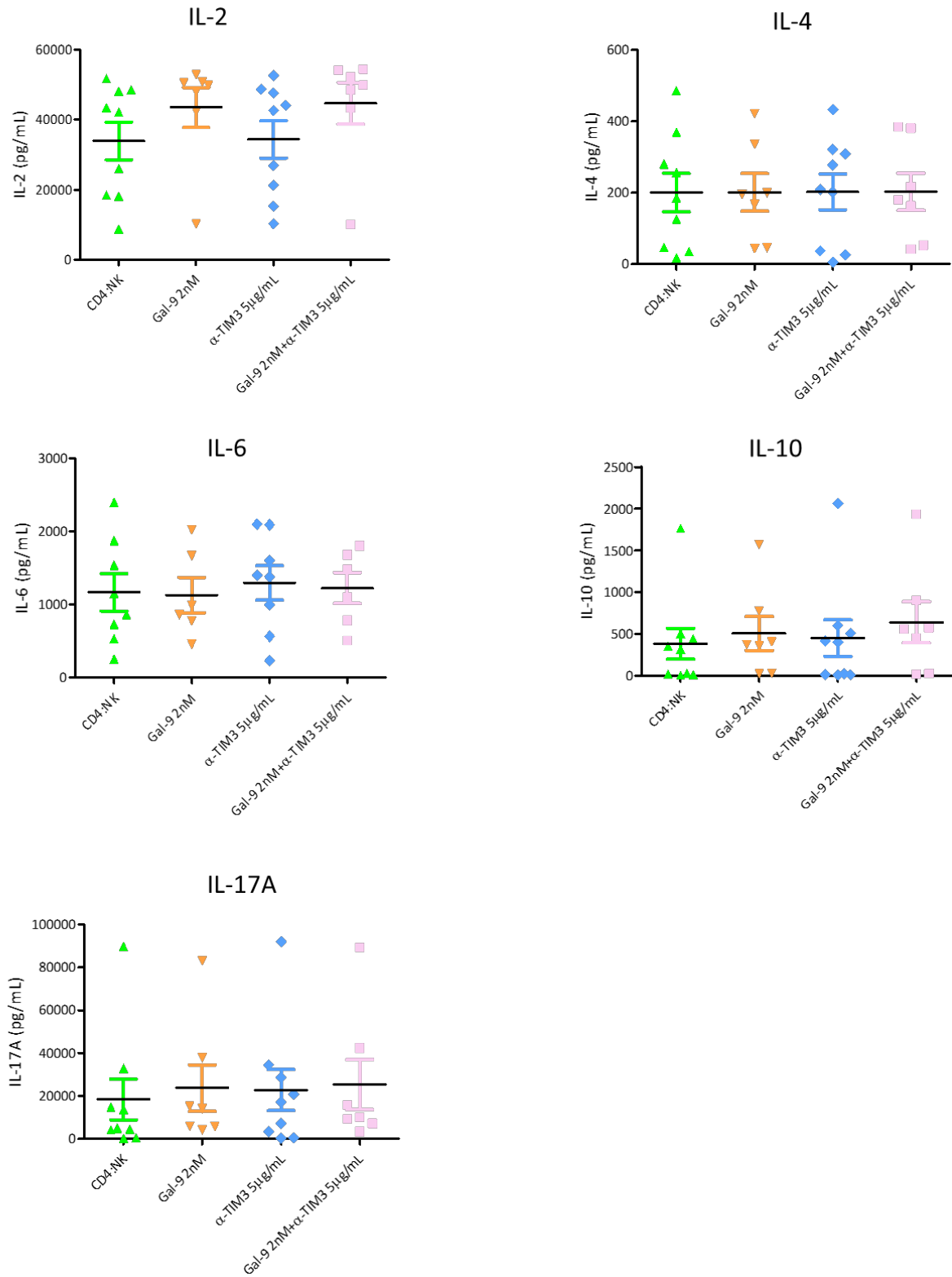


Figura 53. Citoquinas analizadas en los sobrenadantes de los co-cultivos CD4⁺: NK.

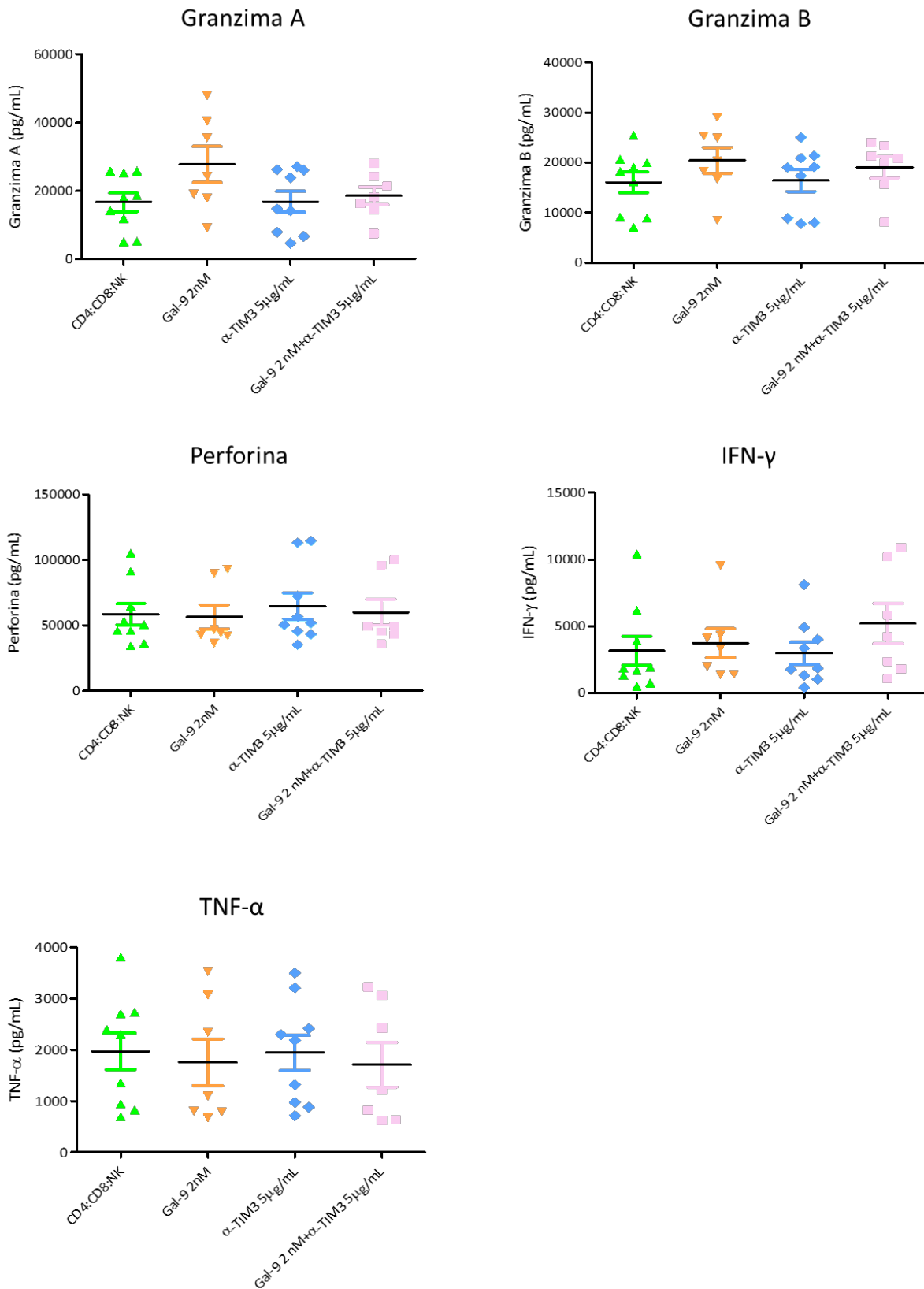


Figura 54. Citoquinas analizadas en los sobrenadantes de los co-cultivos CD4⁺:CD8⁺: NK.

Resultados

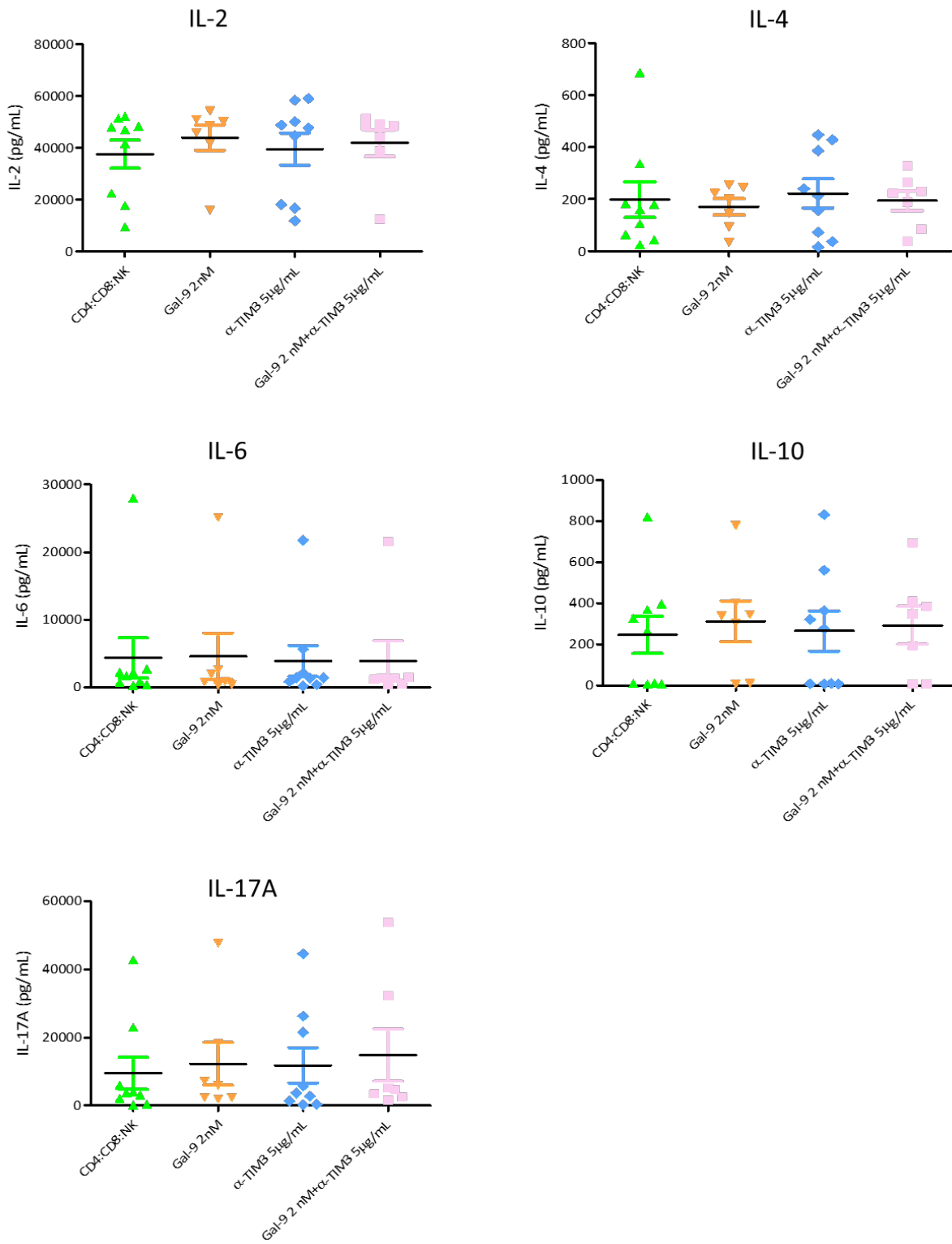


Figura 55. Citoquinas analizadas en los sobrenadantes de los co-cultivos CD4⁺:CD8⁺: NK.

Discusión

A pesar de los avances indudables del TAR, la infección por VIH continúa siendo una enfermedad incurable. Uno de los principales obstáculos para la curación son los reservorios celulares en los que el virus permanece en estado de latencia. La eliminación de estos reservorios mediante el establecimiento de nuevas estrategias se ha convertido en el principal objetivo de la investigación en erradicación del VIH. En este trabajo hemos evaluado una estrategia basada en la ya conocida de *shock and kill*, con el objetivo de encontrar una aproximación a la cura del VIH-1 mediante la manipulación de dos proteínas, Gal-9 y TIM-3.

1. Toxicidad Gal-9 y α -TIM-3

Los resultados que hemos obtenido en los experimentos de toxicidad en las células VERO nos muestran que Gal-9 no provoca toxicidad celular en ninguna de las concentraciones probadas (2nM y 200nM), mientras que el anticuerpo frente a TIM-3 provocó cierta toxicidad sólo en la concentración más alta (10 μ g/mL), que es el doble de la que hemos usado en los diferentes experimentos de este trabajo. Debemos ser conscientes no obstante que los ensayos que hemos llevado a cabo han sido *in vitro* y *ex vivo* con lo que de cara a un posible traslado a la clínica tanto Gal-9 recombinante como un posible anticuerpo frente a TIM-3 deberán ser testados convenientemente para su uso directo en humanos.

Existen diferentes patentes de anticuerpos frente a TIM-3, solos o en combinación con otros frente a PD-1 (240,241), para emplearlos en ensayos de inmunoterapia en cáncer. Actualmente está en marcha un ensayo clínico en fase I, utilizando un anticuerpo frente a TIM-3 solo o en combinación con PD-1 para tumores sólidos y linfomas. El resultado de estos trabajos nos daría una idea de cuál sería la dosis más adecuada y por lo tanto menos toxica. Por otro lado, Gal-9 ha sido administrada a animales de experimentación para otros propósitos sin observarse toxicidad significativa asociada y siendo bien tolerada (242,243), resultados que refuerzan su seguridad de cara a ser empleada como posible herramienta para la curación de la infección por VIH-1.

Los resultados obtenidos en este trabajo junto con los datos que se deriven de los ensayos clínicos en pacientes con cáncer podrían sentar las bases para futuros ensayos empleando

Gal-9 y el bloqueo de TIM-3 en animales de experimentación, como paso previo a su utilización en humanos, para la curación de la infección por VIH-1.

2. Reactivación de VIH-1 mediada por Gal-9 en el sistema celular Jurkat-LAT-GFP

En estudios anteriores (187), en los cuales utilizaron distintos modelos de células Jurkat-LAT (J-LAT 58, J-LAT 6.3 y J-LAT 11.1) y diferentes tipos de galectinas (Gal-1,-3,-4,-7,-8 y -9) para la reactivación del VIH-1, observamos que ninguna de estas galectinas excepto Gal-9 alcanza altos valores de reactivación.

Nos hemos centrado sólo en Gal-9 dado el gran potencial que parecía mostrar en los trabajos previos que hemos encontrado. Sin embargo, a diferencia de los estudios mencionados anteriormente, hemos utilizado una concentración más baja de Gal-9 (2 nM frente a 200nM). El porcentaje de expresión de GFP en el control positivo con PMA fue de 38,3% mientras que con Gal-9 (2nM) fue de un 28% y en presencia del anticuerpo frente a TIM-3 de un 31%, resultados similares al trabajo mencionado anteriormente del grupo de Abdel-Mohsen. Con los resultados obtenidos confirmamos que Gal-9 puede inducir la transcripción de VIH-1 en un modelo celular Jurkat-LAT-GFP

Estos resultados nos indican el potencial de reactivación de Gal-9 en un modelo celular y que la reactivación mediada por Gal-9 no se llevó a cabo vía TIM-3 sino mediante una vía independiente, ya que el bloqueo de TIM-3 no afectó al porcentaje de reactivación viral. El modo por el cual Gal-9 es capaz de reactivar el virus está aún en estudio, aunque parece implicar a alguna vía de activación de factores de transcripción.

3. Reactivación de VIH-1 mediada por Gal-9 en modelos de latencia en células T CD4⁺ basado en IL-7.

Para llevar a cabo la primera parte de nuestra estrategia de *shock and kill*, es decir, la reactivación del virus mediada por Gal-9, hemos utilizado un modelo de latencia *in vitro* basado en IL-7, interleuquina que permite la integración viral en las células T CD4⁺ en reposo.

Los modelos de latencia que nos permiten obtener un conjunto de células memoria reposo latentemente infectadas para poder emplear posteriormente diferentes estrategias de reactivación se han utilizado en muchos trabajos (106,244,245) ya que permiten una aproximación experimental a lo que ocurre en las células memoria reposo de un paciente infectado por VIH. Concretamente el que nosotros hemos utilizado es uno basado en la IL-7 y que facilita la integración viral (236)

En nuestro modelo experimental utilizamos diferentes concentraciones de Gal-9 (2nM, 5nM, 200nM y 500nM) ya que no encontramos en la literatura la utilización de galectinas en un modelo celular como este por lo que así podíamos comprobar si las diferentes concentraciones de galectina probadas en este modelo tenían mayor o menor potencia de reactivación.

Empleando este modelo de latencia, en relación a las diferentes concentraciones de Gal-9 utilizadas, no se observó ninguna diferencia significativa tanto sola como en combinación con un anticuerpo frente a TIM-3. Dado que la reactivación del VIH-1 en este modelo de latencia empleando Gal-9 a una concentración 2 nM fue de 29 ng/ml frente a 32ng/ml que se observaron con el control positivo PMA, consideramos que esta concentración era óptima para llevar a cabo los diferentes experimentos.

Estos resultados nos confirman que Gal-9 es capaz de reactivar VIH-1 en modelos celulares *in vitro* y que al igual que hemos visto en las células Jurkat-LAT-GFP, actúa a través de una vía independiente de TIM-3.

Existen diferentes receptores para Gal-9, como son TIM-3 (148), PD-1 (231) y CD44 (246). Sin embargo, como ya hemos visto en los diferentes resultados obtenidos, la adición del anticuerpo frente a TIM-3 no reduce la reactivación del VIH-1 latente mediada por Gal-9. Estudios anteriores (187) han observado que el uso de anticuerpos frente a PD-1 o frente a CD44 tampoco redujo la reactivación del VIH-1, por lo que aunque sean receptores de Gal-9, para llevar a cabo la reactivación del VIH-1 lo hace a través de otros mecanismos.

Las células latentemente infectadas presentan un patrón de glucosilación de la superficie celular alterado (247). Este patrón presenta una secuencia de sacáridos que contiene

galactosa (117) y va a ser reconocido por las galectinas ya que éstas tienen una alta afinidad por los carbohidratos. Además, este patrón tiene una pérdida de ácido siálico lo que promueve la unión de oligosacáridos a Gal-9 y además promueve su actividad(248).

Las células CD4⁺ en reposo latentemente infectadas se trataron con tunicamicina, que es un antibiótico que bloquea químicamente la N-glicosilación de las proteínas recién sintetizadas en los residuos de asparagina y la mezcla de desglucosilación elimina enzimáticamente todos los carbohidratos unidos a N y O de las glicoproteínas (187), es decir, la tunicamicina destruye el patrón de oligosacáridos que reconoce Gal-9 en las células en reposo.

Los resultados obtenidos nos muestran que la combinación de Gal-9 y tunicamicina provocó una disminución del antígeno p24. A pesar de la presencia de tunicamicina, Gal-9 reactivó el virus latente, por lo que o bien la concentración de tunicamicina no fue suficiente o bien es necesario el uso de otro reactivo en combinación que consiga romper esta unión de forma más potente.

En el artículo mencionado anteriormente del grupo de Abdel Mohsen, realizaron este experimento en un modelo celular J-LAT- 5A8 y la reactivación mediada por Gal-9 fue prácticamente nula, por lo que en ese caso el tipo de célula varía en la actividad de Gal-9, y en nuestro caso no funcionó tan bien. También emplearon α -lactosa que es un neutralizador de la actividad de Gal-9 que inhibió por completo la reactivación mediada por Gal-9. Sin embargo, hay otros derivados de sacárido que no afectan la actividad de Gal-9.

Con estos resultados y con los estudios anteriores, vemos que los carbohidratos son ligandos esenciales para que Gal-9 pueda reactivar el VIH-1 latente. Estos datos sugieren que la capacidad para reactivar el virus depende de la unión de Gal-9 a un conjunto de estructuras de oligosacáridos en la membrana de la superficie de las células que conducen la transcripción del virus, mediante la activación de factores de transcripción NFAT, NF- κ B y AP-1. Además, estos datos nos plantean la idea de que los efectos de Gal-9 afectan más a las células infectadas por el VIH-1 que a las células que no lo están, por lo que no deberíamos ver efectos negativos en otros tipos de células.

Sin embargo, se requieren más estudios para conocer con profundidad el reconocimiento mediado por los glucanos responsables de la transducción de señales llevada a cabo por Gal-9.

Existen diversos ARL, cuyo objetivo es activar la replicación viral en aquellas células latentemente infectadas, pero en ningún caso se ha observado tasas de reactivación del 100%. Debido a los resultados obtenidos de Gal-9 en este trabajo y los resultados de los ARLs en diversos estudios (103–108) queríamos evaluar el papel reactivador de Gal-9 en combinación con otros ARLs con el fin de comprobar si la combinación de los mismos podría incrementar la tasa de reactivación viral.

Los ARLs probados presentan diferentes mecanismos de acción y cubren la mayoría de los mecanismos de acción empleados en los tratamientos: agentes inductores de NF- κ B (Prostatina y Briostatina), inhibidores de HDAC (Vorinostat y Romidepsina), moléculas de diferenciación celular y pro-apoptóticas (JQ1 y Disulfiram) y antagonista del receptor de quimioquinas CCR5 (Maraviroc). Algunos de estos reactivadores han sido empleados por nuestro grupo en diferentes ensayos (78,105,106), lo que nos ha permitido evaluarlos en combinación con Gal-9

En primer lugar, analizamos la reactivación del virus en las células T CD4⁺ memoria reposo latentemente infectadas (obtenidas mediante el modelo de latencia basado en IL-7) de los diferentes ARLs de forma individual. Observamos que el ARL que presentó una mayor reactivación del VIH-1 fue Gal-9, mientras que otros ARLs que se habían analizado en el mismo modelo celular presentaron una capacidad de reactivación menor que Gal-9 (106) donde la tasa de reactivación llevada a cabo por Maraviroc y Briostatina fue considerablemente más alta que la obtenida en este trabajo

Dentro de las combinaciones sencillas las que implicaron una mayor tasa de reactivación del virus latente fue la de Gal-9 con Vorinostat y Gal-9 con Briostatina. Sin embargo, los valores no alcanzaron al obtenido por Gal-9 de forma individual. En el trabajo de Abdel-Mohsen (187) analizan la combinación de Gal-9 con otros ARLs en células T CD4⁺ de pacientes VIH-1 con TAR supresivo, y observan un sinergismo en la combinación de Gal-9 con vorinostat y Gal-9 con JQ1. Estos resultados diferentes a los nuestros, podrían deberse a la

concentración tanto de Gal-9 como de Vorinostat empleada, aunque en el caso de JQ1 se emplea la misma, o bien porque estamos llevando a cabo el ensayo en un modelo celular y no en las células directas del paciente.

En cuanto a las combinaciones múltiples, se observa cierta tendencia antagónica, ya que en todas las combinaciones analizadas los valores de Agp24 bajaron considerablemente, muy por debajo de los valores obtenidos con cada uno de ellos de forma individual. A la vista de estos resultados, las estrategias combinadas de otros ARLs con Gal-9 no sería un buen camino para la reactivación del virus latente.

Con el fin de determinar las causas que conducen a este antagonismo, no observado en otros estudios previos, sería aconsejable realizar más experimentos de combinación y además realizarlos en diferentes tipos celulares.

4. Evaluación del bloqueo de la unión de Gal-9 a TIM-3 en la restauración de la actividad CTL de los linfocitos T CD8⁺ y las células NK

4.1. Modelo *in vitro*

Para llevar a cabo la segunda parte de la estrategia, es decir, mejorar la actividad CTL de las células T CD8⁺, evaluamos el efecto del bloqueo de TIM-3 empleando un anticuerpo comercial.

Los pacientes VIH-1 presentan un agotamiento inmunológico, es decir hay una pérdida de las funciones efectoras y de la capacidad proliferativa de las células T de memoria. Por lo tanto, con este sistema inmune deficiente no es suficiente para poder erradicar el VIH-1. Lo que nosotros pretendíamos con esta parte del trabajo era modular las células T CD8⁺ con un anticuerpo frente a TIM-3 para así potenciar su actividad.

Se ha comprobado en diversos estudios que bloquear los receptores que provocan el agotamiento celular como son PD-1, CTLA-4, LAG-3, TIM-3 y TIGIT mejora la respuesta CTL (110–112,115,116).

En nuestro trabajo quisimos evaluar la mejora en la respuesta CTL tras bloquear TIM-3 en los linfocitos T CD8⁺. Además, dado que previamente se ha postulado que (249) el bloqueo de TIM-3 en las células NK podría tener un efecto negativo en la respuesta total CTL, también analizamos el efecto en este tipo de células de forma individual y conjuntamente con las células T CD8⁺. Para ello se emplearon diferentes tipos de co-cultivos, CD4⁺ t:CD8⁺, CD4⁺ t: NK, CD4⁺ t:CD8⁺: NK.

4.1.1. Co-cultivo de células T CD4⁺ totales y células T CD8⁺

Los resultados obtenidos mostraron que un bloqueo de la unión Gal-9 con el receptor TIM-3 en los linfocitos T CD8⁺ provocó una mejora de la respuesta CTL global, observando una bajada considerable del antígeno p24, consiguiendo de esta manera un control de la replicación vírica.

Estudios previos (184) confirman que Gal-9 disminuye la expresión de CCR5, CXCR4 y $\alpha 4\beta 7$ en la superficie de las células T CD4⁺ activadas. Con esta disminución de los correceptores de VIH-1, la presencia de Gal-9 podría reducir la infección por VIH-1 en este tipo de células CD4⁺ activadas al impedir la entrada del virus, que precisa de estos correceptores.

En nuestro caso, para los co-cultivos hemos empleado el mismo tipo de células, sin embargo, no hemos observado ninguna reducción de antígeno p24, por lo que parece que en nuestro caso Gal-9 no debe estar reduciendo la expresión de estos correceptores

Si bien desde el punto de vista metodológico no hay diferencias entre el trabajo llevado a cabo por el grupo de Shokrollah Elahi (184) y el nuestro, quizá estas diferencias pueden deberse a que en el trabajo llevado a cabo por el grupo de Elahi los experimentos que se llevan a cabo son *ex vivo*, con células T CD4⁺ de pacientes infectados con VIH-1, mientras que en nuestro caso, las células proceden de donantes sanos.

No obstante, los resultados obtenidos que muestran una reducción importante de la producción de antígeno p24 con el uso del anticuerpo frente a TIM-3 es algo a tener en

cuenta de cara a para poder emplearlo en un futuro como una posible estrategia terapéutica.

4.1.2. Co-cultivo de células T CD4⁺ totales y células NK

Las células NK, son células que juegan un papel importante en la inmunidad innata, clave para la erradicación y la eliminación de infecciones virales. Se ha demostrado que el VIH-1 provoca cambios en la homeostasis de las estas células y por lo tanto dificulta sus funciones efectoras antivirales (250).

TIM-3 se expresa en las células NK (211) entre otras células como hemos visto anteriormente, sin embargo, a diferencia de lo que ocurre en las células T CD8⁺, la expresión de TIM-3 se asocia con una función mejorada de las células NK (251). Las células NK como en el caso de las células T CD8⁺ sufren agotamiento inmunológico tras una exposición prolongada del virus, por lo que sus funciones se ven también alteradas. Sin embargo, TIM-3 no es un marcador de agotamiento de las células NK (252), por lo que en este caso el bloqueo del receptor podría conducir a un efecto contrario al obtenido con las células T CD8⁺ en los co- cultivos CD4⁺:CD8⁺, es decir, no se mejoraría la respuesta CTL y por tanto no observaríamos un control virológico. Sin embargo, existen pocos estudios sobre el impacto de señalización mediada por TIM-3 en respuestas de las células NK en concreto en infecciones virales. Por ello, en nuestro trabajo incluimos también el efecto que podría tener el bloqueo de TIM-3 en las células NK en la mejora o no de la respuesta CTL global. Trabajos previos habían puesto de manifiesto que el bloqueo de TIM-3 empeoraba su actividad (249) (252), lo que podría condicionar la respuesta global CTL, de ahí que nosotros lo probásemos conjuntamente.

En el co-cultivo de las células T CD4⁺ con las células NK, el bloqueo de la interacción Gal-9 con TIM-3 no provoca una mejora en el control de la replicación vírica, a la vista de los resultados que encontramos de producción de antígeno p24, muy similares en las diferentes condiciones analizadas. Resultado que nos esperábamos tras los estudios mencionados anteriormente.

4.1.3. Co-cultivo de células T CD4⁺, células T CD8⁺ y células NK

Como se ha comentado anteriormente las células T CD8⁺ son fundamentales para el control de la infección por VIH-1 por su papel esencial de citotoxicidad. Sin embargo la progresión de la infección provoca una disminución en la actividad CTL y linfocitos T CD8⁺ específicos del VIH-1 poco proliferativos (253).

En este último apartado, se llevó a cabo un co-cultivo en el que se combinaron células CD4⁺:CD8⁺: NK, para comprobar principalmente si el bloqueo de TIM-3 en las células NK provocaba un efecto negativo en la actividad de las células T CD8⁺, y de forma global en la respuesta CTL.

Los resultados obtenidos de la medición de antígeno p24 tras el bloqueo de TIM-3 en las células NK no mostró tener un efecto negativo sobre la actividad de las células T CD8⁺, mejorada por su bloqueo de TIM-3. Este resultado nos pone de manifiesto la mejora de la respuesta CTL, y nos confirma, como en estudios previos, que se podría usar este anticuerpo como una estrategia terapéutica en la infección de VIH-1. Sin embargo, son necesarios más estudios para determinar el impacto del bloqueo de TIM-3 en los diferentes subtipos celulares, ya que como hemos visto no es lo mismo el bloqueo en las células NK que en las células T CD8⁺.

4.2. Modelo *ex vivo*

4.2.1. Co-cultivo de células T CD4⁺ t, células T CD8⁺ y células NK

Las células T CD8⁺ citotóxicas juegan un papel crucial en el control de la replicación vírica. Uno de los objetivos que se tiene a la hora de encontrar una cura es que este tipo de células presenten una respuesta efectiva y duradera contra el virus. Actualmente se están realizando ensayos inmunológicos que puedan medir la capacidad de las células T CD8⁺ para ejercer sus funciones efectoras y poder controlar la viremia (254). Para ello emplean inmunospot de IFN- γ o la medición de citocinas intracelulares pero no muestran la supresión de la replicación viral

La idea de que las células T CD8⁺ son importantes a la hora de controlar la infección por VIH-1 comenzó en los años 90, y estas observaciones se reforzaron con ensayos *in vitro* que muestran la capacidad de las células T CD8⁺ para inhibir la infección por VIH-1 de las células T CD4⁺ (255,256). Por otro lado, nos encontramos que los controladores elite (población de pacientes infectados capaces de controlar la infección por VIH-1 a niveles indetectable durante un periodo de tiempo) se caracterizan por una respuesta fuerte y funcional de células T CD8⁺ (257). Esto hace que una de las estrategias para encontrar una cura se centre en las células T CD8⁺.

Después de la realización de los diferentes ensayos *in vitro*, y viendo como hemos conseguido mejorar la respuesta CTL de los linfocitos citotóxicos, nos centramos en la evaluación del bloqueo de la unión de Gal-9 a TIM-3 *ex vivo*. Incluimos 15 pacientes, de los cuales fueron evaluables 10, los pacientes seleccionados en las consultas Monográficas de Infección por VIH se encontraban en tratamiento antirretroviral durante más de 1 año y presentando una carga viral indetectable.

Estos resultados se asemejan a los obtenidos *in vitro*, es decir el bloqueo de la unión Gal-9: TIM-3 con un anticuerpo mejora significativamente la actividad CTL y las células NK no afectan a tal actividad.

Estos ensayos evalúan la capacidad de las células T CD8⁺ específicas de VIH-1 modificadas con un anticuerpo para suprimir la infección vírica. Uno de los puntos que vemos más importantes es que las células T CD8⁺ tienen que estar previamente tratadas con el anticuerpo para potenciarlas y así eliminar el virus.

5. Determinación de citoquinas en los co-cultivos

La infección de VIH-1 provoca una variación de los niveles de las citoquinas tanto pro- como anti-inflamatorias, las cuales desempeñan un papel importante en la modulación de la homeostasis del sistema inmune. La infección por VIH-1 tiende a aumentar la producción de citoquinas Th2, es decir IL-4 e IL-10, citoquinas pro-inflamatorias como IL-1, IL-6 e IL-18, y TNF- α y suele provocar una disminución de las citoquinas Th1 como IL-2 y el IFN- γ (258).

Por otro lado, se ha demostrado que ciertas citoquinas (TNF- α , IL-1 e IL-6) son capaces de estimular la replicación del VIH-1 en células T. Las citoquinas IL-2, IL-7 e IL-15 regulan al alza la replicación del VIH-1 en las células T. Sin embargo, otras citoquinas como IL-10, IL-13, IFN- α pueden reprimir la replicación del VIH-1 en células T. Las citoquinas IL-4, IL-2 e IFN- γ son capaces de mejorar o reducir la replicación viral dependiendo del tipo de célula (258). Las citoquinas inmunosupresoras y proinflamatorias pueden inhibir la replicación viral ya que son capaces de favorecer la latencia del VIH-1 (259).

Las células T CD8⁺ específicas de VIH-1 en pacientes infectados son células que se caracterizan por la incapacidad de ejercer funciones efectoras como la citotoxicidad y la secreción de citoquinas en respuesta a la estimulación antigénica (217).

Los resultados mencionados en el apartado anterior de los co-cultivos procedentes tanto de los obtenidos *in vitro* como de los pacientes VIH-1 positivos nos han mostrado una mejora de la respuesta CTL tras modificar las células T CD8⁺. Sin embargo, al analizar las citoquinas no hemos encontrado diferencias entre las muestras con o sin anticuerpo. Por lo tanto, el mecanismo por el cual las células T CD8⁺ moduladas con el anticuerpo son capaces de eliminar el virus y que por lo tanto haya un control de la replicación vírica no se debe a la secreción de citoquinas. Uno de los motivos por el cual no vemos esa diferencia en los valores de citoquinas se deba a que es tan fuerte la estimulación antigénica que de alguna forma enmascara el efecto del anticuerpo bloqueando TIM-3 que no somos por lo tanto capaces de distinguir, por otro lado si estas células están agotadas como hemos visto en la bibliografía (217,260) aunque se les estimule no serán capaces de secretar citoquinas. Por lo que o bien las células de estos pacientes no han llegado al punto de agotarse o el mecanismo por el cual las células T CD8⁺ son capaces de eliminar el virus se deba a otro motivo.

Por lo tanto, el mecanismo por el cual las células T CD8⁺ moduladas con el anticuerpo son capaces de modular el virus y que por lo tanto no haya un control de la replicación vírica no se debe a la secreción de citoquinas.

El mecanismo de control parece ser más complejo e intervenir un mayor número de factores (261). Como se describe en el trabajo llevado a cabo por este grupo, en el que se analizan

los perfiles genéticos y metabólicos y su efecto en la funcionalidad de las células TCD8⁺ VIH-específicas de pacientes controladores de élite y pacientes no controladores (con tratamiento antirretroviral), existe una diferenciación en la expresión de determinados conjuntos de genes que llevan a la activación o bien de la vía mTORC1 (en el caso de los no controladores) o de la vía mTORC2 (en el caso de los controladores).

La regulación de la función efectora de las células T CD8⁺ estaría asociada a la vía mTORC2 cuya expresión vendría marcada por genes que se encuentran preferentemente expresados en genes de pacientes controladores. Específicamente en el caso de nuestro trabajo no sabemos cuánto de esta regulación se vería condicionada al bloquear el anticuerpo TIM-3 en estos CD8⁺ y la mejora observada en el control virológico. Será algo que merece la pena seguir investigando.

Si nos fijamos en los resultados obtenidos procedentes de los co-cultivos CD4⁺: NK, tampoco vemos ninguna diferencia, ya hemos visto que el bloqueo de TIM-3 en las células NK no mejora la respuesta, pero en las condiciones que no llevan anticuerpo y que por lo tanto deberían tener una mayor actividad citotóxica más potente y una mayor producción de citoquinas tampoco lo observamos.

En resumen, los datos aportados en esta Tesis Doctoral ponen de manifiesto el papel crucial de Gal-9 para modular la transcripción del VIH-1 y la capacidad de reactivar al virus latente. Por otro lado, es importante a tener en cuenta el uso de un anticuerpo frente a TIM-3 para la mejora de la respuesta CTL de los linfocitos T C8⁺. Dado los resultados obtenidos, tanto el uso de Gal-9 como del anticuerpo se podría emplear como una posible estrategia para la curación del VIH-1. Sin embargo, sería necesario realizar más experimentos, como evaluar Gag intracelular, para poder entender si galectina aumenta la cantidad de VIH-1 en el interior de la célula o si aumenta la cantidad de células que expresan Gag así como determinar si la infección se propaga después de añadir Gal-9.

Conclusiones

CONCLUSIONES

1. Gal-9 produce una reactivación eficiente del VIH-1 latente tanto en células Jurkat como en el modelo celular primario de latencia. Esta reactivación no parece estar mediada vía TIM-3.
2. En el modelo de latencia, la potencia de Gal-9 es alta, similar o mayor que la de otros agentes reactivadores de la latencia, con los que la hemos comparado. No se detectó sinergismo ni efectos aditivos al combinar Gal-9 con los otros ARLs.
3. El bloqueo de TIM-3 en las células T-CD8⁺ se traduce en una mejora en el control de la replicación del virus y sin impacto detectable en las células NK.
4. El bloqueo de TIM-3 con un anticuerpo específico en las células T-CD4⁺ infectadas no tuvo efecto sobre la reactivación del virus latente mediado por Gal-9.
5. El bloqueo de TIM-3 en las células T CD8⁺ de pacientes mejora la respuesta CTL. Este mismo bloqueo en las células NK no tuvo efectos negativos en la respuesta global. La presencia de Gal-9 no condiciona dicha respuesta.
6. La mejora de la respuesta de las células T CD8⁺ tras el bloqueo de TIM-3 no se asoció con cambios detectables en la actividad granzima/perforina de las células ni con ningún patrón específico de variación en las citoquinas.
7. Gal-9 y α -TIM-3 no mostraron signos de toxicidad celular en los estudios in vitro a las dosis utilizadas, lo que apoyaría su uso en animales de experimentación para reproducir los resultados obtenidos.
8. La reactivación del virus latente por Gal-9 y la mejora de la respuesta CTL mediante la inhibición de TIM-3, sin interferencia entre ellos, permitiría la administración conjunta de ambos en una estrategia *shock and kill*.

Bibliografía

BIBLIOGRAFÍA

1. Masur H, Michelis MA, Greene JB, Onorato I, Stouwe RA, Holzman RS, et al. An outbreak of community-acquired *Pneumocystis carinii* pneumonia: initial manifestation of cellular immune dysfunction. *N Engl J Med*. 1981 Dec 10;305(24):1431–8.
2. Gottlieb MS, Schroff R, Schanker HM, Weisman JD, Fan PT, Wolf RA, et al. *Pneumocystis carinii* pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. *N Engl J Med*. 1981 Dec 10;305(24):1425–31.
3. Barré-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*. 1983 May 20;220(4599):868–71.
4. Clavel F, Guétard D, Brun-Vézinet F, Chamaret S, Rey MA, Santos-Ferreira MO, et al. Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science*. 1986 Jul 18;233(4761):343–6.
5. De Cock KM, Adjorlolo G, Ekpini E, Sibailly T, Kouadio J, Maran M, et al. Epidemiology and transmission of HIV-2. Why there is no HIV-2 pandemic. *JAMA*. 1993 Nov 3;270(17):2083–6.
6. Fanales-Belasio E, Raimondo M, Suligo B, Buttò S. HIV virology and pathogenetic mechanisms of infection: a brief overview. *Ann Ist Super Sanita*. 2010;46(1):5–14.
7. Greene WC. The molecular biology of human immunodeficiency virus type 1 infection. *N Engl J Med*. 1991 Jan 31;324(5):308–17.
8. Alcamí J, Coiras M. [Immunopathogenesis of HIV infection]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2011 Mar;29(3):216–26.
9. Pomerantz RJ. Reservoirs, sanctuaries, and residual disease: the hiding spots of HIV-1. *HIV Clin Trials*. 2003 Apr;4(2):137–43.
10. Gandhi RT, Zheng L, Bosch RJ, Chan ES, Margolis DM, Read S, et al. The effect of raltegravir intensification on low-level residual viremia in HIV-infected patients on antiretroviral therapy: a randomized controlled trial. *PLoS Med*. 2010 Aug 10;7(8).
11. International AIDS Society Scientific Working Group on HIV Cure, Deeks SG, Autran B, Berkhout B, Benkirane M, Cairns S, et al. Towards an HIV cure: a global scientific strategy. *Nat Rev Immunol*. 2012 20;12(8):607–14.
12. Lorenzo-Redondo R, Fryer HR, Bedford T, Kim E-Y, Archer J, Pond SLK, et al. Persistent HIV-1 replication maintains the tissue reservoir during therapy. *Nature*. 2016 Feb 4;530(7588):51–6.
13. Scosyrev E. An overview of the human immunodeficiency virus featuring laboratory testing for drug resistance. *Clin Lab Sci J Am Soc Med Technol*. 2006;19(4):231–45; quiz 246–9.

14. Rodríguez-Muñoz J, Moreno S. Strategies for the cure of HIV infection. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2019;37(4):265–73.
15. Westermann J, Pabst R. Distribution of lymphocyte subsets and natural killer cells in the human body. *Clin Investig*. 1992 Jul;70(7):539–44.
16. Wong JK, Yukl SA. Tissue reservoirs of HIV. *Curr Opin HIV AIDS*. 2016;11(4):362–70.
17. Mehandru S, Poles MA, Tenner-Racz K, Horowitz A, Hurley A, Hogan C, et al. Primary HIV-1 infection is associated with preferential depletion of CD4+ T lymphocytes from effector sites in the gastrointestinal tract. *J Exp Med*. 2004 Sep 20;200(6):761–70.
18. Brenchley JM, Schacker TW, Ruff LE, Price DA, Taylor JH, Beilman GJ, et al. CD4+ T cell depletion during all stages of HIV disease occurs predominantly in the gastrointestinal tract. *J Exp Med*. 2004 Sep 20;200(6):749–59.
19. Mowat AM, Viney JL. The anatomical basis of intestinal immunity. *Immunol Rev*. 1997 Apr;156:145–66.
20. Pantaleo G, Graziosi C, Butini L, Pizzo PA, Schnittman SM, Kotler DP, et al. Lymphoid organs function as major reservoirs for human immunodeficiency virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991 Nov 1;88(21):9838–42.
21. Gray LR, Roche M, Flynn JK, Wesselingh SL, Gorry PR, Churchill MJ. Is the central nervous system a reservoir of HIV-1? *Curr Opin HIV AIDS*. 2014 Nov;9(6):552–8.
22. Churchill MJ, Gorry PR, Cowley D, Lal L, Sonza S, Purcell DFJ, et al. Use of laser capture microdissection to detect integrated HIV-1 DNA in macrophages and astrocytes from autopsy brain tissues. *J Neurovirol*. 2006 Apr;12(2):146–52.
23. Canestri A, Lescure F-X, Jaureguiberry S, Moulignier A, Amiel C, Marcelin AG, et al. Discordance between cerebral spinal fluid and plasma HIV replication in patients with neurological symptoms who are receiving suppressive antiretroviral therapy. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 2010 Mar 1;50(5):773–8.
24. Smit TK, Brew BJ, Tourtellotte W, Morgello S, Gelman BB, Saksena NK. Independent evolution of human immunodeficiency virus (HIV) drug resistance mutations in diverse areas of the brain in HIV-infected patients, with and without dementia, on antiretroviral treatment. *J Virol*. 2004 Sep;78(18):10133–48.
25. Borzy MS, Connell RS, Kiessling AA. Detection of human immunodeficiency virus in cell-free seminal fluid. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 1988;1(5):419–24.
26. Pudney J, Anderson D. Orchitis and human immunodeficiency virus type 1 infected cells in reproductive tissues from men with the acquired immune deficiency syndrome. *Am J Pathol*. 1991 Jul;139(1):149–60.
27. Bagasra O, Farzadegan H, Seshamma T, Oakes JW, Saah A, Pomerantz RJ. Detection of HIV-1 proviral DNA in sperm from HIV-1-infected men. *AIDS Lond Engl*. 1994 Dec;8(12):1669–74.

28. Iversen AKN, Attermann J, Gerstoft J, Fugger L, Mullins JI, Skinhøj P. Longitudinal and cross-sectional studies of HIV-1 RNA and DNA loads in blood and the female genital tract. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2004 Dec 1;117(2):227–35.
29. Overbaugh J, Anderson RJ, Ndinya-Achola JO, Kreiss JK. Distinct but related human immunodeficiency virus type 1 variant populations in genital secretions and blood. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 1996 Jan 20;12(2):107–15.
30. Canaud G, Dejuq-Rainsford N, Avettand-Fenoël V, Viard J-P, Anglicheau D, Bienaimé F, et al. The kidney as a reservoir for HIV-1 after renal transplantation. *J Am Soc Nephrol JASN.* 2014 Feb;25(2):407–19.
31. Chakrabarti AK, Caruso L, Ding M, Shen C, Buchanan W, Gupta P, et al. Detection of HIV-1 RNA/DNA and CD4 mRNA in feces and urine from chronic HIV-1 infected subjects with and without anti-retroviral therapy. *AIDS Res Ther.* 2009 Oct 2;6:20.
32. Semenzato G, Agostini C, Ometto L, Zambello R, Trentin L, Chieco-Bianchi L, et al. CD8+ T lymphocytes in the lung of acquired immunodeficiency syndrome patients harbor human immunodeficiency virus type 1. *Blood.* 1995 May 1;85(9):2308–14.
33. Siliciano RF, Greene WC. HIV latency. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2011 Sep;1(1):a007096.
34. Chun TW, Finzi D, Margolick J, Chadwick K, Schwartz D, Siliciano RF. In vivo fate of HIV-1-infected T cells: quantitative analysis of the transition to stable latency. *Nat Med.* 1995 Dec;1(12):1284–90.
35. Chun TW, Carruth L, Finzi D, Shen X, DiGiuseppe JA, Taylor H, et al. Quantification of latent tissue reservoirs and total body viral load in HIV-1 infection. *Nature.* 1997 May 8;387(6629):183–8.
36. Buzon MJ, Martin-Gayo E, Pereyra F, Ouyang Z, Sun H, Li JZ, et al. Long-term antiretroviral treatment initiated at primary HIV-1 infection affects the size, composition, and decay kinetics of the reservoir of HIV-1-infected CD4 T cells. *J Virol.* 2014 Sep 1;88(17):10056–65.
37. Saksena NK, Potter SJ. Reservoirs of HIV-1 in vivo: implications for antiretroviral therapy. *AIDS Rev.* 2003 Mar;5(1):3–18.
38. Jayakumar P, Berger I, Autschbach F, Weinstein M, Funke B, Verdin E, et al. Tissue-resident macrophages are productively infected ex vivo by primary X4 isolates of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol.* 2005 Apr;79(8):5220–6.
39. Perelson AS, Essunger P, Cao Y, Vesananen M, Hurley A, Saksela K, et al. Decay characteristics of HIV-1-infected compartments during combination therapy. *Nature.* 1997 May 8;387(6629):188–91.
40. Kulpa DA, Chomont N. HIV persistence in the setting of antiretroviral therapy: when, where and how does HIV hide? *J Virus Erad.* 1(2):59–68.
41. Chun T-W, Nickle DC, Justement JS, Meyers JH, Roby G, Hallahan CW, et al. Persistence of HIV in gut-associated lymphoid tissue despite long-term antiretroviral therapy. *J Infect Dis.* 2008 Mar 1;197(5):714–20.

42. Deeks SG, Lewin SR, Ross AL, Ananworanich J, Benkirane M, Cannon P, et al. International AIDS Society global scientific strategy: towards an HIV cure 2016. *Nat Med*. 2016;22(8):839–50.
43. Bui JK, Sobolewski MD, Keele BF, Spindler J, Musick A, Wiegand A, et al. Proviruses with identical sequences comprise a large fraction of the replication-competent HIV reservoir. *PLoS Pathog*. 2017;13(3):e1006283.
44. Yang H-C, Xing S, Shan L, O’Connell K, Dinoso J, Shen A, et al. Small-molecule screening using a human primary cell model of HIV latency identifies compounds that reverse latency without cellular activation. *J Clin Invest*. 2009 Nov;119(11):3473–86.
45. Fromentin R, Bakeman W, Lawani MB, Khoury G, Hartogensis W, DaFonseca S, et al. CD4+ T Cells Expressing PD-1, TIGIT and LAG-3 Contribute to HIV Persistence during ART. *PLoS Pathog*. 2016;12(7):e1005761.
46. Khaitan A, Unutmaz D. Revisiting immune exhaustion during HIV infection. *Curr HIV/AIDS Rep*. 2011 Mar;8(1):4–11.
47. Moir S, Ho J, Malaspina A, Wang W, DiPoto AC, O’Shea MA, et al. Evidence for HIV-associated B cell exhaustion in a dysfunctional memory B cell compartment in HIV-infected viremic individuals. *J Exp Med*. 2008 Aug 4;205(8):1797–805.
48. Yi JS, Cox MA, Zajac AJ. T-cell exhaustion: characteristics, causes and conversion. *Immunology*. 2010 Apr;129(4):474–81.
49. Kaufmann DE, Walker BD. Programmed death-1 as a factor in immune exhaustion and activation in HIV infection. *Curr Opin HIV AIDS*. 2008 May;3(3):362–7.
50. Anderson KM, Czinn SJ, Redline RW, Blanchard TG. Induction of CTLA-4-mediated anergy contributes to persistent colonization in the murine model of gastric *Helicobacter pylori* infection. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2006 May 1;176(9):5306–13.
51. Zubairi S, Sanos SL, Hill S, Kaye PM. Immunotherapy with OX40L-Fc or anti-CTLA-4 enhances local tissue responses and killing of *Leishmania donovani*. *Eur J Immunol*. 2004 May;34(5):1433–40.
52. Graefe SEB, Jacobs T, Wächter U, Bröker BM, Fleischer B. CTLA-4 regulates the murine immune response to *Trypanosoma cruzi* infection. *Parasite Immunol*. 2004 Jan;26(1):19–28.
53. Barber DL, Wherry EJ, Masopust D, Zhu B, Allison JP, Sharpe AH, et al. Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature*. 2006 Feb 9;439(7077):682–7.
54. Leng Q, Bentwich Z, Magen E, Kalinkovich A, Borkow G. CTLA-4 upregulation during HIV infection: association with anergy and possible target for therapeutic intervention. *AIDS Lond Engl*. 2002 Mar 8;16(4):519–29.
55. Kaufmann DE, Kavanagh DG, Pereyra F, Zaunders JJ, Mackey EW, Miura T, et al. Upregulation of CTLA-4 by HIV-specific CD4+ T cells correlates with disease progression and defines a reversible immune dysfunction. *Nat Immunol*. 2007 Nov;8(11):1246–54.

56. Kaufmann DE, Walker BD. PD-1 and CTLA-4 inhibitory cosignaling pathways in HIV infection and the potential for therapeutic intervention. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2009 May 15;182(10):5891–7.
57. Hannier S, Tournier M, Bismuth G, Triebel F. CD3/TCR complex-associated lymphocyte activation gene-3 molecules inhibit CD3/TCR signaling. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1998 Oct 15;161(8):4058–65.
58. Blackburn SD, Shin H, Haining WN, Zou T, Workman CJ, Polley A, et al. Coregulation of CD8+ T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection. *Nat Immunol*. 2009 Jan;10(1):29–37.
59. Richter K, Agnellini P, Oxenius A. On the role of the inhibitory receptor LAG-3 in acute and chronic LCMV infection. *Int Immunol*. 2010 Jan;22(1):13–23.
60. Cox MA, Nechanitzky R, Mak TW. Check point inhibitors as therapies for infectious diseases. *Curr Opin Immunol*. 2017 Oct;48:61–7.
61. Chew GM, Fujita T, Webb GM, Burwitz BJ, Wu HL, Reed JS, et al. TIGIT Marks Exhausted T Cells, Correlates with Disease Progression, and Serves as a Target for Immune Restoration in HIV and SIV Infection. *PLoS Pathog*. 2016 Jan;12(1):e1005349.
62. Hatano H, Jain V, Hunt PW, Lee T-H, Sinclair E, Do TD, et al. Cell-based measures of viral persistence are associated with immune activation and programmed cell death protein 1 (PD-1)-expressing CD4+ T cells. *J Infect Dis*. 2013 Jul;208(1):50–6.
63. Persaud D, Gay H, Ziemniak C, Chen YH, Piatak M, Chun T-W, et al. Absence of detectable HIV-1 viremia after treatment cessation in an infant. *N Engl J Med*. 2013 Nov 7;369(19):1828–35.
64. Sáez-Ciri3n A, Bacchus C, Hocqueloux L, Avettand-Fenoel V, Girault I, Lecuroux C, et al. Post-treatment HIV-1 controllers with a long-term virological remission after the interruption of early initiated antiretroviral therapy ANRS VISCONTI Study. *PLoS Pathog*. 2013 Mar;9(3):e1003211.
65. Zhang L, Ramratnam B, Tenner-Racz K, He Y, Vesanen M, Lewin S, et al. Quantifying residual HIV-1 replication in patients receiving combination antiretroviral therapy. *N Engl J Med*. 1999 May 27;340(21):1605–13.
66. Blankson JN, Finzi D, Pierson TC, Sabundayo BP, Chadwick K, Margolick JB, et al. Biphasic decay of latently infected CD4+ T cells in acute human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Infect Dis*. 2000 Dec;182(6):1636–42.
67. Lori F, Jessen H, Lieberman J, Finzi D, Rosenberg E, Tinelli C, et al. Treatment of human immunodeficiency virus infection with hydroxyurea, didanosine, and a protease inhibitor before seroconversion is associated with normalized immune parameters and limited viral reservoir. *J Infect Dis*. 1999 Dec;180(6):1827–32.
68. Kaufmann DE, Lichterfeld M, Altfeld M, Addo MM, Johnston MN, Lee PK, et al. Limited durability of viral control following treated acute HIV infection. *PLoS Med*. 2004 Nov;1(2):e36.

69. Llibre JM, Martínez-Picado J. [Potential of integrase inhibitors to deplete HIV reservoirs or prevent their replenishment]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2008 Nov;26 Suppl 12:17–22.
70. Buzón MJ, Massanella M, Llibre JM, Esteve A, Dahl V, Puertas MC, et al. HIV-1 replication and immune dynamics are affected by raltegravir intensification of HAART-suppressed subjects. *Nat Med*. 2010 Apr;16(4):460–5.
71. Llibre JM, Buzón MJ, Massanella M, Esteve A, Dahl V, Puertas MC, et al. Treatment intensification with raltegravir in subjects with sustained HIV-1 viraemia suppression: a randomized 48-week study. *Antivir Ther*. 2012;17(2):355–64.
72. Yukl SA, Shergill AK, McQuaid K, Gianella S, Lampiris H, Hare CB, et al. Effect of raltegravir-containing intensification on HIV burden and T-cell activation in multiple gut sites of HIV-positive adults on suppressive antiretroviral therapy. *AIDS Lond Engl*. 2010 Oct 23;24(16):2451–60.
73. Vallejo A, Gutierrez C, Hernandez-Novoa B, Diaz L, Madrid N, Abad-Fernandez M, et al. The effect of intensification with raltegravir on the HIV-1 reservoir of latently infected memory CD4 T cells in suppressed patients. *AIDS Lond Engl*. 2012 Sep 24;26(15):1885–94.
74. Katlama C, Deeks SG, Autran B, Martinez-Picado J, van Lunzen J, Rouzioux C, et al. Barriers to a cure for HIV: new ways to target and eradicate HIV-1 reservoirs. *Lancet Lond Engl*. 2013 Jun 15;381(9883):2109–17.
75. Dinoso JB, Kim SY, Wiegand AM, Palmer SE, Gange SJ, Cranmer L, et al. Treatment intensification does not reduce residual HIV-1 viremia in patients on highly active antiretroviral therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Jun 9;106(23):9403–8.
76. Gutiérrez C, Díaz L, Vallejo A, Hernández-Novoa B, Abad M, Madrid N, et al. Intensification of antiretroviral therapy with a CCR5 antagonist in patients with chronic HIV-1 infection: effect on T cells latently infected. *PloS One*. 2011;6(12):e27864.
77. Bosque A, Planelles V. Induction of HIV-1 latency and reactivation in primary memory CD4+ T cells. *Blood*. 2009 Jan 1;113(1):58–65.
78. Madrid-Elena N, García-Bermejo ML, Serrano-Villar S, Díaz-de Santiago A, Sastre B, Gutiérrez C, et al. Maraviroc Is Associated with Latent HIV-1 Reactivation through NF- κ B Activation in Resting CD4+ T Cells from HIV-Infected Individuals on Suppressive Antiretroviral Therapy. *J Virol*. 2018 May 1;92(9).
79. Fletcher CV, Staskus K, Wietgreffe SW, Rothenberger M, Reilly C, Chipman JG, et al. Persistent HIV-1 replication is associated with lower antiretroviral drug concentrations in lymphatic tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014 Feb 11;111(6):2307–12.
80. Cohen J. HIV/AIDS research. Tissue says blood is misleading, confusing HIV cure efforts. *Science*. 2011 Dec 23;334(6063):1614.
81. Gama L, Abreu CM, Shirk EN, Price SL, Li M, Laird GM, et al. Reactivation of simian immunodeficiency virus reservoirs in the brain of virally suppressed macaques. *AIDS Lond Engl*. 2017 02;31(1):5–14.

82. Bednar MM, Sturdevant CB, Tompkins LA, Arrildt KT, Dukhovlinova E, Kincer LP, et al. Compartmentalization, Viral Evolution, and Viral Latency of HIV in the CNS. *Curr HIV/AIDS Rep.* 2015 Jun;12(2):262–71.
83. Letendre SL, Ellis RJ, Ances BM, McCutchan JA. Neurologic complications of HIV disease and their treatment. *Top HIV Med Publ Int AIDS Soc USA.* 2010 May;18(2):45–55.
84. Siliciano JD, Siliciano RF. Recent developments in the search for a cure for HIV-1 infection: targeting the latent reservoir for HIV-1. *J Allergy Clin Immunol.* 2014 Jul;134(1):12–9.
85. Honeycutt JB, Wahl A, Baker C, Spagnuolo RA, Foster J, Zakharova O, et al. Macrophages sustain HIV replication in vivo independently of T cells. *J Clin Invest.* 2016 Apr 1;126(4):1353–66.
86. Beck SE, Queen SE, Witwer KW, Metcalf Pate KA, Mangus LM, Gama L, et al. Paving the path to HIV neurotherapy: Predicting SIV CNS disease. *Eur J Pharmacol.* 2015 Jul 15;759:303–12.
87. Hütter G, Nowak D, Mossner M, Ganepola S, Müssig A, Allers K, et al. Long-term control of HIV by CCR5 Delta32/Delta32 stem-cell transplantation. *N Engl J Med.* 2009 Feb 12;360(7):692–8.
88. Allers K, Hütter G, Hofmann J, Loddenkemper C, Rieger K, Thiel E, et al. Evidence for the cure of HIV infection by CCR5Δ32/Δ32 stem cell transplantation. *Blood.* 2011 Mar 10;117(10):2791–9.
89. Yukl SA, Boritz E, Busch M, Bentsen C, Chun T-W, Douek D, et al. Challenges in detecting HIV persistence during potentially curative interventions: a study of the Berlin patient. *PLoS Pathog.* 2013;9(5):e1003347.
90. Gupta RK, Abdul-Jawad S, McCoy LE, Mok HP, Peppas D, Salgado M, et al. HIV-1 remission following CCR5Δ32/Δ32 haematopoietic stem-cell transplantation. *Nature.* 2019 Apr;568(7751):244–8.
91. Cannon P, June C. Chemokine receptor 5 knockout strategies. *Curr Opin HIV AIDS.* 2011 Jan;6(1):74–9.
92. Younan PM, Polacino P, Kowalski JP, Peterson CW, Maurice NJ, Williams NP, et al. Positive selection of mC46-expressing CD4+ T cells and maintenance of virus specific immunity in a primate AIDS model. *Blood.* 2013 Jul 11;122(2):179–87.
93. Hu W, Kaminski R, Yang F, Zhang Y, Cosentino L, Li F, et al. RNA-directed gene editing specifically eradicates latent and prevents new HIV-1 infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014 Aug 5;111(31):11461–6.
94. Deeks SG. HIV: Shock and kill. *Nature.* 2012 Jul 25;487(7408):439–40.
95. Shan L, Deng K, Shroff NS, Durand CM, Rabi SA, Yang H-C, et al. Stimulation of HIV-1-specific cytolytic T lymphocytes facilitates elimination of latent viral reservoir after virus reactivation. *Immunity.* 2012 Mar 23;36(3):491–501.

96. Lehrman G, Hogue IB, Palmer S, Jennings C, Spina CA, Wiegand A, et al. Depletion of latent HIV-1 infection in vivo: a proof-of-concept study. *Lancet Lond Engl.* 2005 Aug 13;366(9485):549–55.
97. Siliciano JD, Lai J, Callender M, Pitt E, Zhang H, Margolick JB, et al. Stability of the latent reservoir for HIV-1 in patients receiving valproic acid. *J Infect Dis.* 2007 Mar 15;195(6):833–6.
98. Smith MZ, Wightman F, Lewin SR. HIV reservoirs and strategies for eradication. *Curr HIV/AIDS Rep.* 2012 Mar;9(1):5–15.
99. Archin NM, Liberty AL, Kashuba AD, Choudhary SK, Kuruc JD, Crooks AM, et al. Administration of vorinostat disrupts HIV-1 latency in patients on antiretroviral therapy. *Nature.* 2012 Jul 25;487(7408):482–5.
100. Bernhard W, Barreto K, Saunders A, Dahabieh MS, Johnson P, Sadowski I. The Suv39H1 methyltransferase inhibitor chaetocin causes induction of integrated HIV-1 without producing a T cell response. *FEBS Lett.* 2011 Nov 16;585(22):3549–54.
101. Friedman J, Cho W-K, Chu CK, Keedy KS, Archin NM, Margolis DM, et al. Epigenetic silencing of HIV-1 by the histone H3 lysine 27 methyltransferase enhancer of Zeste 2. *J Virol.* 2011 Sep;85(17):9078–89.
102. Imai K, Togami H, Okamoto T. Involvement of histone H3 lysine 9 (H3K9) methyltransferase G9a in the maintenance of HIV-1 latency and its reactivation by BIX01294. *J Biol Chem.* 2010 May 28;285(22):16538–45.
103. Williams SA, Chen L-F, Kwon H, Fenard D, Bisgrove D, Verdin E, et al. Prostratin antagonizes HIV latency by activating NF-kappaB. *J Biol Chem.* 2004 Oct 1;279(40):42008–17.
104. Kulkosky J, Culnan DM, Roman J, Dornadula G, Schnell M, Boyd MR, et al. Prostratin: activation of latent HIV-1 expression suggests a potential inductive adjuvant therapy for HAART. *Blood.* 2001 Nov 15;98(10):3006–15.
105. Gutiérrez C, Serrano-Villar S, Madrid-Elena N, Pérez-Elías MJ, Martín ME, Barbas C, et al. Bryostatin-1 for latent virus reactivation in HIV-infected patients on antiretroviral therapy. *AIDS Lond Engl.* 2016 01;30(9):1385–92.
106. López-Huertas MR, Jiménez-Tormo L, Madrid-Elena N, Gutiérrez C, Rodríguez-Mora S, Coiras M, et al. The CCR5-antagonist Maraviroc reverses HIV-1 latency in vitro alone or in combination with the PKC-agonist Bryostatin-1. *Sci Rep.* 2017 24;7(1):2385.
107. Sjøgaard OS, Graversen ME, Leth S, Olesen R, Brinkmann CR, Nissen SK, et al. The Depsipeptide Romidepsin Reverses HIV-1 Latency In Vivo. *PLoS Pathog.* 2015 Sep;11(9):e1005142.
108. Elliott JH, McMahon JH, Chang CC, Lee SA, Hartogensis W, Bumpus N, et al. Short-term administration of disulfiram for reversal of latent HIV infection: a phase 2 dose-escalation study. *Lancet HIV.* 2015 Dec;2(12):e520-529.
109. Iwai Y, Terawaki S, Ikegawa M, Okazaki T, Honjo T. PD-1 inhibits antiviral immunity at the effector phase in the liver. *J Exp Med.* 2003 Jul 7;198(1):39–50.

110. Blackburn SD, Shin H, Freeman GJ, Wherry EJ. Selective expansion of a subset of exhausted CD8 T cells by alphaPD-L1 blockade. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Sep 30;105(39):15016–21.
111. Seung E, Dudek TE, Allen TM, Freeman GJ, Luster AD, Tager AM. PD-1 blockade in chronically HIV-1-infected humanized mice suppresses viral loads. *PLoS One*. 2013;8(10):e77780.
112. Velu V, Titanji K, Zhu B, Husain S, Pladevega A, Lai L, et al. Enhancing SIV-specific immunity in vivo by PD-1 blockade. *Nature*. 2009 Mar 12;458(7235):206–10.
113. Farkona S, Diamandis EP, Blasutig IM. Cancer immunotherapy: the beginning of the end of cancer? *BMC Med*. 2016 May 5;14:73.
114. Ipilimumab administration for advanced melanoma in patients with pre-existing Hepatitis B or C infection: a multicenter, retrospective case series. - PubMed - NCBI [Internet]. [cited 2019 Jul 30]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25317333>
115. Cecchinato V, Trynieszewska E, Ma ZM, Vaccari M, Boasso A, Tsai W-P, et al. Immune activation driven by CTLA-4 blockade augments viral replication at mucosal sites in simian immunodeficiency virus infection. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2008 Apr 15;180(8):5439–47.
116. Callahan MK, Postow MA, Wolchok JD. CTLA-4 and PD-1 Pathway Blockade: Combinations in the Clinic. *Front Oncol*. 2014;4:385.
117. Barondes SH, Castronovo V, Cooper DN, Cummings RD, Drickamer K, Feizi T, et al. Galectins: a family of animal beta-galactoside-binding lectins. *Cell*. 1994 Feb 25;76(4):597–8.
118. Barondes SH, Cooper DN, Gitt MA, Leffler H. Galectins. Structure and function of a large family of animal lectins. *J Biol Chem*. 1994 Aug 19;269(33):20807–10.
119. Johannes L, Jacob R, Leffler H. Galectins at a glance. *J Cell Sci*. 2018 May 1;131(9).
120. Leffler H, Barondes SH. Specificity of binding of three soluble rat lung lectins to substituted and unsubstituted mammalian beta-galactosides. *J Biol Chem*. 1986 Aug 5;261(22):10119–26.
121. Cooper DN, Barondes SH. God must love galectins; he made so many of them. *Glycobiology*. 1999 Oct;9(10):979–84.
122. Cummings RD, Liu F-T, Vasta GR. Galectins. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, Stanley P, Hart GW, Aebi M, et al., editors. *Essentials of Glycobiology* [Internet]. 3rd ed. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2015 [cited 2019 Jul 27]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK453091/>
123. Hirabayashi J, Hashidate T, Arata Y, Nishi N, Nakamura T, Hirashima M, et al. Oligosaccharide specificity of galectins: a search by frontal affinity chromatography. *Biochim Biophys Acta*. 2002 Sep 19;1572(2–3):232–54.

124. Rabinovich GA, Toscano MA, Jackson SS, Vasta GR. Functions of cell surface galectin-glycoprotein lattices. *Curr Opin Struct Biol.* 2007 Oct;17(5):513–20.
125. Cooper DNW. Galectinomics: finding themes in complexity. *Biochim Biophys Acta.* 2002 Sep 19;1572(2–3):209–31.
126. Leffler H, Carlsson S, Hedlund M, Qian Y, Poirier F. Introduction to galectins. *Glycoconj J.* 2002;19(7–9):433–40.
127. Vasta GR. Roles of galectins in infection. *Nat Rev Microbiol.* 2009 Jun;7(6):424–38.
128. Liu F-T, Patterson RJ, Wang JL. Intracellular functions of galectins. *Biochim Biophys Acta.* 2002 Sep 19;1572(2–3):263–73.
129. Arthur CM, Baruffi MD, Cummings RD, Stowell SR. Evolving mechanistic insights into galectin functions. *Methods Mol Biol Clifton NJ.* 2015;1207:1–35.
130. Rabinovich GA, Rubinstein N. [Galectins: a novel family of proteins involved in the regulation of the immune response. Implications in immunopathological processes]. *Medicina (Mex).* 2001;61(1):85–92.
131. Romaniuk MA, Croci DO, Lapponi MJ, Tribulatti MV, Negrotto S, Poirier F, et al. Binding of galectin-1 to $\alpha\text{IIb}\beta_3$ integrin triggers “outside-in” signals, stimulates platelet activation, and controls primary hemostasis. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* 2012 Jul;26(7):2788–98.
132. Cao Z, Said N, Wu HK, Kuwabara I, Liu F-T, Panjwani N. Galectin-7 as a potential mediator of corneal epithelial cell migration. *Arch Ophthalmol Chic Ill 1960.* 2003 Jan;121(1):82–6.
133. Cooper D, Iqbal AJ, Gittens BR, Cervone C, Perretti M. The effect of galectins on leukocyte trafficking in inflammation: sweet or sour? *Ann N Y Acad Sci.* 2012 Apr;1253:181–92.
134. Cooper D, Norling LV, Perretti M. Novel insights into the inhibitory effects of Galectin-1 on neutrophil recruitment under flow. *J Leukoc Biol.* 2008 Jun;83(6):1459–66.
135. Norling LV, Sampaio ALF, Cooper D, Perretti M. Inhibitory control of endothelial galectin-1 on in vitro and in vivo lymphocyte trafficking. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* 2008 Mar;22(3):682–90.
136. Vyakarnam A, Dagher SF, Wang JL, Patterson RJ. Evidence for a role for galectin-1 in pre-mRNA splicing. *Mol Cell Biol.* 1997 Aug;17(8):4730–7.
137. Nakahara S, Oka N, Wang Y, Hogan V, Inohara H, Raz A. Characterization of the nuclear import pathways of galectin-3. *Cancer Res.* 2006 Oct 15;66(20):9995–10006.
138. Shalom-Feuerstein R, Cooks T, Raz A, Kloog Y. Galectin-3 regulates a molecular switch from N-Ras to K-Ras usage in human breast carcinoma cells. *Cancer Res.* 2005 Aug 15;65(16):7292–300.
139. Yoshii T, Fukumori T, Honjo Y, Inohara H, Kim H-RC, Raz A. Galectin-3 phosphorylation is required for its anti-apoptotic function and cell cycle arrest. *J Biol Chem.* 2002 Mar 1;277(9):6852–7.

140. Ueda S, Kuwabara I, Liu F-T. Suppression of tumor growth by galectin-7 gene transfer. *Cancer Res.* 2004 Aug 15;64(16):5672–6.
141. Hsu DK, Liu F-T. Regulation of cellular homeostasis by galectins. *Glycoconj J.* 2002;19(7–9):507–15.
142. Funasaka T, Raz A, Nangia-Makker P. Galectin-3 in angiogenesis and metastasis. *Glycobiology.* 2014 Oct;24(10):886–91.
143. Türeci O, Schmitt H, Fadle N, Pfreundschuh M, Sahin U. Molecular definition of a novel human galectin which is immunogenic in patients with Hodgkin's disease. *J Biol Chem.* 1997 Mar 7;272(10):6416–22.
144. Matsumoto R, Matsumoto H, Seki M, Hata M, Asano Y, Kanegasaki S, et al. Human ecalectin, a variant of human galectin-9, is a novel eosinophil chemoattractant produced by T lymphocytes. *J Biol Chem.* 1998 Jul 3;273(27):16976–84.
145. Leal-Pinto E, Tao W, Rappaport J, Richardson M, Knorr BA, Abramson RG. Molecular cloning and functional reconstitution of a urate transporter/channel. *J Biol Chem.* 1997 Jan 3;272(1):617–25.
146. Wada J, Kanwar YS. Identification and characterization of galectin-9, a novel beta-galactoside-binding mammalian lectin. *J Biol Chem.* 1997 Feb 28;272(9):6078–86.
147. Lai J-H, Luo S-F, Wang M-Y, Ho L-J. Translational Implication of Galectin-9 in the Pathogenesis and Treatment of Viral Infection. *Int J Mol Sci.* 2017 Oct 8;18(10).
148. Zhu C, Anderson AC, Schubart A, Xiong H, Imitola J, Khoury SJ, et al. The Tim-3 ligand galectin-9 negatively regulates T helper type 1 immunity. *Nat Immunol.* 2005 Dec;6(12):1245–52.
149. John S, Mishra R. Galectin-9: From cell biology to complex disease dynamics. *J Biosci.* 2016 Sep;41(3):507–34.
150. Heusschen R, Griffioen AW, Thijssen VL. Galectin-9 in tumor biology: a jack of multiple trades. *Biochim Biophys Acta.* 2013 Aug;1836(1):177–85.
151. Nagae M, Nishi N, Murata T, Usui T, Nakamura T, Wakatsuki S, et al. Crystal structure of the galectin-9 N-terminal carbohydrate recognition domain from *Mus musculus* reveals the basic mechanism of carbohydrate recognition. *J Biol Chem.* 2006 Nov 24;281(47):35884–93.
152. Vasta GR, Ahmed H, Nita-Lazar M, Banerjee A, Pasek M, Shridhar S, et al. Galectins as self/non-self recognition receptors in innate and adaptive immunity: an unresolved paradox. *Front Immunol.* 2012;3:199.
153. Tanikawa R, Tanikawa T, Okada Y, Nakano K, Hirashima M, Yamauchi A, et al. Interaction of galectin-9 with lipid rafts induces osteoblast proliferation through the c-Src/ERK signaling pathway. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res.* 2008 Feb;23(2):278–86.

154. Spitzenberger F, Graessler J, Schroeder HE. Molecular and functional characterization of galectin 9 mRNA isoforms in porcine and human cells and tissues. *Biochimie*. 2001 Sep;83(9):851–62.
155. Wada J, Ota K, Kumar A, Wallner EI, Kanwar YS. Developmental regulation, expression, and apoptotic potential of galectin-9, a beta-galactoside binding lectin. *J Clin Invest*. 1997 May 15;99(10):2452–61.
156. Spitzenberger F, Graessler J, Schroeder HE. Molecular and functional characterization of galectin 9 mRNA isoforms in porcine and human cells and tissues. *Biochimie*. 2001 Sep;83(9):851–62.
157. Bauersachs S, Ulbrich SE, Gross K, Schmidt SEM, Meyer HHD, Wenigerkind H, et al. Embryo-induced transcriptome changes in bovine endometrium reveal species-specific and common molecular markers of uterine receptivity. *Reprod Camb Engl*. 2006 Aug;132(2):319–31.
158. Igawa K, Satoh T, Hirashima M, Yokozeki H. Regulatory mechanisms of galectin-9 and eotaxin-3 synthesis in epidermal keratinocytes: possible involvement of galectin-9 in dermal eosinophilia of Th1-polarized skin inflammation. *Allergy*. 2006 Dec;61(12):1385–91.
159. Seki M, Oomizu S, Sakata K-M, Sakata A, Arikawa T, Watanabe K, et al. Galectin-9 suppresses the generation of Th17, promotes the induction of regulatory T cells, and regulates experimental autoimmune arthritis. *Clin Immunol Orlando Fla*. 2008 Apr;127(1):78–88.
160. Kashio Y, Nakamura K, Abedin MJ, Seki M, Nishi N, Yoshida N, et al. Galectin-9 induces apoptosis through the calcium-calpain-caspase-1 pathway. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2003 Apr 1;170(7):3631–6.
161. Boenisch O, D'Addio F, Watanabe T, Elyaman W, Magee CN, Yeung MY, et al. TIM-3: a novel regulatory molecule of alloimmune activation. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2010 Nov 15;185(10):5806–19.
162. Monney L, Sabatos CA, Gaglia JL, Ryu A, Waldner H, Chernova T, et al. Th1-specific cell surface protein Tim-3 regulates macrophage activation and severity of an autoimmune disease. *Nature*. 2002 Jan 31;415(6871):536–41.
163. Wiersma VR, de Bruyn M, Helfrich W, Bremer E. Therapeutic potential of Galectin-9 in human disease. *Med Res Rev*. 2013 Jun;33 Suppl 1:E102-126.
164. Chou F-C, Shieh S-J, Sytwu H-K. Attenuation of Th1 response through galectin-9 and T-cell Ig mucin 3 interaction inhibits autoimmune diabetes in NOD mice. *Eur J Immunol*. 2009 Sep;39(9):2403–11.
165. Naka EL, Ponciano VC, Cenedeze MA, Pacheco-Silva A, Câmara NOS. Detection of the Tim-3 ligand, galectin-9, inside the allograft during a rejection episode. *Int Immunopharmacol*. 2009 Jun;9(6):658–62.
166. Wang F, He W, Zhou H, Yuan J, Wu K, Xu L, et al. The Tim-3 ligand galectin-9 negatively regulates CD8+ alloreactive T cell and prolongs survival of skin graft. *Cell Immunol*. 2007 Dec;250(1–2):68–74.

167. He W, Fang Z, Wang F, Wu K, Xu Y, Zhou H, et al. Galectin-9 significantly prolongs the survival of fully mismatched cardiac allografts in mice. *Transplantation*. 2009 Sep 27;88(6):782–90.
168. Sziksz E, Kozma GT, Pállinger E, Komlósi ZI, Adori C, Kovács L, et al. Galectin-9 in allergic airway inflammation and hyper-responsiveness in mice. *Int Arch Allergy Immunol*. 2010;151(4):308–17.
169. Katoh S, Nobumoto A, Matsumoto N, Matsumoto K, Ehara N, Niki T, et al. Involvement of galectin-9 in lung eosinophilia in patients with eosinophilic pneumonia. *Int Arch Allergy Immunol*. 2010;153(3):294–302.
170. Warke RV, Xhaja K, Martin KJ, Fournier MF, Shaw SK, Brizuela N, et al. Dengue virus induces novel changes in gene expression of human umbilical vein endothelial cells. *J Virol*. 2003 Nov;77(21):11822–32.
171. Jayaraman P, Sada-Ovalle I, Beladi S, Anderson AC, Dardalhon V, Hotta C, et al. Tim3 binding to galectin-9 stimulates antimicrobial immunity. *J Exp Med*. 2010 Oct 25;207(11):2343–54.
172. Sada-Ovalle I, Chávez-Galán L, Torre-Bouscoulet L, Nava-Gamiño L, Barrera L, Jayaraman P, et al. The Tim3-galectin 9 pathway induces antibacterial activity in human macrophages infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2012 Dec 15;189(12):5896–902.
173. Imaizumi T, Kumagai M, Sasaki N, Kurotaki H, Mori F, Seki M, et al. Interferon-gamma stimulates the expression of galectin-9 in cultured human endothelial cells. *J Leukoc Biol*. 2002 Sep;72(3):486–91.
174. Mengshol JA, Golden-Mason L, Arikawa T, Smith M, Niki T, McWilliams R, et al. A crucial role for Kupffer cell-derived galectin-9 in regulation of T cell immunity in hepatitis C infection. *PLoS One*. 2010 Mar 4;5(3):e9504.
175. Chagan-Yasutan H, Ndhlovu LC, Lacuesta TL, Kubo T, Leano PSA, Niki T, et al. Galectin-9 plasma levels reflect adverse hematological and immunological features in acute dengue virus infection. *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol*. 2013 Dec;58(4):635–40.
176. Pelletier I, Hashidate T, Urashima T, Nishi N, Nakamura T, Futai M, et al. Specific recognition of *Leishmania major* poly-beta-galactosyl epitopes by galectin-9: possible implication of galectin-9 in interaction between *L. major* and host cells. *J Biol Chem*. 2003 Jun 20;278(25):22223–30.
177. Sehrawat S, Reddy PBJ, Rajasagi N, Suryawanshi A, Hirashima M, Rouse BT. Galectin-9/TIM-3 interaction regulates virus-specific primary and memory CD8 T cell response. *PLoS Pathog*. 2010 May 6;6(5):e1000882.
178. Merani S, Chen W, Elahi S. The bitter side of sweet: the role of Galectin-9 in immunopathogenesis of viral infections. *Rev Med Virol*. 2015 May;25(3):175–86.
179. Kageshita T, Kashio Y, Yamauchi A, Seki M, Abedin MJ, Nishi N, et al. Possible role of galectin-9 in cell aggregation and apoptosis of human melanoma cell lines and its clinical significance. *Int J Cancer*. 2002 Jun 20;99(6):809–16.

180. Irie A, Yamauchi A, Kontani K, Kihara M, Liu D, Shirato Y, et al. Galectin-9 as a prognostic factor with antimetastatic potential in breast cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2005 Apr 15;11(8):2962–8.
181. Liang M, Ueno M, Oomizu S, Arikawa T, Shinonaga R, Zhang S, et al. Galectin-9 expression links to malignant potential of cervical squamous cell carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2008 Aug;134(8):899–907.
182. Nagahara K, Arikawa T, Oomizu S, Kontani K, Nobumoto A, Tateno H, et al. Galectin-9 increases Tim-3+ dendritic cells and CD8+ T cells and enhances antitumor immunity via galectin-9-Tim-3 interactions. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2008 Dec 1;181(11):7660–9.
183. Chagan-Yasutan H, Saitoh H, Ashino Y, Arikawa T, Hirashima M, Li S, et al. Persistent elevation of plasma osteopontin levels in HIV patients despite highly active antiretroviral therapy. *Tohoku J Exp Med*. 2009 Aug;218(4):285–92.
184. Elahi S, Niki T, Hirashima M, Horton H. Galectin-9 binding to Tim-3 renders activated human CD4+ T cells less susceptible to HIV-1 infection. *Blood*. 2012 May 3;119(18):4192–204.
185. Tandon R, Chew GM, Byron MM, Borrow P, Niki T, Hirashima M, et al. Galectin-9 is rapidly released during acute HIV-1 infection and remains sustained at high levels despite viral suppression even in elite controllers. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2014 Jul;30(7):654–64.
186. Saitoh H, Ashino Y, Chagan-Yasutan H, Niki T, Hirashima M, Hattori T. Rapid decrease of plasma galectin-9 levels in patients with acute HIV infection after therapy. *Tohoku J Exp Med*. 2012;228(2):157–61.
187. Abdel-Mohsen M, Chavez L, Tandon R, Chew GM, Deng X, Danesh A, et al. Human Galectin-9 Is a Potent Mediator of HIV Transcription and Reactivation. *PLoS Pathog*. 2016;12(6):e1005677.
188. Abdel-Mohsen M, Wang C, Strain MC, Lada SM, Deng X, Cockerham LR, et al. Select host restriction factors are associated with HIV persistence during antiretroviral therapy. *AIDS Lond Engl*. 2015 Feb 20;29(4):411–20.
189. Kurose Y, Wada J, Kanzaki M, Teshigawara S, Nakatsuka A, Murakami K, et al. Serum galectin-9 levels are elevated in the patients with type 2 diabetes and chronic kidney disease. *BMC Nephrol*. 2013 Jan 22;14:23.
190. Baba M, Wada J, Eguchi J, Hashimoto I, Okada T, Yasuhara A, et al. Galectin-9 inhibits glomerular hypertrophy in db/db diabetic mice via cell-cycle-dependent mechanisms. *J Am Soc Nephrol JASN*. 2005 Nov;16(11):3222–34.
191. McIntire JJ, Umetsu DT, DeKruyff RH. TIM-1, a novel allergy and asthma susceptibility gene. *Springer Semin Immunopathol*. 2004 Feb;25(3–4):335–48.
192. Marsh DG, Neely JD, Breazeale DR, Ghosh B, Freidhoff LR, Ehrlich-Kautzky E, et al. Linkage analysis of IL4 and other chromosome 5q31.1 markers and total serum immunoglobulin E concentrations. *Science*. 1994 May 20;264(5162):1152–6.
193. Encinas JA, Kuchroo VK. Mapping and identification of autoimmunity genes. *Curr Opin Immunol*. 2000 Dec;12(6):691–7.

194. Freeman GJ, Casasnovas JM, Umetsu DT, DeKruyff RH. TIM genes: a family of cell surface phosphatidylserine receptors that regulate innate and adaptive immunity. *Immunol Rev.* 2010 May;235(1):172–89.
195. Kaplan G, Totsuka A, Thompson P, Akatsuka T, Moritsugu Y, Feinstone SM. Identification of a surface glycoprotein on African green monkey kidney cells as a receptor for hepatitis A virus. *EMBO J.* 1996 Aug 15;15(16):4282–96.
196. Feigelstock D, Thompson P, Mattoo P, Zhang Y, Kaplan GG. The human homolog of HAVcr-1 codes for a hepatitis A virus cellular receptor. *J Virol.* 1998 Aug;72(8):6621–8.
197. Kuchroo VK, Umetsu DT, DeKruyff RH, Freeman GJ. The TIM gene family: emerging roles in immunity and disease. *Nat Rev Immunol.* 2003 Jun;3(6):454–62.
198. DeKruyff RH, Bu X, Ballesteros A, Santiago C, Chim Y-LE, Lee H-H, et al. T cell/transmembrane, Ig, and mucin-3 allelic variants differentially recognize phosphatidylserine and mediate phagocytosis of apoptotic cells. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2010 Feb 15;184(4):1918–30.
199. Anderson AC, Xiao S, Kuchroo VK. Tim protein structures reveal a unique face for ligand binding. *Immunity.* 2007 Mar;26(3):273–5.
200. Nakae S, Iikura M, Suto H, Akiba H, Umetsu DT, DeKruyff RH, et al. TIM-1 and TIM-3 enhancement of Th2 cytokine production by mast cells. *Blood.* 2007 Oct 1;110(7):2565–8.
201. Degauque N, Mariat C, Kenny J, Zhang D, Gao W, Vu MD, et al. Immunostimulatory Tim-1-specific antibody deprograms Tregs and prevents transplant tolerance in mice. *J Clin Invest.* 2008 Feb;118(2):735–41.
202. Wong SH, Barlow JL, Nabarro S, Fallon PG, McKenzie ANJ. Tim-1 is induced on germinal centre B cells through B-cell receptor signalling but is not essential for the germinal centre response. *Immunology.* 2010 Sep;131(1):77–88.
203. Umetsu SE, Lee W-L, McIntire JJ, Downey L, Sanjanwala B, Akbari O, et al. TIM-1 induces T cell activation and inhibits the development of peripheral tolerance. *Nat Immunol.* 2005 May;6(5):447–54.
204. Tami C, Silberstein E, Manangeeswaran M, Freeman GJ, Umetsu SE, DeKruyff RH, et al. Immunoglobulin A (IgA) is a natural ligand of hepatitis A virus cellular receptor 1 (HAVCR1), and the association of IgA with HAVCR1 enhances virus-receptor interactions. *J Virol.* 2007 Apr;81(7):3437–46.
205. Wilker PR, Sedy JR, Grigura V, Murphy TL, Murphy KM. Evidence for carbohydrate recognition and homotypic and heterotypic binding by the TIM family. *Int Immunol.* 2007 Jun;19(6):763–73.
206. Santiago C, Ballesteros A, Tami C, Martínez-Muñoz L, Kaplan GG, Casasnovas JM. Structures of T Cell immunoglobulin mucin receptors 1 and 2 reveal mechanisms for regulation of immune responses by the TIM receptor family. *Immunity.* 2007 Mar;26(3):299–310.

207. Chakravarti S, Sabatos CA, Xiao S, Illes Z, Cha EK, Sobel RA, et al. Tim-2 regulates T helper type 2 responses and autoimmunity. *J Exp Med*. 2005 Aug 1;202(3):437–44.
208. Chen TT, Li L, Chung D-H, Allen CDC, Torti SV, Torti FM, et al. TIM-2 is expressed on B cells and in liver and kidney and is a receptor for H-ferritin endocytosis. *J Exp Med*. 2005 Oct 3;202(7):955–65.
209. Kumanogoh A, Marukawa S, Suzuki K, Takegahara N, Watanabe C, Ch'ng E, et al. Class IV semaphorin Sema4A enhances T-cell activation and interacts with Tim-2. *Nature*. 2002 Oct 10;419(6907):629–33.
210. Khademi M, Illés Z, Gielen AW, Marta M, Takazawa N, Baecher-Allan C, et al. T Cell Ig-and mucin-domain-containing molecule-3 (TIM-3) and TIM-1 molecules are differentially expressed on human Th1 and Th2 cells and in cerebrospinal fluid-derived mononuclear cells in multiple sclerosis. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2004 Jun 1;172(11):7169–76.
211. Anderson AC, Anderson DE, Bregoli L, Hastings WD, Kassam N, Lei C, et al. Promotion of tissue inflammation by the immune receptor Tim-3 expressed on innate immune cells. *Science*. 2007 Nov 16;318(5853):1141–3.
212. Shakhov AN, Rybtsov S, Tumanov AV, Shulenin S, Dean M, Kuprash DV, et al. SMUCKLER/TIM4 is a distinct member of TIM family expressed by stromal cells of secondary lymphoid tissues and associated with lymphotoxin signaling. *Eur J Immunol*. 2004 Feb;34(2):494–503.
213. Rodriguez-Manzanet R, Meyers JH, Balasubramanian S, Slavik J, Kassam N, Dardalhon V, et al. TIM-4 expressed on APCs induces T cell expansion and survival. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2008 Apr 1;180(7):4706–13.
214. Santiago C, Ballesteros A, Martínez-Muñoz L, Mellado M, Kaplan GG, Freeman GJ, et al. Structures of T cell immunoglobulin mucin protein 4 show a metal-Ion-dependent ligand binding site where phosphatidylserine binds. *Immunity*. 2007 Dec;27(6):941–51.
215. Hastings WD, Anderson DE, Kassam N, Koguchi K, Greenfield EA, Kent SC, et al. TIM-3 is expressed on activated human CD4+ T cells and regulates Th1 and Th17 cytokines. *Eur J Immunol*. 2009 Sep;39(9):2492–501.
216. Anderson AC, Lord GM, Dardalhon V, Lee DH, Sabatos-Peyton CA, Glimcher LH, et al. T-bet, a Th1 transcription factor regulates the expression of Tim-3. *Eur J Immunol*. 2010 Mar;40(3):859–66.
217. Zhu C, Anderson AC, Kuchroo VK. TIM-3 and its regulatory role in immune responses. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2011;350:1–15.
218. Szabo SJ, Kim ST, Costa GL, Zhang X, Fathman CG, Glimcher LH. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell*. 2000 Mar 17;100(6):655–69.
219. Cao E, Zang X, Ramagopal UA, Mukhopadhyaya A, Fedorov A, Fedorov E, et al. T cell immunoglobulin mucin-3 crystal structure reveals a galectin-9-independent ligand-binding surface. *Immunity*. 2007 Mar;26(3):311–21.
220. Miyanishi M, Tada K, Koike M, Uchiyama Y, Kitamura T, Nagata S. Identification of Tim4 as a phosphatidylserine receptor. *Nature*. 2007 Nov 15;450(7168):435–9.

221. Nakayama M, Akiba H, Takeda K, Kojima Y, Hashiguchi M, Azuma M, et al. Tim-3 mediates phagocytosis of apoptotic cells and cross-presentation. *Blood*. 2009 Apr 16;113(16):3821–30.
222. Sánchez-Fueyo A, Tian J, Picarella D, Domenig C, Zheng XX, Sabatos CA, et al. Tim-3 inhibits T helper type 1-mediated auto- and alloimmune responses and promotes immunological tolerance. *Nat Immunol*. 2003 Nov;4(11):1093–101.
223. Koguchi K, Anderson DE, Yang L, O'Connor KC, Kuchroo VK, Hafler DA. Dysregulated T cell expression of TIM3 in multiple sclerosis. *J Exp Med*. 2006 Jun 12;203(6):1413–8.
224. Yang L, Anderson DE, Kuchroo J, Hafler DA. Lack of TIM-3 immunoregulation in multiple sclerosis. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2008 Apr 1;180(7):4409–14.
225. Golden-Mason L, Palmer BE, Kassam N, Townshend-Bulson L, Livingston S, McMahon BJ, et al. Negative immune regulator Tim-3 is overexpressed on T cells in hepatitis C virus infection and its blockade rescues dysfunctional CD4+ and CD8+ T cells. *J Virol*. 2009 Sep;83(18):9122–30.
226. Klibi J, Niki T, Riedel A, Pioche-Durieu C, Souquere S, Rubinstein E, et al. Blood diffusion and Th1-suppressive effects of galectin-9-containing exosomes released by Epstein-Barr virus-infected nasopharyngeal carcinoma cells. *Blood*. 2009 Feb 26;113(9):1957–66.
227. Jones RB, Ndhlovu LC, Barbour JD, Sheth PM, Jha AR, Long BR, et al. Tim-3 expression defines a novel population of dysfunctional T cells with highly elevated frequencies in progressive HIV-1 infection. *J Exp Med*. 2008 Nov 24;205(12):2763–79.
228. Kassu A, Marcus RA, D'Souza MB, Kelly-McKnight EA, Golden-Mason L, Akkina R, et al. Regulation of virus-specific CD4+ T cell function by multiple costimulatory receptors during chronic HIV infection. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2010 Sep 1;185(5):3007–18.
229. Kassu A, Marcus RA, D'Souza MB, Kelly-McKnight EA, Palmer BE. Suppression of HIV replication by antiretroviral therapy reduces TIM-3 expression on HIV-specific CD8(+) T cells. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2011 Jan;27(1):1–3.
230. Frisancho-Kiss S, Nyland JF, Davis SE, Barrett MA, Gatewood SJL, Njoku DB, et al. Cutting edge: T cell Ig mucin-3 reduces inflammatory heart disease by increasing CTLA-4 during innate immunity. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2006 Jun 1;176(11):6411–5.
231. Bi S, Hong PW, Lee B, Baum LG. Galectin-9 binding to cell surface protein disulfide isomerase regulates the redox environment to enhance T-cell migration and HIV entry. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Jun 28;108(26):10650–5.
232. Jordan A, Defechereux P, Verdin E. The site of HIV-1 integration in the human genome determines basal transcriptional activity and response to Tat transactivation. *EMBO J*. 2001 Apr 2;20(7):1726–38.
233. Jordan A, Bisgrove D, Verdin E. HIV reproducibly establishes a latent infection after acute infection of T cells in vitro. *EMBO J*. 2003 Apr 15;22(8):1868–77.
234. Adachi A, Gendelman HE, Koenig S, Folks T, Willey R, Rabson A, et al. Production of acquired immunodeficiency syndrome-associated retrovirus in human and nonhuman cells transfected with an infectious molecular clone. *J Virol*. 1986 Aug;59(2):284–91.

235. Pear WS, Nolan GP, Scott ML, Baltimore D. Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 Sep 15;90(18):8392–6.
236. Coiras M, Bermejo M, Descours B, Mateos E, García-Pérez J, López-Huertas M-R, et al. IL-7 Induces SAMHD1 Phosphorylation in CD4+ T Lymphocytes, Improving Early Steps of HIV-1 Life Cycle. *Cell Rep*. 2016 Mar 8;14(9):2100–7.
237. Kondrack RM, Harbertson J, Tan JT, McBreen ME, Surh CD, Bradley LM. Interleukin 7 Regulates the Survival and Generation of Memory CD4 Cells. *J Exp Med*. 2003 Dec 15;198(12):1797–806.
238. Brady T, Kelly BJ, Male F, Roth S, Bailey A, Malani N, et al. Quantitation of HIV DNA integration: effects of differential integration site distributions on Alu-PCR assays. *J Virol Methods*. 2013 Apr;189(1):53–7.
239. Sáez-Cirión A, Shin SY, Versmisse P, Barré-Sinoussi F, Pancino G. Ex vivo T cell-based HIV suppression assay to evaluate HIV-specific CD8+ T-cell responses. *Nat Protoc*. 2010 Jun;5(6):1033–41.
240. Herrera-Camacho I, Anaya-Ruiz M, Perez-Santos M, Millán-Pérez Peña L, Bandala C, Landeta G. Cancer immunotherapy using anti-TIM3/PD-1 bispecific antibody: a patent evaluation of EP3356411A1. *Expert Opin Ther Pat*. 2019 Aug;29(8):587–93.
241. Wang H, Kaur G, Sankin AI, Chen F, Guan F, Zang X. Immune checkpoint blockade and CAR-T cell therapy in hematologic malignancies. *J Hematol Oncol* [Internet]. 2019 Jun 11 [cited 2019 Nov 2];12. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6558778/>
242. Wang F, He W, Yuan J, Wu K, Zhou H, Zhang W, et al. Activation of Tim-3-Galectin-9 pathway improves survival of fully allogeneic skin grafts. *Transpl Immunol*. 2008 Apr;19(1):12–9.
243. Seki M, Sakata K, Oomizu S, Arikawa T, Sakata A, Ueno M, et al. Beneficial effect of galectin 9 on rheumatoid arthritis by induction of apoptosis of synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum*. 2007 Dec;56(12):3968–76.
244. López-Huertas MR, Morín M, Madrid-Elena N, Gutiérrez C, Jiménez-Tormo L, Santoyo J, et al. Selective miRNA Modulation Fails to Activate HIV Replication in In Vitro Latency Models. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2019 Sep 6;17:323–36.
245. Saleh S, Solomon A, Wightman F, Xhila M, Cameron PU, Lewin SR. CCR7 ligands CCL19 and CCL21 increase permissiveness of resting memory CD4+ T cells to HIV-1 infection: a novel model of HIV-1 latency. *Blood*. 2007 Dec 15;110(13):4161–4.
246. Wu C, Thalhamer T, Franca RF, Xiao S, Wang C, Hotta C, et al. Galectin-9-CD44 interaction enhances stability and function of adaptive regulatory T cells. *Immunity*. 2014 Aug 21;41(2):270–82.
247. Lantéri M, Giordanengo V, Hiraoka N, Fuzibet J-G, Auburger P, Fukuda M, et al. Altered T cell surface glycosylation in HIV-1 infection results in increased susceptibility to galectin-1-induced cell death. *Glycobiology*. 2003 Dec;13(12):909–18.

248. Bi S, Earl LA, Jacobs L, Baum LG. Structural features of galectin-9 and galectin-1 that determine distinct T cell death pathways. *J Biol Chem*. 2008 May 2;283(18):12248–58.
249. Ndhlovu LC, Lopez-Vergès S, Barbour JD, Jones RB, Jha AR, Long BR, et al. Tim-3 marks human natural killer cell maturation and suppresses cell-mediated cytotoxicity. *Blood*. 2012 Apr 19;119(16):3734–43.
250. Mikulak J, Oriolo F, Zaghi E, Di Vito C, Mavilio D. Natural killer cells in HIV-1 infection and therapy. *AIDS Lond Engl*. 2017 13;31(17):2317–30.
251. Gleason MK, Lenvik TR, McCullar V, Felices M, O'Brien MS, Cooley SA, et al. Tim-3 is an inducible human natural killer cell receptor that enhances interferon gamma production in response to galectin-9. *Blood*. 2012 Mar 29;119(13):3064–72.
252. So EC, Khaladj-Ghom A, Ji Y, Amin J, Song Y, Burch E, et al. NK cell expression of Tim-3: First impressions matter. *Immunobiology*. 2019;224(3):362–70.
253. Goulder PJ, Phillips RE, Colbert RA, McAdam S, Ogg G, Nowak MA, et al. Late escape from an immunodominant cytotoxic T-lymphocyte response associated with progression to AIDS. *Nat Med*. 1997 Feb;3(2):212–7.
254. Pannus P, Vanham G. Viral Inhibitory Activity of CD8+ T Cells in HIV Infection. *AIDS Rev*. 2019;21(3):115–25.
255. Borrow P, Lewicki H, Hahn BH, Shaw GM, Oldstone MB. Virus-specific CD8+ cytotoxic T-lymphocyte activity associated with control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol*. 1994 Sep;68(9):6103–10.
256. Mackewicz CE, Ortega HW, Levy JA. CD8+ cell anti-HIV activity correlates with the clinical state of the infected individual. *J Clin Invest*. 1991 Apr;87(4):1462–6.
257. Gea-Banacloche JC, Migueles SA, Martino L, Shupert WL, McNeil AC, Sabbaghian MS, et al. Maintenance of large numbers of virus-specific CD8+ T cells in HIV-infected progressors and long-term nonprogressors. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2000 Jul 15;165(2):1082–92.
258. Hokello J, Sharma AL, Dimri M, Tyagi M. Insights into the HIV Latency and the Role of Cytokines. *Pathog Basel Switz*. 2019 Sep 4;8(3).
259. Delagrèverie HM, Delaugerre C, Lewin SR, Deeks SG, Li JZ. Ongoing Clinical Trials of Human Immunodeficiency Virus Latency-Reversing and Immunomodulatory Agents. *Open Forum Infect Dis*. 2016 Oct;3(4):ofw189.
260. Catalfamo M, Le Saout C, Lane HC. The role of cytokines in the pathogenesis and treatment of HIV infection. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2012 Oct;23(4–5):207–14.
261. Angin, M., Volant, S., Passaes, C. et al. Metabolic plasticity of HIV-specific CD8+ T cells is associated with enhanced antiviral potential and natural control of HIV-1 infection. *Nat Metab* 2019 1, 704–716



Universidad
de Alcalá