



Programa de Doctorado en Ciencias de la Salud

**IMPACTO Y MECANISMO DE ACCIÓN DEL TRATAMIENTO DE INHIBIDORES DE TIROSINA  
KINASAS EN LA INFECCIÓN POR EL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA**

Tesis Doctoral presentada por

**LORENA VIGÓN HERNÁNDEZ**

2022





Programa de Doctorado en Ciencias de la Salud

**IMPACTO Y MECANISMO DE ACCIÓN DEL TRATAMIENTO DE INHIBIDORES DE TIROSINA  
KINASAS EN LA INFECCIÓN POR EL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA**

Tesis Doctoral presentada por

**LORENA VIGÓN HERNÁNDEZ**

Director/a:

**DR. JOSÉ ALCAMÍ PERTEJO**

**DRA. M<sup>a</sup> TERESA COIRAS LÓPEZ**

Alcalá de Henares, 2022





El trabajo de Lorena Vigón Hernández ha sido financiado por un contrato ISCIII-PFIS (F17CIII/00025) asociado a PI16CIII/00034-ISCIII-FEDER



## Abreviaturas

**ADN** Ácido desoxirribonucleico

**ARN** Ácido ribonucleico

**ARNm** ARN mensajero

**bNAbs** anticuerpos neutralizantes de amplio espectro

**CMV** Citomegalovirus

**CYP3A4** Citocromo P450 3A4

**dCA** didehidro-cortistatina A

**dNTPS** desoxirribonucleótidos trifosfato

**dPCR** PCR digital

**ECDC** Centro Europeo de Prevención de Enfermedades y Control

**EMA** *European Medicines Agency*

**FDA** *U.S Food and Drug Administration*

**GALT** Tejido linfocitario asociado al intestino

**HLA** Molécula de histocompatibilidad

**HSH** Hombres que tienen sexo con hombres

**IL** Interleukina

**IIN** Inhibidores de integrasa

**INNTI** Inhibidores de la transcriptasa inversa no análogo nucleósido

**INTI** Inhibidores de la transcriptasa inversa análogo nucleósido

**IP** Inhibidores Proteasa

**IPDA** *Intact proviral DNA assay*, Ensayo de ADN proviral intacto

**IQR** Rango intercuartílico

**ITKs** Inhibidores de Tirosina kinasas

**K** mil

**LGLs** Linfocitos Grandes Granulares

**LH** Linfoma de Hodgkin

**LLA** Leucemia Linfoblástica Aguda

**LMA** Leucemia Mieloide Aguda

**LMC** Leucemia Mieloide Crónica

**LPA** Agente Promotor de Latencia

**LRA** Agente Revertiente de Latencia

**LUC** gen Renilla-Luciferasa

**MHC-I** Complejo de histocompatibilidad de clase I

**min** minutos

**NF-κB** factor nuclear-κB

**NK** Natural Killer

**ORF** *Open Reading Frame*

**pb** Pares de bases

**PBLs** Linfocitos de Sangre Periférica

**PCR** Reacción en cadena de la Polimerasa

**Ph+** Cromosoma Philadelphia

**PHA** Fitohemaglutinina

**PMA** forbol 12-miristato 13-acetato

**pSAMHD1** SAMHD1 fosforilado en la posición Thr592

**qPCR** PCR cuantitativa

**RCC** Respuesta Citogenética Completa

**RMM** Respuesta Molecular Mayor

**RMP** Respuesta Molecular Profunda

**SAMHD1** *SAM domain HD domain-containing protein 1*



**seg** segundos

**SEM** Error Estándar de la media

**Sida** Síndrome de la Inmunodeficiencia Humana

**TAR** Terapia antirretroviral

**TCM** Memoria Central

**TLR** Receptor toll-like

**TEM** Memoria Efectora

**TEMRA** Memoria Efectora Terminal

**TFR** remisión en ausencia de tratamiento

**VHC** Virus de la hepatitis C

**VIH** Virus de la Inmunodeficiencia humana

**VIH-1** Virus de la Inmunodeficiencia Humana tipo 1

**VIH-2** Virus de la Inmunodeficiencia Humana tipo 2

## Tabla de contenido

|  |          |
|--|----------|
| <b>RESUMEN .....</b>   | <b>1</b> |
| <b>ABSTRACT .....</b>  | <b>4</b> |
| <b>INTRODUCCIÓN.....</b>   | <b>7</b> |
| 1. Virus de la Inmunodeficiencia Humana.....                           | 8        |
| 1.1 Historia y origen.....   | 8        |
| 1.2 Epidemiología general .....  | 8        |
| 2. Aspectos virológicos de la infección por VIH.....                   | 9        |
| 2.1 Clasificación del VIH .....  | 9        |
| 2.2 Estructura y genoma del VIH-1 .....                                | 10       |
| 2.3 Ciclo replicación .....  | 11       |
| 2.3.1. Entrada.....  | 11       |
| 2.3.2. Transcripción inversa .....                                     | 13       |
| 2.3.3. Integración.....  | 13       |
| 2.3.4. Transcripción y traducción.....                                 | 13       |
| 2.3.5. Ensamblaje, empaquetado y maduración.....                       | 14       |
| 3. Patogénesis .....   | 14       |
| 3.1 Transmisión .....  | 14       |
| 3.2 Curso natural de la infección.....                                 | 14       |
| 3.2.1 Fase aguda.....  | 14       |
| 3.2.2 Fase crónica.....  | 15       |
| 3.2.3 Sida .....   | 15       |
| 4. Terapia antirretroviral.....  | 16       |
| 4.1 TAR como prevención.....   | 18       |
| 5. Reservorio.....   | 18       |
| 5.1 Reservorio anatómico y celular.....                                | 19       |
| 5.2 Mantenimiento homeostático del reservorio.....                     | 20       |
| 6. Búsqueda de una cura.....   | 21       |
| 6.1 Casos de curación .....  | 21       |
| 6.2 Principales estrategias desarrolladas para encontrar la cura ..... | 23       |
| 6.2.1 Estrategia Block and Lock .....                                  | 23       |
| 6.2.2 Estrategia Shock and Kill.....                                   | 24       |
| 6.2.3 Tratamiento temprano.....  | 25       |
| 6.2.4 Inmunomodulación del sistema inmune.....                         | 25       |
| 6.2.4.1 Inmunoterapia y anticuerpos de amplio espectro.....            | 25       |
| 6.2.4.2 Inhibidores de Tirosina Kinasas .....                          | 26       |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>HIPÓTESIS.....</b>   | <b>30</b> |
| <b>OBJETIVOS .....</b>  | <b>32</b> |
| <b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>  | <b>34</b> |
| 1. Pacientes.....   | 35        |
| 2. Aspectos éticos .....  | 35        |
| 3. Purificación de poblaciones celulares .....  | 35        |
| 4. Anticuerpos y vectores .....   | 36        |
| 5. Infección por VIH-1 <i>ex vivo</i> .....   | 36        |
| 6. Cuantificación de integración proviral mediante TaqMan qPCR.....   | 37        |
| 7. Análisis de marcaje intracelular y citometría de flujo.....  | 37        |
| 8. Ensayos de citotoxicidad de NKs.....   | 38        |
| 9. Serología de CMV .....   | 38        |
| 10. Ensayo de reactivación del provirus .....   | 38        |
| 11. Ensayo de ADN proviral intacto, IPDA .....  | 39        |
| 12. Ensayo Luminex.....   | 39        |
| 13. Análisis estadístico .....  | 39        |
| <b>RESULTADOS.....</b>  | <b>41</b> |
| Estudio 1. Las poblaciones citotóxicas desarrolladas durante el tratamiento con inhibidores de tirosina kinasas protegen a los linfocitos T CD4+ autólogos de la infección por VIH-1..... | 42        |
| 1.1 Poblaciones de estudio .....  | 42        |
| 1.2 Activación de los linfocitos T CD4+ de pacientes con LMC en suspensión de tratamiento sin recurrencia de LMC.....   | 42        |
| 1.3 Los PBLs de los pacientes con LMC en ausencia de tratamiento y remisión de su LMC son resistentes a la infección por VIH-1 .....  | 44        |
| 1.4 Aumento de la actividad NKs en pacientes con LMC en ausencia de tratamiento y remisión de su enfermedad hematológica .....  | 45        |
| 1.5 Incremento de la actividad antiviral de los linfocitos CD8± TCRγδ en los pacientes con LMC en ausencia de tratamiento y remisión de LMC.....  | 46        |
| 1.6 La respuesta citotóxica de las NKs en pacientes con LMC en ausencia de tratamiento y remisión de LMC interfieren con la infección por VIH de los CD4+ autólogos.....                  | 48        |
| Estudio 2. Disminución en el reservorio y reactivación del VIH en individuos infectados por VIH-1 en tratamiento con dasatinib y terapia antirretroviral .....                            | 50        |
| 2.1 Características de los individuos .....   | 50        |
| 2.2 Cuantificación de la integración proviral de VIH-1.....   | 55        |
| 2.3 Efecto del dasatinib en la reactivación del VIH-1 <i>in vitro</i> y <i>ex vivo</i> .....  | 55        |
| 2.4 Cuantificación de provirus intactos .....   | 56        |

|   |           |
|---|-----------|
| 2.5 Distribución de las subpoblaciones de linfocitos T CD4+ .....                       | 58        |
| 2.6 Efecto del dasatinib en los niveles de las citoquinas homeostáticas en plasma ..... | 59        |
| <b>DISCUSIÓN .....</b>  | <b>61</b> |
| <b>CONCLUSIONES.....</b>  | <b>68</b> |
| <b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>   | <b>70</b> |
| <b>PUBLICACIONES.....</b>   | <b>83</b> |

# RESUMEN

El reservorio latente de VIH-1, principalmente en los linfocitos T CD4+, es responsable de que la terapia antirretroviral (TAR) no consiga la eliminación completa del virus en los individuos infectados por VIH. Los inhibidores de tirosina kinasas (ITKs) se usan con éxito en clínica para tratar la leucemia mieloide crónica (LMC). Nuestro grupo describió previamente que los linfocitos T CD4+ de pacientes con LMC en tratamiento con ITKs como dasatinib eran resistentes a la infección por VIH-1 *ex vivo*. El principal mecanismo de esta actividad antiviral fue debido a la inhibición de la fosforilación del factor antiviral SAM domain HD domain-containing protein 1 (SAMHD1), lo cual preservaba la actividad contra el VIH-1 de este factor de restricción. Aproximadamente, al 50% del total de pacientes con LMC que alcanzan respuesta molecular profunda (RPM), se les puede retirar con seguridad el tratamiento de ITKs sin recaída molecular de su enfermedad. Así, se ha especulado que los ITKs podrían inducir una potente respuesta antileucémica que permanece en la mayoría de los pacientes, al menos un año después de la retirada del tratamiento.

En este estudio, nuestro primer objetivo fue analizar la susceptibilidad a la infección de linfocitos T CD4+ de pacientes con LMC en tratamiento con ITKs. Observamos que posteriormente a la activación *in vitro* SAMHD1 se fosforilaba en los linfocitos T CD4+ aislados de pacientes con LMC a quienes se les había retirado el tratamiento un año antes. A pesar de que los linfocitos T CD4+ de estos pacientes eran aparentemente susceptibles a la infección por VIH-1, el tratamiento previo con ITKs redujo la frecuencia de la integración proviral cuando estas células fueron infectadas *ex vivo*, en comparación con células aisladas de donantes sanos no tratados. Esta menor susceptibilidad a la infección se asocia a un aumento de la actividad citotóxica mediada por NKs. Este aumento de la actividad citotóxica también fue observado en linfocitos T CD8+ TCR $\gamma\delta$ .

Un objetivo adicional fue evaluar el impacto de dasatinib en el reservorio de VIH en individuos infectados con VIH-1 que padecían LMC y que estaban simultáneamente en tratamiento con TAR y dasatinib. Debido a la baja incidencia estimada de infección por VIH-1 y LMC, tres individuos fueron reclutados en España y Alemania. El tamaño y composición del reservorio en los linfocitos de sangre periférica de estos individuos fue analizado en comparación con individuos infectados por VIH-1 en tratamiento con TAR y viremia indetectable. En los pacientes tratados con TAR y dasatinib se redujo la frecuencia de células latentemente infectadas, la reactivación de provirus y la fosforilación de SAMHD1. Los niveles plasmáticos de la citoquina homeostática IL-7 y las subpoblaciones efectoras de linfocitos T CD4+ TEM y TEMRA en sangre periférica también estaban reducidas.

En conclusión, el tratamiento con ITKs induce una potente respuesta antileucémica que podría tener también efectos antivirales frente al VIH, sugiriendo que el uso de ITKs en individuos infectados con VIH podría generar una respuesta antiviral sostenida que interferiría con la replicación viral y la dinámica del reservorio del VIH-1. Finalmente, el tratamiento con dasatinib de individuos infectados con VIH-1 como adyuvante de TAR podría alterar la reactivación y el recambio homeostático del reservorio, lo cual podría tener un impacto positivo al reducir su tamaño y, posiblemente, favorecer su eliminación.

# ABSTRACT



The latent viral reservoir formed by HIV-1, mainly in CD4 + T cells, is responsible for the failure of antiretroviral therapy (ART) to achieve a complete elimination of the virus in infected individuals. Tyrosine kinase inhibitors (TKIs) are successfully used in clinic to treat chronic myeloid leukemia (CML). Our group previously described that CD4+ T cells from patients with CML on treatment with TKIs such as dasatinib were resistant to HIV-1 infection ex vivo. The main mechanism for this antiviral activity was primarily based on the inhibition of SAMHD1 phosphorylation, which preserves the activity against HIV-1 of this restriction factor. Approximately 50% CML patients who achieved a deep molecular response (DMR) may safely withdraw TKI treatment without molecular recurrence. Therefore, it has been speculated that TKIs may induce a potent antileukemic response that is maintained in most patients even one year after treatment interruption (TI).

Our first objective was to analyze the susceptibility to HIV-1 infection of CD4+ T lymphocytes from patients with LMC treated with TKIs. We observed that SAMHD1 was phosphorylated in CD4+ T cells from CML patients who withdrew TKI treatment more than one year earlier, which indicated that these cells were now susceptible to HIV-1 infection. Although activated CD4+ T cells from CML patients on TI were apparently permissive to HIV-1 infection ex vivo, the frequency of proviral integration was reduced when these cells were infected ex vivo in comparison with cells isolated from untreated, healthy donors. This reduced susceptibility to was associated with enhanced NK-dependent cytotoxic activity. Enhanced cytotoxic activity was also observed in CD8 + T TCR $\gamma\delta$  cells.

Additionally, we aimed to evaluate the impact of dasatinib on the viral reservoir of HIV-infected individuals with CML who were on simultaneous treatment with ART and dasatinib. Due to the low estimated incidence of HIV-1 infection and CML, three male individuals were recruited in Spain and Germany. Reservoir size and composition in peripheral blood lymphocytes from these individuals was analyzed in comparison with HIV-infected individuals on triple ART regimen and undetectable viremia. The frequency of latently infected cells, the reactivation of proviruses from these cells and SAMHD1 phosphorylation were reduced. Plasma levels of the homeostatic cytokine IL-7 and CD4 effector subpopulations TEM and TEMRA in peripheral blood were also reduced.

In conclusion, treatment with TKIs induced a potent antileukemic response that may also have antiviral effects against HIV-1, suggesting that transient use of TKIs in HIV-infected patients could develop a sustained antiviral response that would potentially interfere with viral replication and HIV-1 reservoir dynamics. Moreover, treatment of HIV-infected

individuals with dasatinib as adjuvant of ART could disturb the reservoir reactivation and reseeding, which might have a beneficial impact to reduce its size.

# INTRODUCCIÓN

## 1. Virus de la Inmunodeficiencia Humana

### 1.1 Historia y origen

Entre 1980 y 1981, se describieron cinco hombres que habían desarrollado una neumonía atípica, causada por *Pneumocystis jirovecii* (anteriormente *Pneumocystis carinii*), candidiasis y reactivación de la infección por citomegalovirus (CMV). Además, todos ellos presentaban linfopenia (1, 2). Se describió así por primera vez el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (sida) humana, un estado de inmunodepresión que predispone a infecciones oportunistas y al desarrollo de determinados tumores. En 1983, un grupo del Instituto Pasteur de París describió por primera vez el virus asociado a este estado de inmunosupresión (3). Un año más tarde, en 1984, un grupo americano del NIH también identificó al virus causante del sida (4). Más tarde, el Comité de Taxonomía de Virus lo denominó Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) (5).

### 1.2 Epidemiología general

Se estima que, desde el inicio de la pandemia, más de 79 millones de personas han sido infectadas por el VIH. Actualmente más de 37 millones de personas viven infectadas (Figura 1), de las cuales, alrededor de 1,5 millones, lo contrajeron en 2020, año en el que 680.000 personas fallecieron como consecuencia de enfermedades relacionadas con el sida (6). Se estima que, según los últimos datos publicados, en España se diagnosticaron 1.925 nuevas infecciones en 2020 (7) y que, actualmente, más de 92.000 personas viven con VIH en nuestro país (8).

La principal población de riesgo en España son hombres que tienen sexo con hombres (HSH), lo cual supone un 48,5% de las nuevas infecciones (7). Además, usuarios de drogas intravenosas, personas en prisión, trabajadoras sexuales y personas transgénero también son considerados población de riesgo (6). Estos colectivos, junto a HSH suponen un 65% de las nuevas infecciones mundiales (6). Sin embargo, en países de África sub-Sahariana, el 63% de los casos se dan en mujeres que se infectan por contacto heterosexual (6).

Figura 1



Figura 1. Distribución global de la prevalencia de infecciones por VIH en 2021. Obtenido de UNAIDS (8).

## 2. Aspectos virológicos de la infección por VIH

### 2.1 Clasificación del VIH

El VIH es un retrovirus englobado dentro de la familia *Retroviridae*, subfamilia *Orthoretrovirinae*, género *Lentivirus* (9). Se han descrito dos tipos de VIH, VIH tipo 1 (VIH-1) y VIH tipo 2 (VIH-2), en base a su diferente composición del genoma, capacidad replicativa, patogenicidad y evolución (10), siendo el más prevalente a nivel global el VIH-1. Por el contrario, VIH-2 se localiza principalmente en el oeste del continente africano. El VIH-1 se subdivide en cuatro grupos: M, o *major*; O, u *outlier*; N, o *non-M, non-O*; y P, o *putative*. El grupo M es el más frecuente. Dentro del grupo M, han sido identificados hasta 10 subtipos y numerosas formas recombinantes, siendo el subtipo B el más predominante en Europa y Estados Unidos (11-13) (Figura 2).

Figura 2

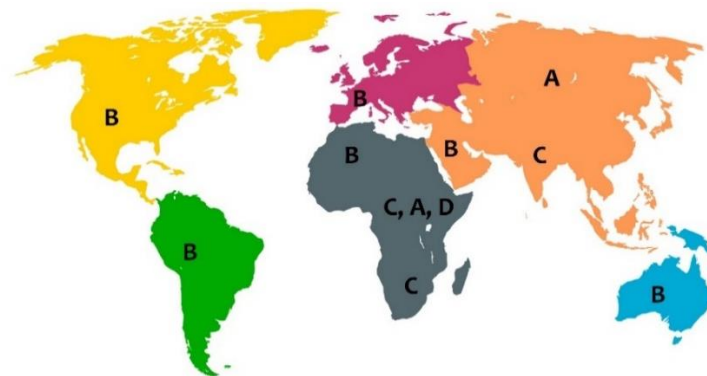
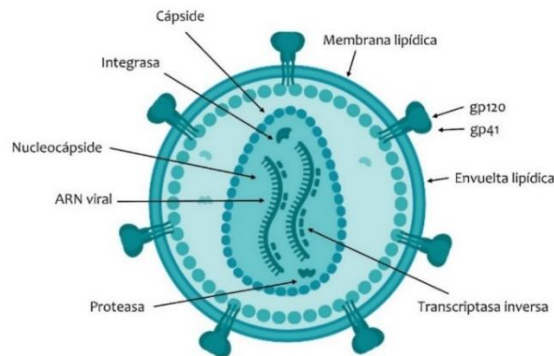


Figura 2. Distribución global de los principales subtipos y formas recombinantes del grupo M de VIH-1. Adaptado de Bbosa N et al. (14).

## 2.2 Estructura y genoma del VIH-1

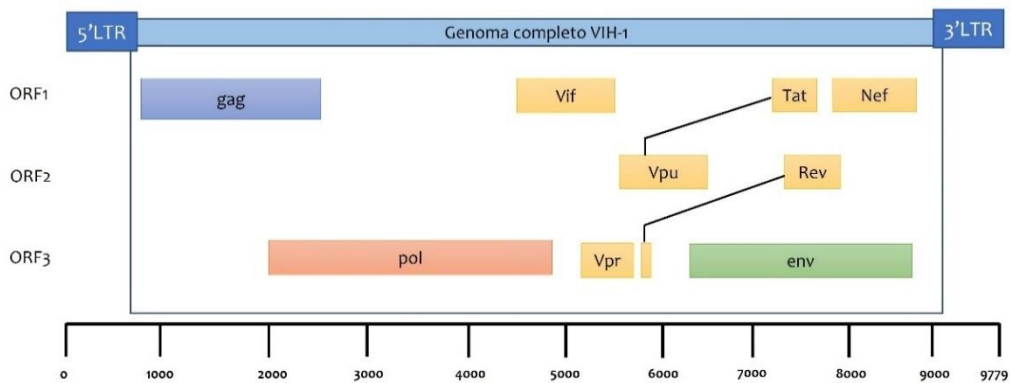
El virión de VIH-1 es una partícula esférica de unos 80nm de diámetro rodeada de una envuelta lipídica que incluye proteínas del huésped y en la que están embebidos trímeros de las proteínas virales gp120 y gp41 (Figura 3). Su genoma se compone de dos moléculas simples idénticas de ARN de unas 9.8kb flanqueadas por dos regiones denominadas LTR (15) y codifica para nueve genes: gag, pol, env, tat, rev, vif, vpr, vpu y nef (Figura 4 y Tabla 1). La poliproteína Gag es escindida en las proteínas estructurales de la matriz, la cápside, la nucleocápside y p6. Las glicoproteínas gp120 y gp41 derivan de la proteólisis de Env; y la proteasa, la transcriptasa inversa o retrotranscriptasa y la integrasa, de la proteólisis de Pol (16).

Figura 3



**Figura 3. Esquema de un virión de VIH-1.** El virión de VIH-1 es una partícula esférica de unos 80nm de diámetro rodeada de una envuelta lipídica que incluye proteínas del huésped y en la que están embebidos trímeros de las proteínas virales gp120 y gp41. La envuelta lipídica rodea la cápside que alberga el genoma viral (17).

Figura 4



**Figura 4. Esquema del genoma de VIH-1.** ORF: *Open Reading Frame*. Adaptado de Li G et al (18).

**Tabla 1. Proteínas de VIH-1 y su función (16).**

|                                | <b>Nombre</b>                     | <b>Función</b>   |
|--------------------------------|-----------------------------------|--|
| <b>Proteínas estructurales</b> | <b>Cápside (CA)</b>               | Forma la cápside de la partícula viral   |
|                                | <b>Mátriz (MA)</b>                | Recubrimiento interno de la envuelta del virus   |
|                                | <b>Nucleocápside (NC)</b>         | Forma la nucleocápside   |
|                                | <b>gp120</b>                      | Reconocimiento del receptor en la célula diana   |
|                                | <b>gp41</b>                       | Fusión de las membranas viral y célula diana   |
| <b>Proteínas enzimáticas</b>   | <b>Transcriptasa inversa (RT)</b> | Transcripción del ARN viral en ADN viral   |
|                                | <b>Integrasa</b>                  | Integración del ADN viral en el ADN de la célula infectada   |
|                                | <b>Proteasa</b>                   | Escisión de las proteínas precursoras en proteínas maduras   |
| <b>Proteínas reguladoras</b>   | <b>Tat</b>                        | Regulación de la expresión génica viral mediante la unión de factores de transcripción celulares (19, 20)  |
|                                | <b>Rev</b>                        | Transporte de los ARN virales desde el núcleo al citoplasma  |
| <b>Proteínas accesorias</b>    | <b>Vif</b>                        | Mantenimiento de la infectividad del virus   |
|                                | <b>Vpr</b>                        | Transporte de la cápside desde el citoplasma al interior del núcleo  |
|                                | <b>Vpu</b>                        | Aumenta la liberación de viriones desde la célula infectada  |
|                                | <b>Nef</b>                        | Contribuye en la disminución de la expresión de la molécula CD4 y del complejo de histocompatibilidad de clase I (MHC-I); aumenta la infectividad del virión |

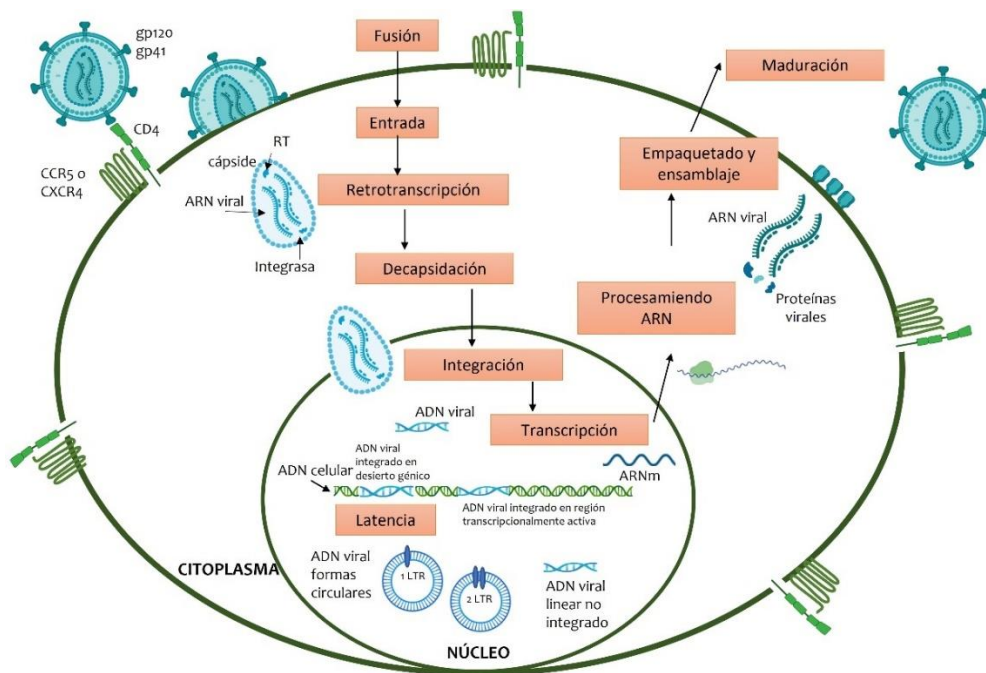
## 2.3 Ciclo replicación

El ciclo de replicación del VIH-1 consta de varias fases (Figura 5) (8):

### 2.3.1. Entrada

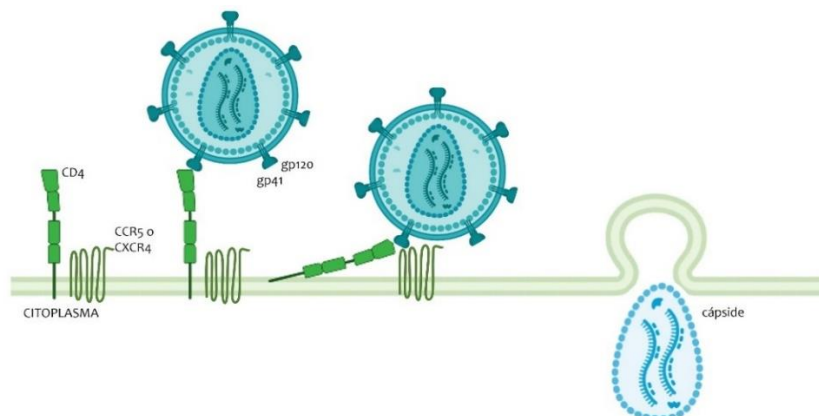
La glicoproteína gp120, expresada en la superficie de los viriones de VIH-1, se une específicamente al receptor CD4, expresado en las células diana. Los linfocitos T CD4+ son su principal diana, aunque otras células, como monocitos, macrófagos y células dendríticas, también pueden expresar este receptor, y son susceptibles a la infección (21, 22). Esta unión provoca un cambio conformacional que permite la interacción con los receptores de quimioquinas CCR5 o CXCR4, que actúan como correceptores (23) y determinan el tropismo del virus. Según esto, el VIH puede presentar tropismo R5, X4 o dual. La unión de gp120 y gp41 con el receptor y correceptor, genera un cambio conformacional en gp41 que provoca la fusión de la membrana del virus con la membrana de la célula diana. Tras la fusión, la cápside viral se internaliza (Figura 6).

Figura 5



**Figura 5. Esquema del ciclo de VIH.** La entrada a la célula es mediada por la unión de gp120 y gp41 al receptor (CD4) y correceptor (CCR5 o CXCR4). Tras esto, la membrana del virus y de la célula hospedadora se fusionan quedando la cápside libre en el citoplasma. La cápside viaja hasta el interior del núcleo y durante este período el ARN viral es retrotranscrito a ADN por acción de la RT. Este ADN viral se integra en el genoma celular por acción de la integrasa. La ARN polimerasa dependiente de ADN de la célula hospedadora es la encargada de generar nuevas copias de ARN viral, que serán traducidas en nuevas proteínas virales. Las proteínas y ARN viral se encapsulan en una nueva cápside y se empaqueta de nuevo para formar nuevos viriones. Adaptado de Alcamí J. *et al* y Zila V. *et al* (24, 25).

Figura 6



**Figura 6. Esquema de la interacción entre CD4 y el correceptor CCR5 o CXCR4 con el trímero formado por gp120 y gp41.** La glicoproteína gp120, expresada en la superficie de los viriones de VIH, se une específicamente al receptor CD4. Esta unión provoca un cambio conformacional que permite la interacción con los receptores de quimioquinas CCR5 o CXCR4. Adaptado de (26).



### 2.3.2. Transcripción inversa

La cápside contiene las dos copias de ARN del genoma viral, y las proteínas transcriptasa inversa, integrasa y proteasa (27). La cápside viaja por el citoplasma hacia el núcleo acoplándose al citoesqueleto y la maquinaria de transporte de la célula infectada, atraviesa el poro nuclear y se desintegra ya en el interior del núcleo. Durante este trayecto, el ARN del virus es retrotranscrito a ADN viral por la transcriptasa inversa finalizando este proceso en el núcleo (28, 29). Una vez completa la transcripción inversa, el core viral se desintegra, liberándose el complejo de pre-integración, formado por ADN viral de doble hebra y proteínas celulares, que se integrará en las secciones génicas próximas a la disgregación de la cápside. Por lo tanto, la cápside desempeña las funciones de traslado y protección del genoma viral durante su traslado al núcleo, alberga la transcripción inversa y determina el sitio de integración del ADN viral (25).

### 2.3.3. Integración

En el núcleo, la integrasa permite la inserción del ADN viral en el genoma de la célula. Una vez integrado, el genoma del virus se denomina provirus. Mayoritariamente, el VIH se integra en zonas transcripcionalmente activas (30), aunque se han identificado genomas intactos en zonas menos activas, conocidas como desiertos génicos. Se ha descrito una alta proporción de genomas integrados en regiones silentes, lo que se ha denominado “latencia profunda” en personas infectadas con VIH capaces de controlar la infección (31), pero también en pacientes tras más de 15 años con tratamiento antirretroviral (TAR). Por tanto, el lugar de integración es un elemento central en la inmunopatogenia y la dinámica de replicación del VIH, ya que la integración en regiones no génicas limita la transcripción y con ello, la reactivación del provirus. El genoma viral integrado, puede en este punto, continuar el ciclo de replicación formando nuevos viriones, o por el contrario quedarse en un estado de latencia sin replicación, formando parte del reservorio viral. Por otro lado, el ADN viral no integrado puede disponerse de manera lineal o circular. Las formas circulares pueden contener 1-LTR o 2-LTR, este último formado por la ligación de dos precursores lineares. Las formas circulares 1-LTR y 2-LTR constituyen las formas episomales del ADN de VIH-1 (32).

### 2.3.4. Transcripción y traducción

Cuando la célula infectada se activa, el ADN proviral, junto a determinados genes de la célula infectada, se transcribe a ARN mensajero (ARNm) por acción de la ARN polimerasa dependiente de ADN II de la célula infectada. En un primer paso el ARN que codifica para las proteínas reguladoras Tat y Rev sale del núcleo para ser traducido en las proteínas del mismo nombre. Tat y Rev regresan al núcleo para favorecer la transcripción y procesamiento de los

ARNm que codifican para Gag, Gag-Pol, Env, Vif, Vpr y Vpu. Estos transcritos son transportados al citoplasma donde son traducidos en proteínas virales (33).

### 2.3.5. Ensamblaje, empaquetado y maduración

El ensamblaje de los nuevos viriones de VIH-1 sucede en regiones concretas de la membrana citoplasmática celular denominadas microdominios. En este ensamblaje, Gag desempeña un papel esencial (34). Tras el empaquetado del virión inmaduro, la proteasa viral escinde las grandes proteínas Gag, Pol y Env en proteínas maduras y funcionales (35). En este punto, el virión maduro es capaz de infectar nuevas células diana.

## 3. Patogénesis

### 3.1 Transmisión

La principal ruta de transmisión es la vía sexual a través del semen y flujo vaginal (7, 36). Además, el VIH se transmite a través de otros fluidos como sangre o leche materna. También se da una transmisión vertical de la madre al feto durante el embarazo o el momento del parto en aquellas mujeres embarazadas con carga viral detectable. El riesgo de transmisión depende de diversos factores como la ruta de infección, la carga viral (37), la presencia de otras infecciones de transmisión sexual (38, 39) y la existencia de un tratamiento antirretroviral eficaz.

### 3.2 Curso natural de la infección

La infección por VIH se establece a partir de un único provirus fundador (40) o pocas partículas virales (41) y se caracteriza por una pérdida progresiva de los niveles de linfocitos T CD4+. Al mismo tiempo, aumenta la carga viral y comienza una activación crónica del sistema inmune que deriva en un estado de agotamiento inmunitario (42). El curso natural de la infección por VIH-1 se compone de tres fases: fase aguda, fase crónica y sida (Figura 7).

#### 3.2.1 Fase aguda

Se inicia con la infección y termina con la detección de anticuerpos específicos frente a VIH-1 en plasma. Las tres primeras semanas de la fase aguda se conoce como fase eclipse debido a la ausencia de síntomas y una carga viral indetectable (40).

Durante las 3 a 9 semanas posteriores a la infección, el virus comienza a ser detectable en sangre, a través de la medida de los niveles de ARN viral, y alcanza su pico máximo. Esto deriva en una caída en los niveles de linfocitos T CD4+. Tras el pico de viremia, se detectan los primeros anticuerpos (43) y la respuesta citotóxica mediada por linfocitos T CD8+. Como

consecuencia se reducen los niveles de carga viral en plasma y, por consiguiente, hay un aumento en los niveles de linfocitos T CD4+.

La fase aguda puede cursar con síntomas similares a la gripe, y la gravedad de estos se ha relacionado con los niveles máximos de carga viral (44).

### 3.2.2 Fase crónica

Puede durar de meses a años (45) y se caracteriza por una pérdida progresiva en los niveles de linfocitos T CD4+ que predispone a enfermedades oportunistas y desarrollo de determinados tumores. Algunas de las enfermedades oportunistas son tuberculosis, meningitis, infecciones bacterianas graves o algunos tipos de cáncer, como el sarcoma de Kaposi (46).

### 3.2.3 Sida

Fase última de la infección por el VIH. El Centro Europeo de Prevención de Enfermedades y Control (ECDC) define el sida como un estado de inmunosupresión caracterizado por la presencia de una o más enfermedades oportunistas anteriormente citadas (47) (Tabla 2).

Figura 7

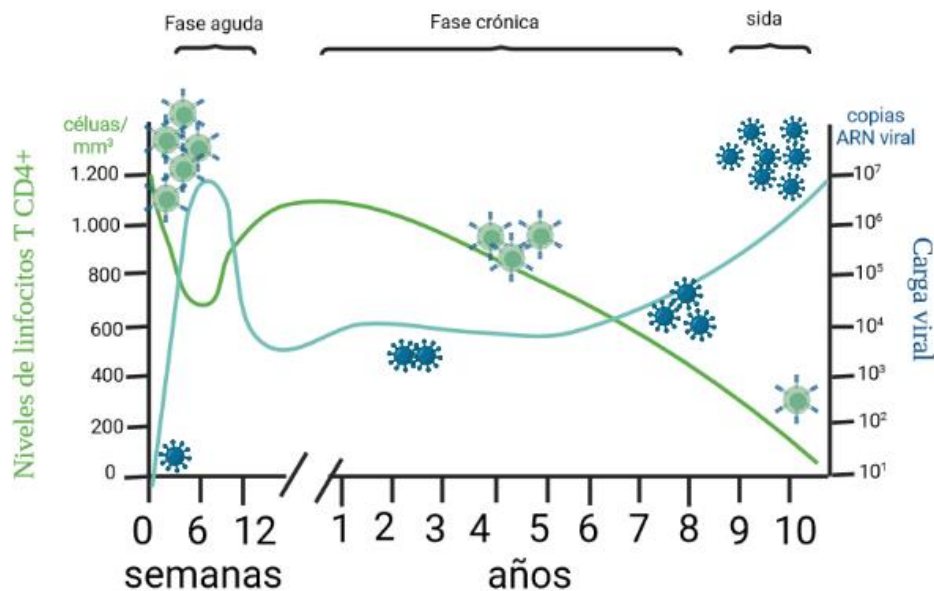


Figura 7. Esquema de la evolución típica de la infección por VIH-1 en ausencia de tratamiento antirretroviral. En el eje de la izquierda se representan el número de linfocitos T CD4+ por mililitro. En el eje de la derecha se representan los valores de ARN viral para determinar la carga viral. La línea verde representa las fluctuaciones de los niveles de linfocitos T CD4+. La línea azul representa la carga viral a lo largo de la infección. Adaptado de Alcamí J et al (21).

**Tabla 2. Enfermedades oportunistas asociadas al estado de inmunodepresión causado por el VIH (48).**

|                                   |  |
|-----------------------------------|--|
| Candidiasis                       | Infección causada por hongos del género <i>Candida</i> , principalmente <i>Candida albicans</i> , que suele afectar a la piel, uñas y mucosas. En las personas que viven con VIH suele afectar a bronquios, traquea, pulmones o esófago. |
| Pneumonía por <i>Pneumocystis</i> | Infección pulmonar causada por el hongo <i>Pneumocystis jirovecii</i> característica de personas inmunodeprimidas.   |
| Tuberculosis                      | Infección de transmisión aérea causada por bacterias del género <i>Mycobacterium</i> . Puede darse como infección latente o infección activa. En las personas con VIH se considera como definición de sida.                              |
| Infección por CMV                 | En las personas inmunodeprimidas afecta a ojos, pulmones y sistema digestivo.  |
| Toxoplasmosis                     | Infección transmitida por agua y alimentos contaminados causada por <i>Toxoplasma gondii</i> . Aunque suele cursar de manera asintomática, en las personas con VIH puede afectar al sistema nervioso.                                    |
| Criptosporidiosis                 | Infección causada por parásitos del género <i>Cryptosporidium</i> que cursa con calambres abdominales y diarrea severa.  |
| Sarcoma de Kaposi                 | Tipo de tumor que afecta a la piel y mucosas causado por el virus herpes humano 8 y es característico de personas inmunodeprimidas   |
| Linfoma                           | Tipo de tumor que afecta a ganglios linfáticos y otro tejido linfoide. El linfoma de Hodgkin y no-Hodgkin se asocian con el VIH.   |

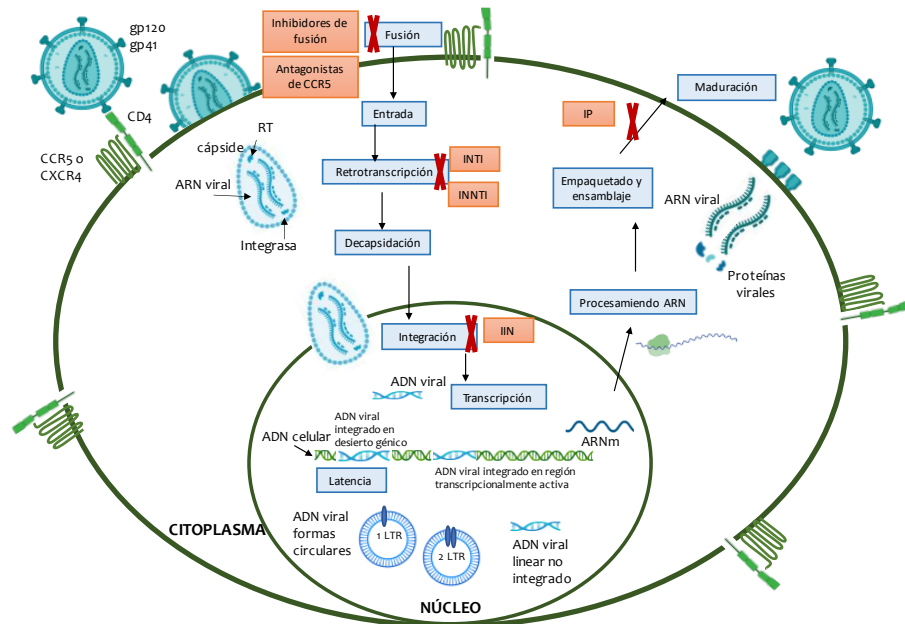
#### 4. Terapia antirretroviral

Los grandes avances conseguidos con TAR han permitido modificar el curso natural de la infección por VIH-1, convirtiéndola en una infección crónica. Desde que la Zidovudina (AZT) se aprobó en 1987 como el primer fármaco para tratar la infección por el VIH (49), han sido enormes los avances en el tratamiento frente a la infección por VIH. Actualmente, más de 70 posibilidades entre combinaciones de fármacos y vías de administración diferentes han sido aprobados por la *U.S Food & Drug Administration* (FDA) para el tratamiento de la infección por VIH en adultos (50) (Tabla 3).

Según la diana en el VIH o etapa del ciclo de replicación viral frente a la que vaya dirigido el fármaco, podemos diferenciar entre inhibidores de tipo nucleósido de la transcriptasa (INTI), inhibidores de tipo no nucleósido de la transcriptasa (INNTI), inhibidores de la proteasa (IP), inhibidores de la integrasa (IIN), inhibidores de fusión y antagonistas del receptor CCR5. Los INTI e INNTI, como su propio nombre indica, actúan bloqueando la transcriptasa inversa. Mientras que los INTI actúan incorporándose al ADN proviral, induciendo la terminación de la síntesis, los INNTI se unen a una región cercana al sitio activo de la enzima, produciendo un cambio conformacional y con ello la inhibición de la transcripción inversa. Los IP actúan sobre el último paso del ciclo de replicación viral, evitando la maduración viral, al inhibir la escisión de las largas cadenas polipeptídicas en proteínas funcionalmente maduras. Los IIN actúan impidiendo la integración del ADN viral en el genoma de la célula hospedadora. La

entrada viral es bloqueada por los inhibidores de fusión que evitan la fusión de las membranas viral y celular. Los antagonistas de CCR5 bloquean la unión de gp120 al receptor CCR5 (51) (Figura 8).

**Figura 8**



**Figura 8. Esquema de las principales dianas de la terapia antirretroviral.** Los inhibidores de fusión y antagonistas de CCR5 impiden la fusión y entrada del virión; los INTI e INNTI inhiben la retrotranscripción, los IIN inhiben la integración y los IP inhiben el procesamiento de las proteínas. INTI: inhibidores de tipo nucleósido de la transcriptasa; INNTI: inhibidores de tipo no nucleósido de la transcriptasa; IP: inhibidores de la proteasa; IIN inhibidores de la integrasa.

La TAR se suministra en diferentes pautas, siendo la pauta más frecuente la combinación de dos INTI con un INNTI, o dos INTI y un IP, o dos INTI y un IIN (52). En los últimos años se ha incorporado la terapia antirretroviral de larga duración suministrada cada 8 semanas que está permitiendo dejar atrás la toma diaria de medicación (53). Entre estos medicamentos de larga duración, se encuentran en distintas fases de ensayos clínicos fármacos de tipo INTI, INNTI, IP, IIN, inhibidores de la entrada e inhibidores de la cápside (54).

A pesar de haber cambiado el curso natural de la infección por VIH, la TAR no inhibe por completo la replicación viral, por lo que el virus puede generar mutaciones (55). Sin embargo, dada la alta eficacia de la TAR actual y el freno de los ciclos de replicación del virus, la aparición de resistencias es muy poco habitual (56).

Tabla 3. Fármacos frente a VIH aprobados por la *European Medicines Agency* (EMA) y la FDA (49).

| Clase de medicamento   | Nombre genérico<br>(Otros nombres y siglas) | Abreviatura | Fecha de autorización por parte de la FDA |
|--|---|-------------|---|
| Inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de los nucleósidos    | abacavir                                    | ABC         | 17/12/1998                                |
|  | emtricitabina                               | FTC         | 02/07/2003                                |
|  | lamivudina                                  | 3TC         | 17/11/1995                                |
|  | fumarato de disoproxilo de tenofovir        | TDF         | 26/10/2001                                |
|  | zidovudina                                  | AZT         | 19/03/1987                                |
| Inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de los nucleósidos | doravirina                                  | DOR         | 30/08/2018                                |
|  | efavirenz                                   | EFV         | 17/09/1998                                |
|  | etravirina                                  | ETR         | 18/01/2008                                |
|  | nevirapina                                  | NVP         | 21/06/1996                                |
|  | rilpivirina                                 | RPV         | 20/05/2011                                |
| Inhibidores de la proteasa   | atazanavir                                  | ATV         | 20/06/2003                                |
|  | darunavir                                   | DRV         | 23/06/2006                                |
|  | fosamprenavir                               | FPV         | 20/10/2003                                |
|  | ritonavir                                   | RTV         | 01/03/1996                                |
|  | saquinavir                                  | SQV         | 06/12/1995                                |
|  | tipranavir                                  | TPV         | 22/06/2005                                |
| Inhibidor de la integrasa  | cabotegravir                                | CAB         | 22/01/2021                                |
|  | dolutegravir                                | DTG         | 13/08/2013                                |
|  | raltegravir                                 | RAL         | 12/10/2007                                |
| Inhibidores de la fusión   | enfuvirtida                                 | T-20        | 26/05/2017                                |
| Antagonistas de CCR5   | maraviroc                                   | MVC         | 06/08/2007                                |
| Potenciadores farmacocinéticos   | cobicistat                                  | c           | 24/09/2014                                |

#### 4.1 TAR como prevención

El concepto de TAR como profilaxis preexposición (PrEP) reside en el uso de los distintos fármacos antirretrovirales para reducir las nuevas infecciones por VIH en aquellos sujetos no infectados por el VIH-1 pero en alto riesgo por las prácticas que realizan (57). Su eficacia prácticamente total ha sido demostrada en individuos con buena adherencia a los fármacos (58, 59).

### 5. Reservorio

Con TAR se ha conseguido que la carga viral de VIH-1 en plasma sea indetectable. Sin embargo, al retirar el tratamiento, se produce un repunte de la viremia y vuelve a detectarse ARN viral en plasma. Esto es debido a la existencia del reservorio viral (60) que está formado por células de larga vida media que están latentemente infectadas por virus con capacidad replicativa, por lo que al retirar el TAR, el VIH es capaz de multiplicarse e infectar nuevas células (61).

La cura del VIH es todo un reto debido a la existencia del reservorio viral, el cual es dinámico y se establece durante los primeros días de la infección, incluso antes de ser la viremia

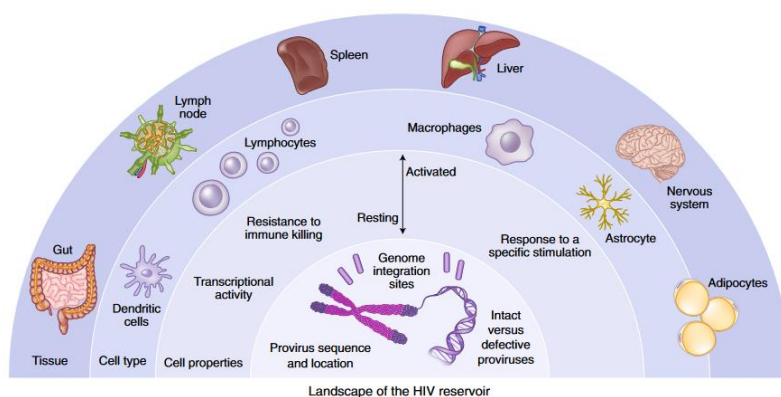
detectable en sangre (62). Diferentes factores, como la carga viral, la viremia residual (63), la relación CD4/CD8 (64), la presencia de determinados haplotipos de HLA, como HLA-B27 (65) o HLA-B57 (66), el nadir de linfocitos T CD4+ (67), el subtipo viral (68) o la coinfección con el virus de la hepatitis C (VHC) (69) influyen en el tamaño del reservorio. Se estima que el tamaño del reservorio es muy bajo, unos 10-100 provirus por millón de linfocitos T CD4+ en reposo (70) de los cuales menos del 5% sería provirus intacto, y por tanto potencialmente competentes para replicar (71). Sin embargo, un estudio muy reciente realizado *post mortem* en dos pacientes infectados por VIH-1, de los cuales se obtuvo biopsia de diferentes órganos que albergan reservorio, ha demostrado la existencia de reservorio en todos los órganos estudiados. Además, el porcentaje de provirus intacto detectado osciló entre el 2% en el individuo 1, hasta el 26% en el individuo 2 (72).

### 5.1 Reservorio anatómico y celular

Determinadas regiones anatómicas son inaccesibles a TAR y se convierten en santuarios anatómicos (Figura 9). El tejido linfocitario asociado al intestino (GALT), los ganglios linfáticos, el bazo, el cerebro, los pulmones o el sistema genitourinario constituyen la gran parte del reservorio anatómico de VIH (73, 74).

Por otro lado, el VIH es capaz de infectar, retrotranscribir su genoma e integrarse en el genoma de diferentes células inmunes. Los linfocitos T CD4+ de memoria se consideran el principal reservorio celular del VIH (60, 75). Sin embargo, los linfocitos T en diferente estado de activación (76), los monocitos y macrófagos (21, 77), las células dendríticas (22) y las células nerviosas (77, 78) también son susceptibles de albergar provirus latente integrado.

**Figura 9**

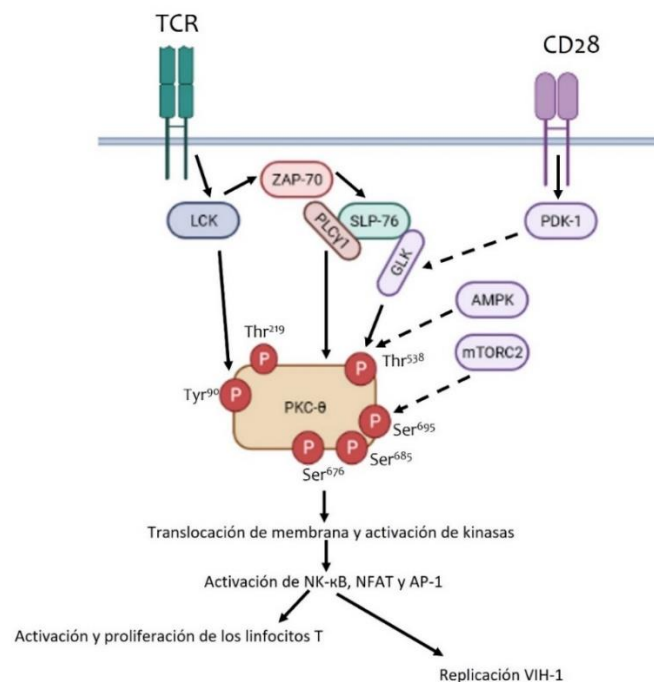


**Figura 9. Santuarios anatómicos y celulares que pueden albergar reservorio latente de VIH.** El reservorio de VIH incluye santuarios anatómicos, tipos celulares, distintos perfiles funcionales. Obtenido de (79)

## 5.2 Mantenimiento homeostático del reservorio

La proliferación homeostática y expansión clonal de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> inducida por las  $\gamma$ -citoquinas interleukina (IL)-2, IL-7 e IL-15 contribuye al mantenimiento del reservorio (80, 81). Individuos tratados con IL-7 para contrarrestar la linfopenia derivada de la infección mostraron un aumento de los linfocitos T de memoria central circulantes, así como un mayor reservorio viral (82, 83). Por otro lado, la activación de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> vía TCR también contribuye al mantenimiento y reemplazo del reservorio (81). Tras la activación del TCR y la señal coestimuladora CD28, la kinasa LCK se activa y fosforila PKC- $\theta$  en la posición Y90, induciendo su translocación y, en un paso final, la activación del factor nuclear NF- $\kappa$ B, NFAT y AP-1 (84, 85). Como consecuencia, los linfocitos T se activan, proliferan, y con ello el VIH replica (Figura 10). Adicionalmente, como se ha comentado anteriormente, existe una baja replicación persistente en presencia de TAR que deriva en episodios intermitentes de baja viremia (86). Los modelos matemáticos estiman que son necesarios 70 años de TAR para curar la infección de VIH (87). Por tanto, es necesario el desarrollo de nuevos abordajes que permitan la cura y erradicación de la infección por VIH del organismo.

Figura 10



**Figura 10. Activación de los linfocitos T vía TCR.** Tras la activación del TCR y la señal coestimuladora CD28, la kinasa LCK se activa y fosforila PKC- $\theta$  en la posición Y90, induciendo su translocación y, en un paso final, la activación del factor nuclear NF- $\kappa$ B, NFAT y AP-1 Adaptada de Wang *et al.* (85).



## 6. Búsqueda de una cura

Encontrar una cura para la infección por VIH continúa siendo un gran desafío debido a la persistencia viral en los reservorios, inaccesibles a TAR y al sistema inmune, a menos que se activen. Sin embargo, la ausencia de biomarcadores que permitan identificar las células latentemente infectadas dificulta la búsqueda de la cura y remisión de la infección por VIH.

Se debe diferenciar entre erradicación del virus del organismo y cura funcional. El primer concepto hace referencia a la eliminación completa del virus del organismo. El segundo de ellos, la cura funcional, es la situación en la que, aunque el virus no es eliminado por completo del organismo, el sistema inmunitario es capaz de controlarlo sin necesidad de fármacos.

### 6.1 Casos de curación

En la literatura encontramos la descripción de al menos cuatro casos de curación de VIH debido a un trasplante de células madre. El primer caso, el conocido como paciente de Berlín, se trata de un hombre diagnosticado de leucemia mieloide aguda (LMA), infectado de VIH años antes. Este paciente, en tratamiento antirretroviral y carga viral indetectable, recibió un trasplante alogénico de células madre CD34+ procedentes de un donante homocigoto para la mutación CCR5 $\Delta$ 32, una mutación poco frecuente que consiste en una delección de 32 pares de bases (pb) que confiere resistencia a la infección por VIH-1 para aquellos virus con tropismo R5 (88). Tras un primer trasplante, y recaída de su enfermedad hematológica, fue sometido a un segundo trasplante procedente del mismo donante, lo cual permitió la remisión completa de su LMA. Tras suprimir TAR no se detectó el virus durante casi una década hasta el fallecimiento del paciente por otra causa. Los mecanismos implicados en la curación probablemente fueron múltiples. El más importante, el trasplante de células resistentes a la infección, pero probablemente el tratamiento con quimioterapia y radioterapia y el desarrollo de enfermedad de injerto contra huésped también contribuyeron a la curación. Este caso abrió una nueva posibilidad sobre la cura de VIH aunque no es escalable a todas las personas infectadas con VIH (89).

Años más tarde, un nuevo caso de curación fue descrito (90). En este caso, el conocido como “paciente de Londres”, que había sido previamente diagnosticado de VIH y posteriormente de Linfoma de Hodgkin (LH), recibió un trasplante alogénico de un donante homocigoto para la mutación CCR5 $\Delta$ 32 como tratamiento de su enfermedad hematológica. El paciente, con genotipo CCR5wt/CCR5wt, pasó a tener genotipo CCR5 $\Delta$ 32/CCR5 $\Delta$ 32 tras el trasplante. Después de la retirada de TAR, la carga viral ha permanecido indetectable durante al menos

30 meses (91). Este paciente pertenece a la cohorte IciStem (91), una cohorte de pacientes con enfermedad hematológica e infección por VIH, que fueron trasplantados (92).

Un tercer caso de curación fue descrito por primera vez en 2016. El conocido como “paciente de Düsseldorf”, paciente heterocigoto para la mutación CCR5 $\Delta$ 32 y englobado también dentro de la cohorte IciStem (90,91), recibió un trasplante de células madre procedentes de un donante homocigoto para la misma mutación en febrero de 2013 para tratar su LMA. En noviembre de 2018 se interrumpió TAR, y aunque se encontraron restos de ADN viral en ganglios linfáticos y tracto gastrointestinal estos mostraron ser funcionales. No hubo repunte viral al menos durante 14 meses (93, 94).

Un cuarto caso de curación ha sido descrito muy recientemente en una mujer infectada de VIH que recibió en 2017 un trasplante de células madre procedente de cordón umbilical de un donante homocigoto para CCR5 $\Delta$ 32 para curar su LMA. La paciente, 37 meses después de recibir el trasplante, cesó TAR hace algo más de un año, y no ha sufrido repuntes de la viremia de VIH desde entonces (95). Está incluida dentro del estudio IMPAACT P1107.

Otros casos de trasplante alogénico no han tenido tanto éxito. Los conocidos como “pacientes de Boston”, ambos diagnosticados de LH, fueron trasplantados con sus propias células y posteriormente con células de un donante compatible en cada uno de los dos casos. Ambos sujetos eran heterocigotos para la mutación CCR5 $\Delta$ 32. Sin embargo, la perdieron tras el trasplante alogénico, pues los donantes eran CCR5 *wild type* (96). La heterocigosis de CCR5/CCR5 $\Delta$ 32 se ha asociado con menores niveles de ARN viral en plasma y una progresión más lenta de la enfermedad (97, 98). Otro sujeto infectado de VIH fue diagnosticado de linfoma difuso de células B y tratado de manera similar al “paciente de Berlín” con trasplante autólogo y posteriormente alogénico de células madre. Finalmente falleció como consecuencia de una complicación de su enfermedad (99). Aunque el trasplante no es escalable a todas las personas infectadas por VIH (100), abre la puerta a la edición génica de las células autólogas (101).

Por otro lado, se estima que menos del 1% de las personas infectadas con VIH son capaces de controlar la replicación viral por debajo de los límites de detección en ausencia de TAR (102). El tratamiento y otros factores genéticos pueden contribuir a alcanzar la cura funcional. La conocida como cohorte VISCONTI, describe 14 adolescentes capaces de controlar la viremia en ausencia de TAR durante una media de 7 años antes del repunte viral, reflejando otro ejemplo de cura funcional durante un período largo de tiempo. Todos estos pacientes empezaron TAR durante las primeras etapas de la infección de VIH-1, lo cual posiblemente les

permitió ser controladores en ausencia de TAR (103). Más recientemente, tres controladores de élite excepcionales (EEC), individuos capaces de controlar la replicación viral durante más de 25 años en ausencia de TAR, mostraron niveles bajos de ADN proviral, alto porcentaje de provirus defectivo integrados y una potente respuesta celular frente a VIH-1. Estos individuos además tenían alelos de HLA protectores y virus con baja variabilidad genética, lo cual podría ser la causa de la cura funcional observada en estos tres individuos (104). La cohorte LoViReT, formada por individuos infectados con VIH-1 y ADN viral  $<50$  copias/ $10^6$  PBLs, muestra nuevos casos de pacientes tratados en fase crónica de la infección con un reservorio reducido y mejor respuesta citotóxica antes de TAR (105). La conocida como “paciente Esperanza” es otro caso de cura en ausencia de trasplante. Se trata de una mujer argentina diagnosticada de VIH en 2013 y que ha mantenido carga viral indetectable desde entonces después de estar tratada durante 6 meses con TAR. En ella no se han encontrado virus replicativamente competentes (106).

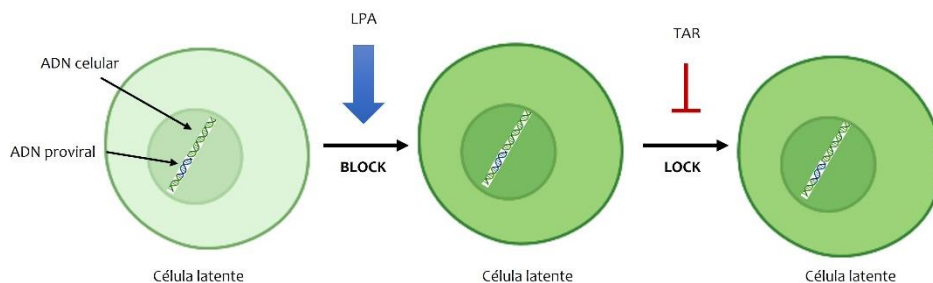
Todos estos casos abren la posibilidad de cura funcional, y en el mejor de los casos, la eliminación del VIH del organismo.

## 6.2 Principales estrategias desarrolladas para encontrar la cura

### 6.2.1 Estrategia Block and Lock

Estrategia que tiene como objetivo impedir la reactivación del provirus (Block) e inducir el silenciamiento del provirus (Lock) en ausencia de TAR (107), lo cual resultaría en la cura funcional de la infección por VIH. Numerosas moléculas con capacidad de reducir la expresión del VIH han sido descritas, así como agentes capaces de promover la latencia (LPAs) (Figura 11).

**Figura 11**



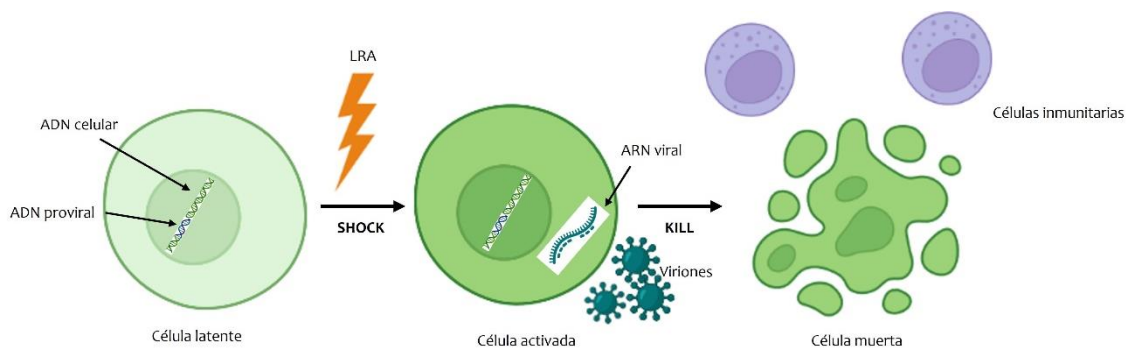
**Figura 11. Esquema de la estrategia Block and Lock.** Esta estrategia usa los LPAs para dejar las células infectadas en un estado de latencia profunda (Block) sin expresión de genes virales (Lock). Adaptada de Moranginho I. et al. (108).

Esta técnica puede tener como diana proteínas del huésped para conseguir el silenciamiento del provirus, como Hsp90 o p-TEFb (109), o proteínas virales, como Tat. El compuesto más común es didehidro-cortistatina A (dCA), capaz de unirse específicamente a Tat, bloqueando la interacción Tat/TAR (110) e inhibiendo la transcripción del ADN proviral (111). Ensayos en ratones humanizados demostraron que dCA era capaz de reducir la transcripción y reactivación del provirus de VIH, así como impedir la replicación viral en ausencia de TAR (112). Sin embargo, una de las principales limitaciones de este abordaje es que al tener como diana una proteína viral, se podrían generar mutaciones de resistencia.

### 6.2.2 Estrategia Shock and Kill

Estrategia contraria a la estrategia *block and lock* que tiene como objetivo la reactivación del provirus integrado (*Shock*) por agentes revertientes de latencia (LRAs) y la destrucción de estas células infectadas por parte del sistema inmunitario (*Kill*) (Figura 12).

**Figura 12**



**Figura 12. Esquema de la estrategia Shock and Kill.** Esta estrategia usa los LRAs (Shock) para favorecer la transcripción del ADN de la célula, y con ello del provirus integrado, aumentando la expresión de proteínas virales y la producción de viriones. Una vez activada la célula por el LRA, ésta sería visible al sistema inmunitario, que la destruiría (Kill). Adaptada de Kim Y. et al.(113)

Los LRAs pueden clasificarse según su modo de actuación (114):

- Moduladores de la modificación postransduccional de histonas. Vorinostat (115), Panobinostat (116) y Romidepsina (117), entre otros, son capaces de inducir la reactivación del provirus actuando sobre diferentes deacetilasas de histonas.
- Estimuladores de NF-κB. Principalmente agonistas de la proteína quinasa C (PKC) que inducen la activación del factor de transcripción NF-κB, como Briostatina (118).
- Agonistas de los receptores *toll-like* (TLR), como Flagelina, agonista de TLR5 (119); Vesatolimod, agonista de TLR7 (120); o MGN1703, agonista de TLR9 (121) han

mostrado eficacia en el control de la infección al potenciar la respuesta inmune y revertir la latencia.

- Estimuladores extracelulares. El Maraviroc es un inhibidor de la fusión del VIH (122) que tiene como diana el correceptor CCR5 que ha mostrado su eficacia no solo en el bloqueo de la entrada viral, sino en la inducción de NK-kB y la reactivación del VIH por lo que podría ser un adyuvante de TAR (123).

Sin embargo, los LRAs muestran diferente eficacia revirtiendo la latencia (124) y su uso ha mostrado en algunos casos toxicidad (125). Además, un único LRA no es suficiente para reactivar la totalidad del reservorio, por lo que tendrían que coadministrarse más de un LRA junto a TAR. Por ello, nuevos abordajes encaminados a la eliminación del reservorio de VIH siguen siendo necesarios.

### *6.2.3 Tratamiento temprano*

El tratamiento temprano se asocia con un mejor control de la viremia en ausencia de TAR en los períodos de interrupción del mismo. Así, pacientes que empezaron TAR en la fase aguda de la infección o en los primeros meses de vida, en los casos de transmisión vertical, mostraron una reducción de la activación de los linfocitos T y de la inflamación, así como un aumento de la respuesta específica frente al VIH (126). El caso conocido como “la niña de Mississippi” es un ejemplo de tratamiento temprano. Esta niña, hija de una madre seropositiva, empezó el tratamiento en las primeras horas de vida. Sin embargo, a los 4 años sufrió un repunte de la viremia de VIH (127, 128). Otros estudios avalan que hay una mayor disminución del tamaño del reservorio en aquellas personas que viven con VIH tratadas durante la fase aguda que en los tratados en una fase crónica (129). Sin embargo, aunque el tratamiento temprano es recomendado actualmente para preservar la integridad del sistema inmunitario, no es capaz de interferir con la formación del reservorio.

### *6.2.4 Inmunomodulación del sistema inmune*

#### *6.2.4.1 Inmunoterapia y anticuerpos de amplio espectro*

La inmunoterapia se ha convertido en una nueva herramienta frente al VIH, siendo considerada como prevención, terapia y cura. Las células infectadas pierden su capacidad antiviral, de manera que la actividad citotóxica y humoral está disminuida en aquellas personas que viven con VIH, y con ello la respuesta neutralizante mediada por anticuerpos, es inadecuada (130, 131). Diferentes estudios han demostrado que los anticuerpos neutralizantes de amplio espectro (bNAbs) son capaces de suprimir la viremia (132), potenciar el aclaramiento (133) y mejorar la respuesta humoral del sujeto infectado (134). Además, algunos estudios determinan que los bNAbs son capaces de prevenir la infección,

suprimir la replicación y repunte viral en plasma, incluso en ausencia de TAR, así como bloquear la transmisión célula-célula *in vitro* (135, 136).

Diferentes bNAbs han sido aislados, clonados y testados en diferentes ensayos clínicos. El anticuerpo 3BNC117, aislado y clonado de un sujeto controlador de la infección de VIH-1, ha sido usado en diferentes ensayos clínicos mostrando seguridad y efectividad reduciendo la viremia de VIH-1 (132, 137). Otro anticuerpo, VRC01, mostró una reducción de la viremia en plasma en individuos no tratados con TAR, incluso a niveles indetectables (138). El anticuerpo 10-1074 ha mostrado ser bien tolerado y eficacia en reducir la viremia (139).

No obstante, se han descrito resistencias a los bNAbs que se desarrollan de manera temprana durante el tratamiento y que inactivan su efecto (139). Es por ello que la combinación de dos o más bNAbs ha demostrado ser mejor que la monoterapia (140). Por otro lado, el aislamiento y clonaje de bNAbs es muy caro y su suministro vía parenteral necesita de profesionales sanitarios para la infusión. Por ello es necesario la búsqueda de alternativas más económicas y sencillas. El conocido como “Miami Monkey” abre la puerta a la producción de anticuerpos por parte del propio individuo tras la administración vía intramuscular de adenovirus con genes que codifican para bNAbs frente a VIH-1 (141).

#### 6.2.4.2 Inhibidores de Tirosina Kinasas

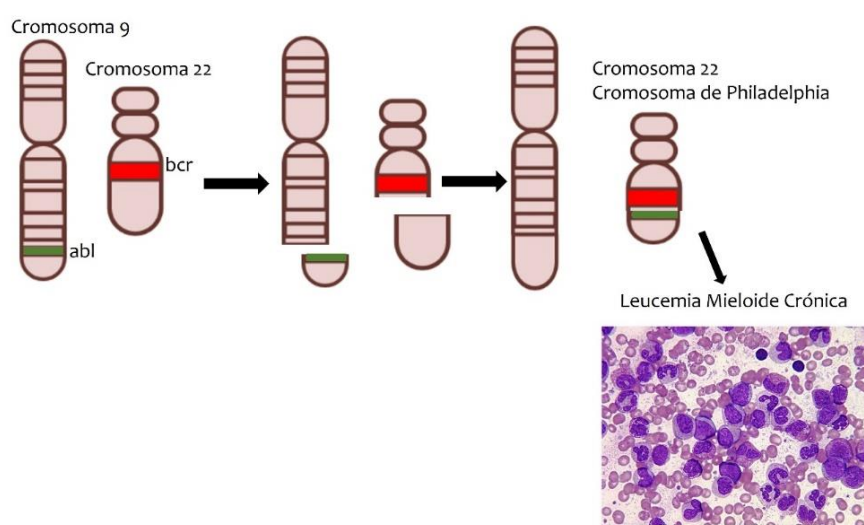
Durante la TAR, el mantenimiento del reservorio viral se debe principalmente a la expansión clonal inducida por antígenos y citoquinas de los linfocitos T CD4+ de memoria infectados latentemente (86, 142). Las  $\gamma$ c-citoquinas IL-2, IL-7 e IL-15 contribuyen a la proliferación homeostática sin producir la activación mediada por antígenos o citoquinas inflamatorias (143-145). Por ello, una manera de evitar el reemplazo del reservorio es la interferencia con este mantenimiento homeostático. Los ITKs han demostrado ser útiles en este aspecto (146).

La leucemia mieloide crónica (LMC) supone alrededor de un 15% de las leucemias en adultos (147), y tiene un importante impacto en el sistema sanitario. Así, para el control de la LMC o la leucemia linfoblástica aguda (LLA) se han desarrollado distintos ITKs (148-150). El objetivo de los ITKs es el control de la actividad kinasa de la proteína aberrante BCR-ABL, que deriva de la transcripción y posterior traducción del oncogen *BCR-ABL1*, generado como consecuencia de una translocación entre los cromosomas 9 y 22 [t(9;22)]. Esta translocación da lugar a un cromosoma defectivo de menor tamaño, conocido como cromosoma de Philadelphia (Ph+) (Figura 13) (151).

Inicialmente, imatinib (Glivec®, Novartis) (152) se desarrolló frente a esta kinasa aberrante y, tras ser aprobado para el tratamiento de la LMC en 2001, consiguió altas tasas de remisión y

mejoró la supervivencia en estos sujetos oncohematológicos (153). Unos años más tarde, debido al desarrollo de mutaciones de resistencia frente a imatinib, se desarrollaron fármacos de segunda generación como dasatinib (Sprycel®, BMS) (154), nilotinib (Tasigna®, Novartis) (155) y bosutinib (Bosulif®, Pfizer) (156), todos ellos más potentes que el imatinib frente a la proteína kinasa BCR-ABL (157, 158). Más recientemente, el uso de un fármaco de tercera generación, ponatinib (Iclusig®, Incyte Biosciences) (159, 160), y otro de cuarta generación, asciminib (Scemblix®, Novartis) (161) han sido aprobados para el tratamiento de LMC (Figura 14).

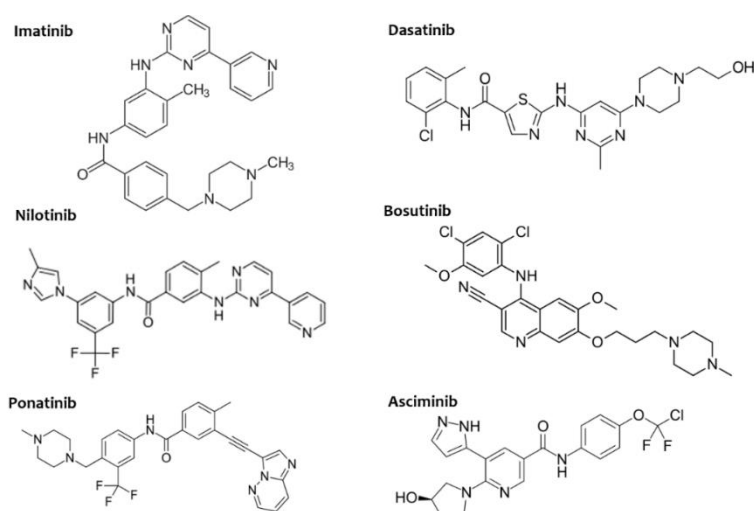
**Figura 13**



**Figura 13. Esquema de la formación del cromosoma de Philadelphia.** El oncogen BCR-ABL1 se genera como consecuencia de una translocación entre los cromosomas 9 y 22 [t(9;22)]. Esta translocación da lugar a un cromosoma defectivo de menor tamaño, conocido como cromosoma de Philadelphia (Ph+). Adaptado de Instituto Nacional del Cáncer (162).

El uso de los ITKs, como imatinib, dasatinib o nilotinib, en el tratamiento de la LMC ha permitido que la esperanza de vida entre las personas con enfermedades oncohematológicas y la población sana sea comparable (163, 164). Adicionalmente, la interrupción del tratamiento se considera en aquellos sujetos que alcanzan respuesta molecular profunda, definida como ratio BCR-ABL/ABL1  $\leq 0,01$ , y la mantienen al menos durante 2 años, iniciando un período de remisión libre del tratamiento (TFR). Durante este período de remisión del tratamiento, la mitad de los individuos que discontinúan son capaces de mantener RMP. Sin embargo, la otra mitad recae en los primeros seis meses (165-169). Bajos niveles de células *Natural Killer* (NK) y otras poblaciones citotóxicas, como los linfocitos T CD8 $\pm$ TCR $\gamma\delta$ , así como otros factores genéticos, como heterocigosis en el gen del HLA-E, se han relacionado con un peor control y recurrencia de la enfermedad (170).

Figura 14



**Figura 14. Esquemas de la composición química de los Inhibidores de Tirosina Kinasas aprobados para el tratamiento de la leucemia mieloide crónica.** El primer fármaco aprobado fue imatinib (primera generación). Posteriormente, se aprobaron dasatinib, nilotinib y bosutinib (segunda generación). Recientemente, se han aprobado ponatinib (tercera generación) y asciminib (cuarta generación) (171).

Por otro lado, es bastante improbable que todas las células tumorales se eliminen durante el tratamiento, por lo que las células leucémicas residuales deben ser controladas por el sistema inmunitario durante TFR para evitar la recaída (172). Se ha descrito el papel inmunomodulador de los ITKs en cuanto a que podrían modular la respuesta citotóxica con la expansión de linfocitos grandes granulares (LGLs) con un fenotipo citotóxico (173). Estos LGLs, al menos en los pacientes tratados con dasatinib, son de tipo NK (174, 175), y aunque también pueden tener fenotipo CD8, se cree que su expansión podría estar inducida por la presencia de la infección previa de CMV, un herpesvirus con una prevalencia mundial del 83% (176). En pacientes en tratamiento con dasatinib y serología positiva para CMV se ha descrito expansión de células NK con fenotipo de memoria CD3-CD56+CD57+, sugiriendo que estas células NK podrían estar asociadas con una respuesta antileucémica y antiviral, incluso en períodos de remisión libre de tratamiento (177-179). También se ha asociado una depleción de los linfocitos T que expresan TCR $\alpha\beta$  a favor de los linfocitos TCR $\gamma\delta$  con una mejor supervivencia de la leucemia (170, 180).

Algunos ITKs, como imatinib y nilotinib, son más selectivos y específicos de la kinasa BCR-ABL. Sin embargo, otros ITKs, como dasatinib y bosutinib, tienen acción frente otras kinasas, entre las que se encuentra LCK. Su actuación a distintos niveles del metabolismo celular repercute en el ciclo del VIH-1 (181):



- 1) Anteriormente, nuestro grupo describió que los linfocitos T CD4+ aislados de pacientes con LMC en tratamiento con dasatinib o ponatinib eran resistentes a la infección *in vitro* por el VIH-1 (182).
- 2) Además, nuestro grupo ha determinado que los ITKs dasatinib y ponatinib son capaces de interferir con la infección de VIH-1 a través de la inhibición de la fosforilación de SAMHD1 (182). SAMHD1 es un factor de restricción celular, que cuando está activo, y por tanto defosforilado, disminuye el pool de dNTPs, y con ello bloquea la proliferación celular e inhibe la activación de la transcripción celular de factores esenciales en la replicación del VIH-1, como NK- $\kappa$ B (146). La activación de la célula por  $\gamma$ c-citoquinas, como la IL-7, induce la fosforilación de SAMHD1 y con ello favorece el ciclo del VIH (81). Por lo tanto, el bloqueo de la fosforilación de SAMHD1 inducida por la activación celular mediante el uso de ITKs inhibe la retrotranscripción del VIH-1 (183-185).
- 3) Por otro lado, ratones humanizados de tipo NSG (ratones inmunodeficientes que carecen de linfocitos T, B y células NK maduras, lo cual permite la expresión de células humanas (186)) que recibieron dasatinib o placebo durante cinco días y posteriormente se infectaron intraperitonealmente con VIH-1 mostraron altos niveles de linfocitos T CD4+ naïve y menor carga viral y proviral, incluso en uno de ellos la viremia fue indetectable en el GALT (187). Estos datos confirman que el dasatinib protege de la infección aguda por VIH-1 a ratones humanizados con células CD34+.

La LMC no es una enfermedad asociada a la infección por VIH-1. Sin embargo, algunos casos de pacientes infectados por VIH-1 bajo TAR que han desarrollado LMC han sido descritos (188). Estos datos avalan que el tratamiento simultáneo de TAR e ITK, principalmente imatinib, dasatinib o nilotinib, es de gran tolerancia. Sin embargo, debería tenerse en cuenta para pautar un régimen de estos dos fármacos que imatinib y dasatinib se metabolizan en el citocromo CYP3A4 (189, 190), por lo que no deberían usarse con fármacos inhibidores de este citocromo como ritonavir (IP) y nevirapina o efavirenz (INNTI) (146, 191).

Teniendo en cuenta todo lo anterior, en este trabajo hemos estudiado si la potente respuesta antileucémica inducida por los ITKs podría ser extensible a la infección por VIH-1, y, por tanto, impedir la infección y contribuir a una menor frecuencia de integración proviral. Además, analizamos los efectos *in vivo* del tratamiento con dasatinib como adyuvante de TAR sobre la reactivación y el recambio homeostático del reservorio de VIH-1, lo cual podría tener un impacto positivo al reducir su tamaño y, posiblemente, favorecer su eliminación.

# HIPÓTESIS

Se sabe que los ITKs desempeñan un papel inmunomodulador en el organismo y podrían generar distintos mecanismos de control del reservorio. Nuestras hipótesis principales son:

1. Los ITKs inhiben la proliferación homeostática mediante la interferencia con la actividad de SAMHD1, ciclinas y kinasas dependientes de ciclinas, impidiendo por tanto el recambio homeostático del reservorio viral.
2. Los ITKs impiden la activación celular mediada por el TCR, interfiriendo con la reactivación de las células latentemente infectadas que forman parte del reservorio.
3. Debido a su efecto inmunomodulador sobre las células *Natural Killer*, los ITKs pueden aumentar su capacidad citotóxica sobre el reservorio reactivado, contribuyendo al control de la viremia.
4. En caso de confirmación de los mecanismos anteriores, demostraríamos que los ITKs tienen un impacto sobre el reservorio del VIH y contribuirían a la curación funcional de la infección.

# OBJETIVOS

1. Estudiar el mecanismo de inhibición de la fosforilación de SAMHD1 por distintos ITKs y su impacto sobre la infección por VIH-1.
2. Caracterizar los cambios sobre la actividad inmune innata inducidos por los distintos ITKs, así como su potencial actividad antiviral.
  - 2.1. Caracterización de la respuesta antileucémica y antiviral frente al VIH de los ITKs .
  - 2.2. Estudio de la respuesta inmune mediada por linfocitos T CD8+ y células NK en respuesta a los ITKs.

# **MATERIALES Y MÉTODOS**

## 1. Pacientes

Para el Estudio 1, se aislaron linfocitos de sangre periférica (*Peripheral Blood Lymphocytes*, PBLs) de 17 pacientes con LMC que llevaban en remisión libre de tratamiento una media de  $1,1 \pm 0,2$  años sin recurrencia molecular de su enfermedad hematológica. Los pacientes se reclutaron en el Hospital Universitario La Princesa, Hospital Universitario Puerta de Hierro y Hospital Universitario Ramón y Cajal (Madrid, España). Treinta donantes sanos con similar edad y distribución por sexo se reclutaron como controles

Las muestras del Estudio 2 se obtuvieron de 3 pacientes con infección crónica por VIH-1 que desarrollaron LMC y estaban en tratamiento con TAR y dasatinib; 32 individuos con infección crónica por VIH-1 en tratamiento con TAR; y 18 individuos con LMC en tratamiento con dasatinib. Ocho donantes sanos con similar edad y distribución por sexo se reclutaron como controles. Los PBLs se aislaron de las muestras de sangre mediante centrifugación en gradiente de densidad usando Ficoll (Sigma Aldrich, St, Louis, MO). El plasma y las células se crioconservaron hasta el momento de análisis.

## 2. Aspectos éticos

Todos los individuos dieron consentimiento informado por escrito para participar en el estudio correspondiente. La confidencialidad y anonimato de todos ellos se garantizó por la actual ley de Protección de Datos Española y Europea. El protocolo para ambos estudios se realizó en base a la Declaración de Helsinki y fue previamente revisado y aprobado por los Comités de Ética del Instituto de Salud Carlos III (CEI PI 46\_2018) y todos los hospitales participantes

## 3. Purificación de poblaciones celulares

Los linfocitos T CD4+ se aislaron de los PBLs de los pacientes y donantes sanos usando el kit de aislamiento *CD4+ T Cell Isolation Kit* (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany), siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, el total de PBLs se incubó con unas bolas magnéticas anti-CD4 (selección positiva). El total de PBLs junto a las bolas magnéticas se sometieron a un campo magnético para descartar las células que no expresan en su superficie el marcador CD4, y que, por tanto, no quedaban unidas a las bolas magnéticas. Finalmente, las células unidas a las bolas magnéticas (linfocitos T CD4+) se eluyeron en ausencia de campo magnético. Las poblaciones de NK se aislaron eliminando los linfocitos T CD8+ y las células CD14+ de los restos de la purificación de los linfocitos T CD4+ usando los kits de aislamiento *Human CD8+ T Cell Isolation Kit* y *Human CD14 MicroBeads* (Miltenyi). Brevemente, los restos de la purificación de los linfocitos T CD4+ se incubaron con bolas

magnéticas anti-CD8 y anti-CD14. Tras la incubación, se sometieron a un campo magnético donde quedaron retenidas las células CD8+ (linfocitos T CD8+) y CD14+ (monocitos). Las NKs quedaron así en la fracción eludida.

Todas Las células se cultivaron en RPMI 1640 suplementado con 10% suero de ternera fetal, 2mM L-glutamina, 100µg/ml estreptomicina y 100UI/ml penicilina (Biowhittaker, Walkersville, MD). Los linfocitos T se activaron añadiendo 5µg/ml fitohemaglutinina (PHA) (Sigma-Aldrich) y 300 unidades/ml IL-2 Chiron, Emeryville, CA) al medio durante 72 horas.

#### 4. Anticuerpos y vectores

Tabla 4. Información relativa a los anticuerpos monoclonales empleados en los Estudios 1 y 2

| Anticuerpo                                  | Fluorocromo | Referencia | Casa Comercial   |
|---|-------------|------------|------------------|
| CD3   | APC         | 555342     | BD               |
| CD3   | BV510       | 564713     | BD               |
| CD3   | PE-Cy7      | 300420     | Palex biomedical |
| CD4   | PercP-Cy5.5 | 345770     | BD               |
| CD8   | APC-H7      | 560179     | BD               |
| CD16  | PercP-Cy5.5 | 338440     | BD               |
| CD25  | PE          | 25PE-100T  | Immunostep       |
| CD45RA                                      | PE-Cy7      | 561216     | BD               |
| CD56  | FITC        | 345811     | BD               |
| CD69  | FITC        | 347823     | BD               |
| CCR7  | FITC        | 560548     | BD               |
| TCRγδ                                       | PE          | 331209     | BioLegend        |
| Core VIH (proteínas de 55, 39, 33 y 24 kDa) | FITC        | 6604665    | Beckman Coulter  |
| IFNγ  | PE          | IM2717U    | Beckman Coulter  |
| pSAMHD1                                     | PE          | 875935     | Cell Signaling   |

El vector pNL4-3 *wild type* que contenía el genoma completo del VIH y con capacidad de replicación tras la transfección fue facilitado por el Dr. M.A Martin (192). El vector pNL4-3\_Renilla fue obtenido reemplazando el gen *nef* del clon pNL4-3 con el gen de Renilla luciferasa (LUC) (193).

#### 5. Infección por VIH-1 *ex vivo*

Los sobrenadantes infecciosos con el NL4-3\_Renilla se obtuvieron mediante transfección con fosfato cálcico de las células HEK293T (proporcionadas por la colección de células del



Instituto de Salud Carlos III) con el plásmido pNL4-3\_Renilla. La infección *ex vivo* mediante espinoculación se realizó en los linfocitos T CD4+ aislados de los PBLs de los pacientes con LMC y donantes sanos, previamente activados con PHA e IL-2 durante 72 horas. Los linfocitos T CD4+ se infectaron con 1ng de p24 del pseudovirus NL4-3\_Renilla por millón de células durante 30 minutos en rotación, a temperatura ambiente. Después de una centrifugación a 600g durante 30 minutos a 25°C y lavados con PBS 1x, las células se incubaron durante 5 o 7 días en presencia de IL-2. La producción de renilla se midió en los pellets de células usando el kit *Renilla Luciferase Assay System* (Promega Biotech Ibérica, Madrid, España) mediante quimioluminiscencia.

## 6. Cuantificación de integración proviral mediante TaqMan qPCR

El ácido nucleico del genoma completo se extrajo de los linfocitos T CD4+ infectados *ex vivo* usando el kit *QIAamp DNA Blood Mini Kit* (Qiagen Iberia, Madrid, España) y se cuantificó con un Nanodrop 2000C (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). El ADN del provirus integrado se cuantificó usando sondas TaqMan conjugadas con el fluorocromo FAM mediante Alu-LTR PCR en un equipo StepOne Real-Time PCR (Thermo Fisher Scientific), como previamente está descrito (194, 195). Brevemente, primero se realizó una PCR convencional usando oligonucleótidos específicos para la secuencia Alu y LTR del VIH-1, con las siguientes condiciones: 95°C, 8 min; 12 ciclos: 95°C, 1 min; 60°C, 1 min; 72°C, 10 min; 1 ciclo: 72°C, 15 min. Luego, una segunda qPCR se realizó usando sondas TaqMan con FAM/ZEN/Iowa Black (Integrated DNA Technologies, Leuven, Belgium) y TaqMan Master Mix (Thermo Fisher Scientific). El ADN de la línea celular 8E5 se empleó como referencia para establecer la curva estándar y la cuantificación del gen CCR5 como gen housekeeping para medir la cantidad de ADN y normalizar los datos. El gen CCR5 se cuantificó en el mismo pocillo que el gen VIH-1 LTR empleando el sistema de TaqMan™ Gene Expression Assay con una sonda TaqMan conjugada con el fluorocromo VIC (Thermo Fisher Scientific).

## 7. Análisis de marcaje intracelular y citometría de flujo

El marcaje intracelular de pSAMHD1 se realizó siguiendo las indicaciones del fabricante. Brevemente, las células se fijaron y permeabilizaron con metanol (Sigma Aldrich). Después del lavado, las células se marcaron con el anticuerpo anti-pSAMHD1-PE y se analizaron mediante citometría de flujo.

Para el marcaje intracelular con anti-IFN $\gamma$ -PE, las células se trataron con pepMIX HCMVA pp65 e IE1 (JPT Peptide Technologies, Berlin, Germany), para inducir la respuesta específica de CD8+ frente a CMV, o el péptido Hsp70 (Abcam, Cambridge, UK), para estimular la actividad

de las células NKs, en presencia de brefeldina A (BD Biosciences) durante 4 h a 37°C. Tras la incubación, las células estimuladas con los péptidos de CMV se marcaron con CD3-PE-Cy7 y CD8-APC-H7, y las estimuladas con Hsp70, se marcaron con anti-CD3-APC, anti-CD56-FITC y anti-CD16-PercP-Cy5. Después del marcaje de superficie, las células se fijaron y permeabilizaron usando el reactivo de permeabilización *IntraPrep Permeabilization Reagent* (Beckman Coulter). Una vez permeabilizadas, se incubaron con el anticuerpos anti-IFN $\gamma$ -PE y se analizaron mediante citometría de flujo.

La adquisición de datos de citometría de flujo se realizó usando un citómetro de flujo BD LSR Fortessa X-20 (BD Biosciences) con el software BD FACSDiva. El análisis de datos se realizó usando el software FlowJo (TreeStar, Ashland, OR).

## 8. Ensayos de citotoxicidad de NKs

Los linfocitos T CD4+ se purificaron de los PBLs de pacientes con LMC en remisión del tratamiento y los controles sanos; y del resto de células, se eliminaron los linfocitos T CD8+ y CD14+, como se describe más arriba. Mediante citometría de flujo se determinó que, del resto de células, el 75% eran células que expresaban CD56. Los linfocitos T CD4+ se activaron con PHA e IL-2 durante 72 horas y luego se infectaron *ex vivo* con el pseudovirus NL4-3\_Renilla en presencia o ausencia de células NKs (ratio 1:1). Después de medir la producción de Renilla en el pellet de células, la actividad citotóxica se calculó en base a la siguiente ecuación:

$$\text{Fold de citotoxicidad} = \frac{\text{media RLUs renilla en CD4 + purificados}}{\text{media RLUs renilla en cocultivo CD4+:NK (ratio 1:1)}}$$

## 9. Serología de CMV

Los niveles de anticuerpos de tipo IgG específicos frente a CMV fueron analizados en plasma de los pacientes con LMC en ausencia de tratamiento mediante quimioluminiscencia, usando el kit comercial Liaison CMV IgG (Diasorin, Italy) en colaboración con el Servicio de Serología del Instituto de Salud Carlos III. Siguiendo las recomendaciones del fabricante, valores superiores a 230 unidades/ml (U/ml) se consideraron positivos. Los resultados se expresan mediante el cociente del valor obtenido y el valor de corte (230 U/ml). Este cociente se denominó Fold.

## 10. Ensayo de reactivación del provirus

Los linfocitos T CD4+ aislados de pacientes infectados con VIH-1 en tratamiento con TAR se incubaron *ex vivo* con bolas magnéticas activadoras CD3/CD28 (Dynabeads human T activator CD3/CD28, Thermo Fisher Scientific) y 300U/ml de IL-2 (Chiron, Emeryville, CA) durante 7 días, en presencia o ausencia de 75nM dasatinib (Selleckchem, Deltaclon, Madrid, España). Los

linfocitos T CD4+ aislados de individuos con VIH y LMC se incubaron *ex vivo* solo con las bolas magnéticas activadoras CD3/CD28 e IL-2 durante 7 días. Tras los 7 días de incubación, en ambos casos, los linfocitos T CD4+ se incubaron con 25ng/ml forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) y 1,5µg/ml ionomicina durante 18 horas en presencia de brefeldina A. Los PBLs se lavaron, fijaron y permeabilizaron con *IntraPrep Permeabilization Reagent* (Beckman Coulter) para el marcaje con el anticuerpo dirigido frente a VIH-1 (kc57)-FITC y anti-pSAMHD1-PE. La fosforilación de SAMHD1 y la síntesis de proteínas de víricas se analizó mediante citometría de flujo.

### 11. Ensayo de ADN proviral intacto, IPDA

La proporción de provirus intacto se evaluó por duplicado en el total de ADN extraído de los PBLs de individuos VIH-1+ tratados únicamente con TAR o con TAR y dasatinib. Cada pocillo del duplicado contenía hasta 1µg de ADN, los reactivos del kit *ddPCR Supermix for Residual DNA Quantification* (Bio-Rad, Bio-Rad Laboratories, Madrid, España) y múltiples sondas que permitieran detectar las secuencias no hipermutadas, como se describió previamente (196). La normalización por número de células y fragmentación de ADN se basó en la cuantificación de los duplicados, conteniendo cada pocillo 50 ng de ADN y los reactivos de ddPCR multiplex específica para dos regiones del gen RPP30 (197) y sondas *ddPCR Supermix* (no dUTPs, Bio-Rad). Todas las sondas eran FAM/HEX-ZEN-IowaBlackFQ (Integrated DNA Technologies). Ambas cuantificaciones se analizaron simultáneamente con las siguientes condiciones: 10 min 95°C; 45 ciclos de 30 seg 94°C 60 seg 53°C; 10 min 98°C y mantenimiento a 10°C. Las gotas se analizaron con un lector QX100 Droplet Reader (Bio-Rad).

### 12. Ensayo Luminex

Un kit customizado para analitos humanos de Luminex Magnético (R&D Systems) se usó para la detección simultánea de las citoquinas homeostáticas en plasma: IL-2, IL-7, IL-15 e IL-22. Se siguieron las instrucciones dadas por el fabricante y el análisis se hizo en un equipo Bio-Plex 200 (Bio-Rad).

### 13. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con el software Graph Pad Prism 8.0 (Graph Pad Software Inc., San Diego, CA). La significancia estadística de las diferencias entre grupos se calculó mediante one-way ANOVA y el test Tukey, para múltiples comparaciones; y el t-test Mann-Whitney para comparar dos grupos de muestras no pareada y no paramétricas. Los valores de  $p < 0,05$  se consideraron estadísticamente significativos y se representaron \*, \*\*, \*\*\* o \*\*\*\* para  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$ ;  $p < 0,001$ ; o  $p < 0,0001$ ; respectivamente.



# RESULTADOS

## Estudio 1. Las poblaciones citotóxicas desarrolladas durante el tratamiento con inhibidores de tirosina kinasas protegen a los linfocitos T CD4+ autólogos de la infección por VIH-1

Referencia: Vigón L, Rodríguez-Mora S, Luna A, Sardonís V, Mateos E, Bautista G, Steegmann JL, Climent N, Plana M, Pérez-Romero P, de Ory F, Alcamí J, García-Gutierrez V, Planelles V, López-Huertas MR, Coiras M. Cytotoxic cell populations developed during treatment with tyrosine kinase inhibitors protect autologous CD4+ T cells from HIV-1 infection. *Biochem Pharmacol.* 2020 Dec;182:114203. doi: 10.1016/j.bcp.2020.114203. Epub 2020 Aug 20. PMID: 32828803; PMCID: PMC7686055.

### 1.1 Poblaciones de estudio

Diecisiete pacientes con LMC Ph+ fueron reclutados para este estudio (57% hombres, 43% mujeres) (Tabla 5). La edad media de diagnóstico de LMC fue de 61±5,5 años y todos los pacientes recibieron tratamiento con imatinib, nilotinib o dasatinib durante una media de 5,3±0,4 años. Debido a RMP, estos pacientes discontinuaron el tratamiento con ITK y llevaban de media 1,1±0,2 años sin tratamiento ni recurrencia molecular de su enfermedad hematológica. Once pacientes (65%) fueron tratados con un único ITK antes de la suspensión de tratamiento, 5 de ellos (29%) fueron tratados con dos ITKs y un paciente (6%) fue tratado con los tres ITKs. El ITK más frecuente antes de la suspensión del tratamiento fue nilotinib (54%), seguido de un 23% que fue tratado con dasatinib y un 23% con imatinib. Todos los pacientes eran seronegativos para VIH-1 y seropositivos para CMV, tenían valores hematológicos y bioquímicos normales en las analíticas de rutina, y gozaban de buena salud en el momento de la toma de la muestra, sin complicaciones concomitantes. La media de linfocitos fue de 2,4±0,3x10<sup>3</sup>/ml.

Un total de 30 donantes sanos con edad y distribución por sexo y edad similares se reclutaron como controles para los diferentes análisis.

### 1.2 Activación de los linfocitos T CD4+ de pacientes con LMC en suspensión de tratamiento sin recurrencia de LMC

Los PBLs aislados de la muestra de sangre periférica de los pacientes con LMC en suspensión de tratamiento y remisión de su enfermedad hematológica (n=4, P2-P5, Tabla 5) y de donantes sanos (n=9) fueron analizados midiendo marcadores de activación en superficie (anti-CD25-PE y anti-CD69-FITC) mediante citometría de flujo. Los linfocitos T CD4+ de los pacientes en suspensión del tratamiento y remisión de su enfermedad hematológica mostraron una expresión de CD25+/CD69+ 2,7 veces menor que los linfocitos T CD4+ provenientes de los donantes sanos (p<0,05) en condiciones no activadoras (Figura 15A, gráfico de la izquierda). La activación ex vivo con PHA e IL-2 durante 3 días mostró un

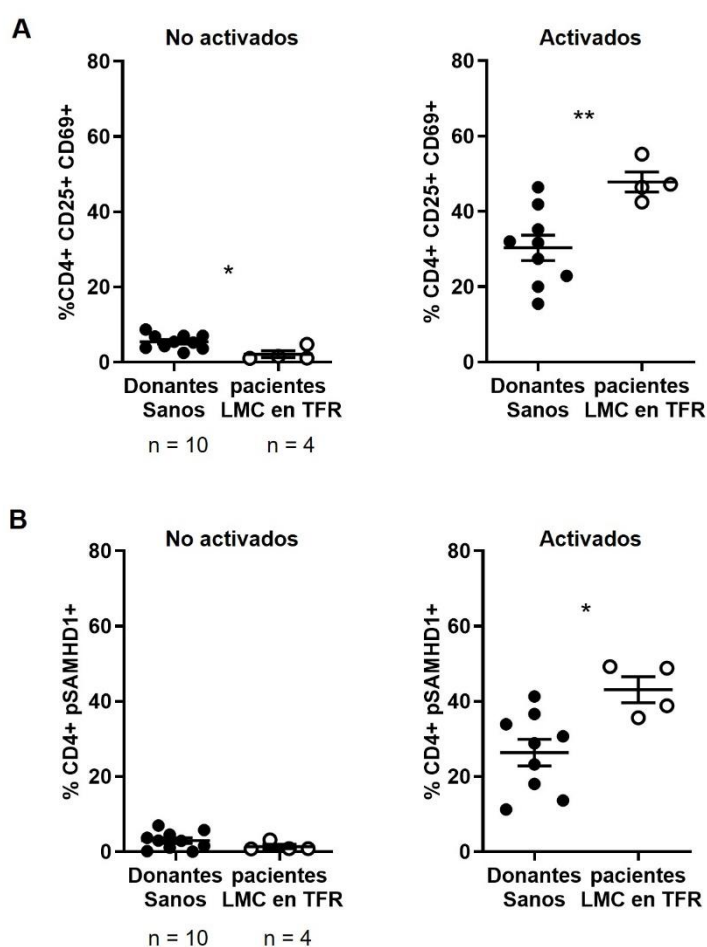
aumento de los marcadores de activación en los linfocitos T CD4+ en ambos grupos de pacientes. La expresión media de CD25+ y CD69+ fue 47,8% en los pacientes con LMC en comparación con un 30,3% en los donantes sanos ( $p < 0,01$ ) (Figura 15A, gráfico de la derecha). El marcaje intracelular con anti-pSAMHD1 en los linfocitos T CD4+ no activados mostró una disminución de 2 veces en su fosforilación en los pacientes LMC en suspensión de tratamiento y remisión de su enfermedad hematológica en comparación con el grupo de donantes sanos (Figura 15B, gráfico de la izquierda). El tratamiento ex vivo con PHA e IL-2 durante 3 días aumentó los niveles de pSAMHD1 en ambos grupos. La expresión media en los pacientes LMC fue de 43,8% en comparación con un 28,8% en los donantes sanos ( $p < 0,05$ ) (Figura 15B, gráfico de la derecha).

**Tabla 5. Características clínicas de los pacientes con leucemia mieloide crónica en remisión de tratamiento que participaron en el estudio.**

| Código | Género (H/M) | Edad diagnóstico LMC (años) | Riesgo Sokal | Ratio respuesta molecular (SI) | Previo ITK          | Último ITK antes de discontinuar | Tiempo en tratamiento con el último ITK | Dosis último ITK (mg/día) | Tiempo sin ITK (ITK Off) | Número linfocitos ( $10^3/ml$ ) |
|--------|--------------|-----------------------------|--------------|--------------------------------|---------------------|----------------------------------|---|---------------------------|--------------------------|---------------------------------|
| P1     | M            | 83                          | Ind          | 0,0006                         | Imatinib            | Nilotinib                        | 2a                                      | Ind                       | 6m                       | 3,41                            |
| P2     | H            | 61                          | Ind          | 0,0004                         | Imatinib            | Nilotinib                        | 2a                                      | Ind                       | 6m                       | 2,1                             |
| P3     | H            | 48                          | BAJO         | 0,0051                         | No Previo           | Dasatinib                        | 3a 7m                                   | Ind                       | 4m                       | 3,63                            |
| P4     | M            | 61                          | INT          | 0,0019                         | No Previo           | Imatinib                         | 3a 5m                                   | Ind                       | 1a 2m                    | 1,99                            |
| P5     | H            | 40                          | BAJO         | 0,0005                         | No Previo           | Nilotinib                        | 5a                                      | Ind                       | 1a 2m                    | 1,3                             |
| P6     | M            | 63                          | INT          | Ind                            | No Previo           | Nilotinib                        | 3a 8m                                   | Ind                       | 2a 2m                    | 2,27                            |
| P7     | H            | 74                          | INT          | 0,0006                         | No Previo           | Nilotinib                        | 3a 3m                                   | Ind                       | 2a 2m                    | 1,76                            |
| P8     | M            | 38                          | BAJO         | 0,0000                         | No Previo           | Imatinib                         | 14a 4m                                  | 400/300                   | 1a 4m                    | 2,94                            |
| P9     | H            | 31                          | INT          | 0,0000                         | Imatinib            | Dasatinib                        | 7a 1m                                   | 140                       | 4a 11m                   | 1,67                            |
| P10    | H            | 53                          | BAJO         | 0,0020                         | No Previo           | Nilotinib                        | 3a 7m                                   | 600                       | 3a 6m                    | 1,28                            |
| P11    | M            | 42                          | BAJO         | 0,0000                         | No Previo           | Imatinib                         | 15a 2m                                  | 400/300                   | 2a                       | 1,54                            |
| P12    | M            | 33                          | BAJO         | 0,0000                         | Imatinib            | Nilotinib                        | 3a 8m                                   | 800/600                   | 3a 5m                    | 2,66                            |
| P13    | H            | 41                          | BAJO         | 0,0000                         | No Previo           | Imatinib                         | 14a 11m                                 | 400/300                   | 2a                       | 1,32                            |
| P15    | H            | 46                          | INT          | 0,0000                         | Imatinib, nilotinib | Dasatinib                        | 4a 6m                                   | 50                        | 1a 1m                    | 4,07                            |
| P16    | M            | 71                          | INT          | 0,0000                         | No Previo           | Nilotinib                        | 4a 4m                                   | 600                       | 3a 8m                    | 2,21                            |
| P17    | H            | 74                          | INT          | 0,0000                         | No Previo           | Nilotinib                        | 3a 3m                                   | 600                       | 3a 8m                    | 1,76                            |
| P18    | H            | 26                          | BAJO         | 0,0000                         | Imatinib            | Dasatinib                        | 5a                                      | 100                       | 1a 9m                    | Ind                             |

a: años; H: hombre; ITK: Inhibidor Tirosina Kinasas; Ind: Indeterminado; INT: intermedio, M: mujer; m: meses, SI: Escala Internacional.

Figura 15



**Figura 15. Niveles de expresión de marcadores de activación en linfocitos T CD4+ de pacientes con LMC en remisión de tratamiento.** (A) Análisis por citometría de flujo de la expresión de los marcadores de activación CD25 y CD69 en linfocitos T CD4+ en reposo y activados de pacientes con LMC en ausencia de tratamiento en comparación con células de donantes sanos. La activación de las células T se hizo con PHA e IL-2 durante 3 días. (B) La fosforilación de SAMHD1 se analizó en las mismas células mediante citometría de flujo después de un marcaje intracelular. Cada punto corresponde a un único valor y las líneas representan la media  $\pm$  SEM. La significancia estadística se calculó usando el test Mann-Whitney. \* $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ .

### 1.3 Los PBLs de los pacientes con LMC en ausencia de tratamiento y remisión de su LMC son resistentes a la infección por VIH-1

Los PBLs fueron aislados de las muestras de sangre periférica de pacientes LMC en ausencia de tratamiento y remisión de su LMC ( $n=7$ , P1-P7, Tabla 5) y donantes sanos ( $n=28$ ) y activados con PHA e IL-2 durante 3 días. Después las células fueron infectadas con el clon recombinante VIH-1 NL4-3\_Renilla y cultivadas durante 7 días en presencia de IL-2. La integración proviral fue analizada mediante Alu-qPCR y se observó una reducción media de 12,5 veces en las



células aisladas de los pacientes LMC en comparación con las células aisladas de donantes sanos ( $p < 0,001$ ) (Figura 16A). El número medio de copias no integradas por millón de células fue de 23.268 (Rango Intercuartílico (IQR) 5.517 a 41.382) en los donantes sanos, en comparación con 1.874 (IQR 0 a 3.311) en los pacientes LMC en ausencia de tratamiento y remisión de su enfermedad hematológica. La replicación del virus fue analizada mediante la cuantificación de la producción de Renilla-luciferasa (RLUs) y se redujo 5,2 veces de media en los PBLs de los pacientes LMC en comparación con los donantes sanos ( $p < 0,0001$ ) (Figura 16B). El número medio de RLUs fue de 55.077 (IQR 29.405 a 80.124) en los donantes sanos, en comparación con 10.527 (IQR 4.468 a 16.050) en los pacientes LMC. Estos datos fueron inesperados ya que la fosforilación e inactivación de SAMHD1 se asocia a una mayor permisividad a la infección de los linfocitos T CD4, mientras que los resultados mostraron por el contrario una resistencia a la misma. Por consiguiente, especulamos que el aumento de la infectividad de linfocitos T CD4 debía ser antagonizada por un aumento de actividad citotóxica por parte de linfocitos T CD8+ o NK.

Figura 16

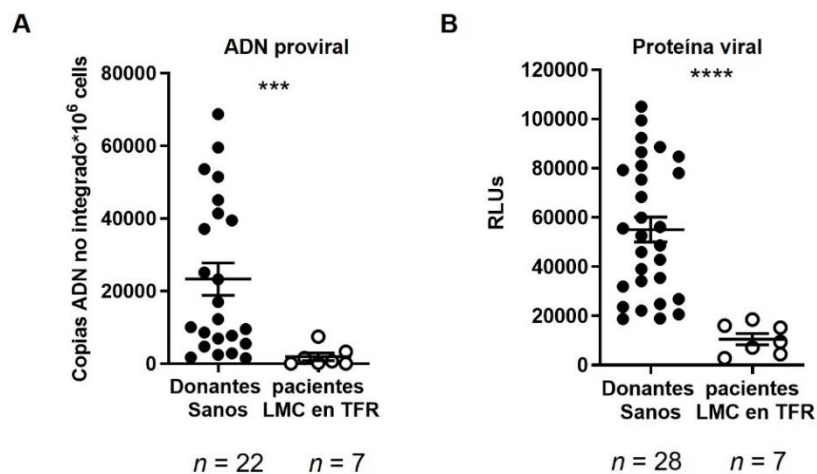


Figura 16. Los PBLs de los pacientes con LMC en ausencia de tratamiento y remisión de LMC mostraron resistencia a la integración proviral de VIH-1 y su transcripción. (A) Análisis de la integración proviral en PBLs infectados *in vitro* con NL4-3\_Renilla durante 7 días y (B) cuantificación de la síntesis de renilla por quimioluminiscencia en las mismas células. Cada punto corresponde a un único valor y las líneas representan la media  $\pm$  SEM. La significancia estadística se calculó usando el test Mann-Whitney. \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$

#### 1.4 Aumento de la actividad NKs en pacientes con LMC en ausencia de tratamiento y remisión de su enfermedad hematológica

La expresión de los marcadores de NK CD56 y CD16 fue analizada mediante citometría de flujo en los PBLs de los pacientes con LMC en ausencia de tratamiento y remisión de LMC

(n=11; P8-P18, Tabla 5), en comparación con los donantes sanos. La expresión de CD56 mostró una gran variabilidad en los pacientes con LMC, pero estaba aumentada 1,4 veces de media respecto al grupo control (Figura 17A, gráfico de la izquierda). Los PBLs de los pacientes con LMC (27,2%) mostraron un aumento medio de 2,2 veces de la subpoblación CD3-CD56+CD16+ en comparación con los donantes sanos (10,7%) ( $p < 0,05$ ) (Figura 17A, gráfico central). Por el contrario, la subpoblación CD3-CD56+CD16- estaba disminuida una media de 2,0 veces en los pacientes con LMC ( $p < 0,01$ ) (Figura 17A, gráfico de la derecha). Aquellos pacientes con LMC cuyos PBLs tenían mayor expresión de CD56+ eran los mismos que tenían mayor proporción de la subpoblación CD3-CD56+CD16+.

Para determinar si las poblaciones de NK con mayor expresión de marcadores de activación eran también más efectivas, analizamos la capacidad de producción de IFN $\gamma$  en ambas subpoblaciones CD16 $\pm$  en respuesta al péptido Hsp70, el cual induce proliferación y actividad citotóxica en las NK (198). La síntesis de IFN $\gamma$  aumentó de media 1,7 veces en las células CD3-CD56+CD16+ de los pacientes LMC en ausencia de tratamiento y remisión de su enfermedad hematológica (n=5, P8-P12, Tabla 5) (Figura 17B, gráfico izquierdo). Por el contrario, la síntesis de IFN $\gamma$  por las células CD3-CD56+CD16- no mostró cambios con respecto a la misma población de los donantes sanos (Figura 17B, gráfico derecho). Además, la población de NK con fenotipo de memoria CD3-CD56+CD57+ estaba aumentada de media 1,4 veces en los pacientes LMC en comparación con los donantes sanos ( $p < 0,01$ ) (Figura 17C).

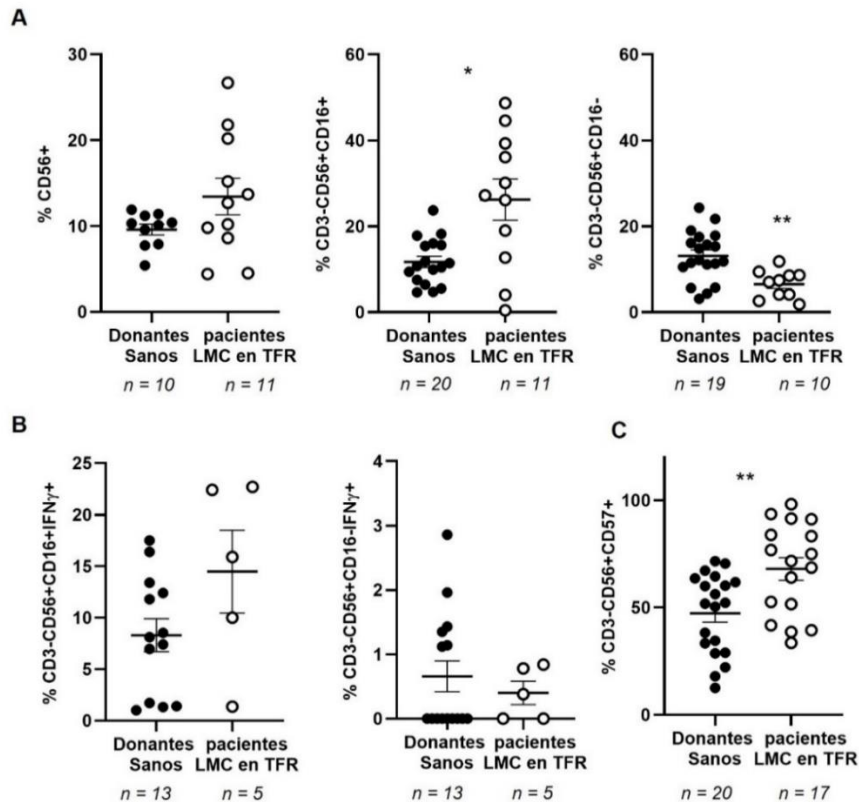
### 1.5 Incremento de la actividad antiviral de los linfocitos CD8 $\pm$ TCR $\gamma\delta$ en los pacientes con LMC en ausencia de tratamiento y remisión de LMC

El análisis por citometría de flujo de la expresión del receptor TCR $\gamma\delta$  en los PBLs de los pacientes LMC en ausencia de tratamiento y remisión de su enfermedad hematológica (n=11, P8-P-18, Tabla 5) mostró que el porcentaje de linfocitos CD3+ expresando este receptor era mayor que en los PBLs de donantes sanos. Los linfocitos T CD8+ TCR $\gamma\delta$  aumentaron de media 6,3 veces ( $p < 0,0001$ ) (Figura 18A) en los en los pacientes con LMC (34,9%) en comparación con los donantes sanos (5,5%). Los linfocitos T CD8- TCR $\gamma\delta$  aumentaron de media 2,6 veces ( $p < 0,01$ ) (Figura 18B) en los en los pacientes con LMC (14,9%) en comparación con los donantes sanos (5,7%).

Todos los pacientes reclutados en este estudio eran seropositivos para CMV. El análisis de los niveles de IgG específicas para CMV en plasma eran de media 2,1 veces mayor en los pacientes LMC en remisión en comparación con los donantes sanos seropositivos para CMV ( $p < 0,05$ ) (n=11, P8-P18, Tabla 5) (Figura 18C). La actividad antiviral de memoria de los linfocitos CD8+

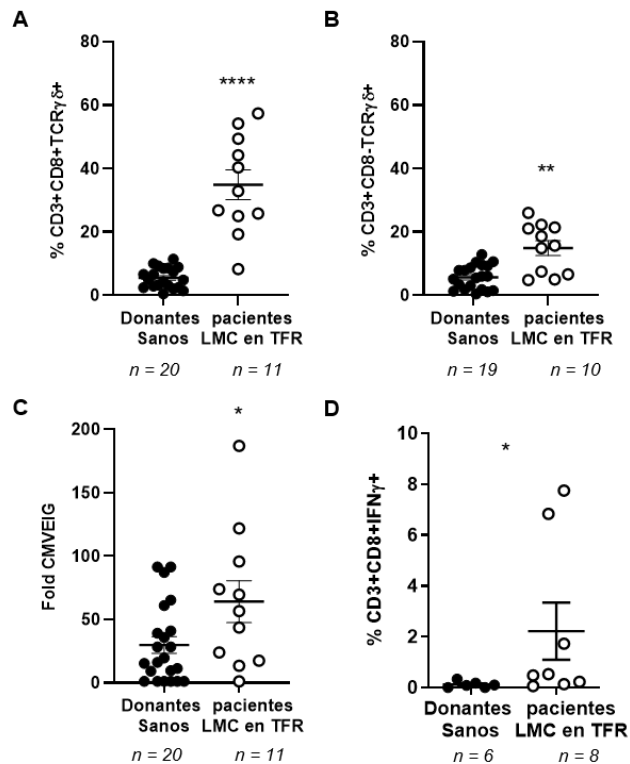
frente a CMV desarrollada durante el tratamiento con ITK se analizó en los PBLs aislados de los pacientes LMC en ausencia de tratamiento y posteriormente estimulados con péptidos específicos de CMV. La producción de IFN $\gamma$  por los linfocitos T CD3+CD8+ estaba aumentada de media 18,7 veces en los pacientes LMC en remisión del tratamiento en comparación con los donantes sanos ( $p < 0,05$ ) (Figura 18D).

Figura 17



**Figura 17. Fenotipo y actividad citotóxica en las poblaciones NK de pacientes con LMC con remisión en ausencia de tratamiento.** (A) Análisis de la expresión de los niveles de CD56 y CD16 mediante citometría de flujo en las células NK de sangre periférica de los pacientes en comparación con donantes sanos. (B) Porcentaje de niveles intracelulares de IFN $\gamma$  producido por las células NK de PBLs con fenotipo CD3-CD56+CD16 $\pm$  de pacientes con LMC en ausencia de tratamiento en comparación con donantes sanos. (C) Niveles de expresión de las células NK con fenotipo CD3-CD56+CD57+ en PBLs de pacientes con LMC en comparación don donantes sanos. Cada punto corresponde a un único valor y las líneas representan la media  $\pm$  SEM. La significancia estadística se calculó usando el test Mann-Whitney. \* $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$

Figura 18



**Figure 18. Fenotipo y actividad citotóxica de las poblaciones de linfocitos T CD8+ en pacientes con LMC y donantes sanos.** (A) CD3+CD8+TCR $\gamma\delta$  o (B) CD3+CD8-TCR $\gamma\delta$  en pacientes con LMC en remisión y ausencia de tratamiento en comparación con donantes sanos. (C) Fold de los niveles de IgG específicos frente a CMV. (D) Producción de IFN $\gamma$  por el total de linfocitos T CD3+CD8+ de pacientes con LMC en TFR analizada mediante citometría de flujo después de la estimulación con péptidos de CMV. Cada punto corresponde a un único valor y las líneas representan la media  $\pm$  SEM. La significancia estadística se calculó usando el test Mann-Whitney. \*p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\*\*p<0,0001.

### 1.6 La respuesta citotóxica de las NKs en pacientes con LMC en ausencia de tratamiento y remisión de LMC interfieren con la infección por VIH de los CD4+ autólogos

Analizamos si la respuesta de memoria antiviral frente a CMV desarrollada durante el tratamiento con ITK podría ser también eficiente impidiendo la infección por VIH-1 de linfocitos T CD4+ autólogos. Así, los linfocitos T CD4+ aislados de los PBLs de los pacientes LMC en ausencia de tratamiento y remisión de su enfermedad hematológica (n=9, P8-P13, P16-P18, Tabla 5) y de donantes sanos se infectaron *ex vivo* con el pseudovirus NL4-3\_Renilla en presencia o ausencia de células NK CD56+ (proporción 1:1), las cuales se aislaron de los PBLs autólogos. Los linfocitos T CD4+ de los pacientes LMC en remisión cocultivados con células NK autólogas mostraron una reducción media de 2,2 veces en la integración del VIH-1, en comparación con los donantes sanos (p<0,001) (Figura 19A). La actividad citotóxica de

las NK se calculó mediante la relación entre las copias de ADN proviral integrado por millón de linfocitos T CD4+ infectadas de manera aislada y las copias de ADN proviral integrado por millón de linfocitos T CD4+ infectadas en presencia de NK. De acuerdo con este cálculo, la respuesta de NK desarrollada durante el tratamiento con ITK de los pacientes LMC en remisión y ausencia de tratamiento mostraron una actividad citotóxica frente a los linfocitos T CD4+ infectados por el VIH-1 media de 8,0 veces mayor, en comparación con los donantes sanos ( $p < 0,001$ ) (Figura 19B).

Figura 19

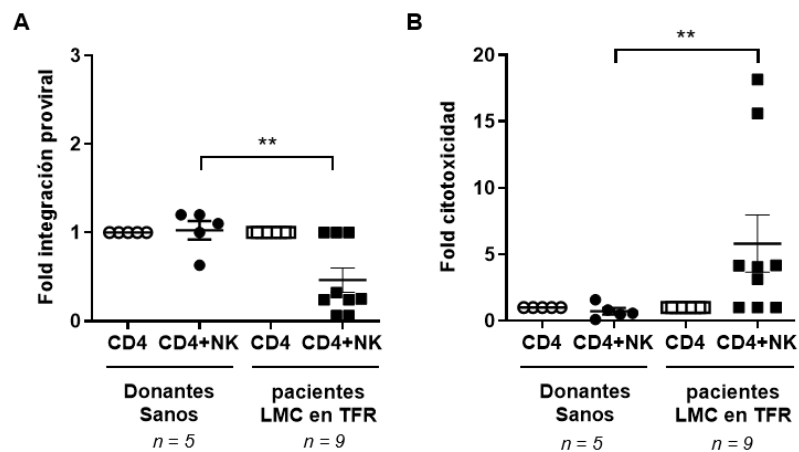


Figura 19. Efecto antiviral de las células NK de pacientes con LMC en ausencia de tratamiento y remisión de LMC contra la infección por VIH-1 ex vivo de linfocitos T CD4+ autólogos. (A) Fold de la integración proviral de VIH-1 en linfocitos T CD4+ aislados de pacientes con LMC en comparación con donantes sanos, en presencia o ausencia de células NK autólogas. (B) Fold de la actividad citotóxica de estas células NK. Cada punto corresponde a una única muestra y las líneas representan la media ± SEM. Los puntos sin rellenar corresponden a valores indetectables. La significancia estadística se calculó con el test Mann-Whitney. \*\*  $p < 0,01$ .

## Estudio 2. Disminución en el reservorio y reactivación del VIH en individuos infectados por VIH-1 en tratamiento con dasatinib y terapia antirretroviral

Referencia: Vigón L, Martínez-Román P, Rodríguez-Mora S, Torres M, Puertas MC, Mateos E, Salgado M, Navarro A, Sánchez-Conde M, Ambrosioni J, Cervero M, Wyen C, Hoffmann C, Miró JM, Alcamí J, Podzamczar D, García-Gutiérrez V, Martínez-Picado J, Briz V, Rosa López-Huertas M, Planelles V, Coiras M; Multidisciplinary Group of Study of HIV-1 Reservoir MGS-HIVRES. Provirus reactivation is impaired in HIV-1 infected individuals on treatment with dasatinib and antiretroviral therapy. *Biochem Pharmacol.* 2021 Oct;192:114666. doi: 10.1016/j.bcp.2021.114666. Epub 2021 Jun 26. PMID: 34186065; PMCID: PMC8478809.

### 2.1 Características de los individuos

Se trata de un estudio observacional, transversal, en el que los 59 individuos participantes clasificados en 4 cohortes.

Tres individuos infectados con el VIH-1 y diagnosticados posteriormente de LMC se reclutaron en el IHC Study Center (Hamburgo, Alemania) (Participante 33), el Hospital Universitario de Colonia (Colonia, Alemania) (Participante 34) y Hospital Universitario Severo Ochoa (Madrid, España) (Participante 35) (Tablas 6 y 7).

El participante 33 es un hombre caucásico de 47 años que fue diagnosticado de VIH-1 a sus 33 años y de LMC a sus 37. Estuvo en tratamiento con raltegravir, abacavir y lamivudina durante 9 años y posteriormente se simplificó a bicitegravir, emtricitabina y tenofovir (BIC/FTC/TAF). El ARN de VIH-1 llevaba siendo indetectable (<50 copias/ml) durante más de 9 años. Estuvo tratado con imatinib durante 9 años por su LMC y posteriormente cambió a dasatinib por intolerancia (fatiga, polineuropatía). En el momento de toma de muestra, llevaba en tratamiento con dasatinib 1 año y 3 meses, los niveles de CD4 eran 1014 células/ $\mu$ l y la relación CD4/CD8 era 1,6. Mantenía respuesta molecular frente a LMC de 4,0 (ratio BCR-ABL1/ABL1  $\leq$ 0,1%) y carga viral indetectable.

El participante 34 es un hombre caucásico de 59 años diagnosticado de VIH-1 a los 37 años y de LMC a los 58. Al diagnóstico de LMC estaba en tratamiento con zidovudina, rilpivirina y tenofovir (AZT/RPV + TDF) e inició bicitegravir, emtricitabina y tenofovir (BIC/FTC/TAF) cuando se le introdujo dasatinib 15 meses antes de la toma de muestra para evitar interacciones farmacológicas. Ningún otro ITK fue administrado. En el momento de la toma de muestra, los niveles de CD4 eran de 786 células/ $\mu$ l, la relación CD4/CD8 era de 0,3%, su respuesta molecular antileucémica era 3,0 (ratio BCR-ABL1/ABL1 <0,01%) y carga viral indetectable.

El participante 35 es un hombre caucásico de 52 años diagnosticado de VIH-1 a los 25 años y de LMC a los 42. Estuvo en tratamiento con dolutegravir y darunavir/cobicistat (DTG/DRC/c) y con imatinib durante 4 años. Debido a la poca adherencia a ambos fármacos, mostraba repuntes de viremia en plasma, bajos niveles de CD4 (178 células/ $\mu$ l, relación CD4/CD8 de 0,11) y fallo al tratamiento con imatinib. Como consecuencia, se introdujo dasatinib y llevaba 5 años y 3 meses de tratamiento con este fármaco en la primera toma de muestra. Debido a neumonía, discontinuó el tratamiento con dasatinib durante 5 meses y se introdujo nilotinib. Mantenía respuesta molecular antileucémica de 4,5-5,0 (ratio BCR-ABL1/ABL1 <0,0032%) desde entonces (2 años). Tenía carga viral indetectable en el momento de la toma de muestra.

Treinta y dos pacientes con infección crónica por VIH-1 y carga viral indetectable fueron también reclutados para este estudio y seguidos durante 1 año. Se seleccionaron en base a edad, sexo y TAR para emparejarlos con los individuos infectados con VIH y LMC. La media de tiempo en tratamiento con TAR fue similar a la de los pacientes tratados con TAR y dasatinib. La mayoría de los individuos eran varones (78%), la mediana de edad al diagnóstico de VIH-1 fue de 32 años (IQR 27 a 39) y la mediana de edad en el momento de toma de la muestra fue 44 años (IQR 37 a 54). La mayoría de las pautas de TAR (43,8%) consistían en uno o dos inhibidores de la transcriptasa inversa/inhibidores de nucleósido/nucleótido (INTI) y un inhibidor de la integrasa (IIN) con o sin cobicistat. La mediana de CD4 fue 906 células/ $\mu$ l (IQR 601,5 a 1137,4) y la mediana del cociente CD4/CD8 fue 0,9 (IQR 0,5 a 1,2). Las Tablas 5 y 6 muestran las características clínicas relevantes de estos individuos. Debido al limitado número de células aisladas por muestra, no todos los ensayos se realizaron en todos los pacientes.

Dieciocho individuos diagnosticados con LMC en fase crónica fueron también reclutados para este estudio. Todos ellos estaban en tratamiento con dasatinib y en remisión hematológica y citológica. La mayoría de los individuos eran mujeres (61%) y la mediana de edad al diagnóstico de LMC fue 52,0 años (IQR 40,5 a 57,5). 61% mostraron bajo riesgo Sokal y 66,7% tenían respuesta molecular profunda contra las células cancerosas a toma de muestra (ratio BCR-ABL1/ABL1  $\leq$  0,0032%). La mediana de tiempo en tratamiento con dasatinib fue de 2,5 años (IQR 0,5 a 4,0). Las tablas 6 y 7 muestran las características clínicas más relevantes de estos pacientes.

Dieciocho donantes sanos con similar distribución por sexo y edad se reclutaron como controles negativos.

Tabla 6. Resumen de las características de los pacientes incluidos en el Estudio 2

|  | TAR + dasatinib                        | TAR  | dasatinib              |
|--|--|--|------------------------|
| <b>Individuos</b>                          | 3                                      | 32   | 18                     |
| <b>Hombre/mujer</b>                        | 3/0                                    | 25/7   | 7/11                   |
| <b>Mediana edad diagnóstico VIH (años)</b> | 33,0 (IQR 25,0 a 37,0)                 | 32,0 (IQR 26,5 a 39,0)   | N/A                    |
| <b>Mediana edad diagnóstico LMC (años)</b> | 42,0 (IQR 37,0 a 58,0)                 | N/A  | 52,0 (IQR 40,5 a 57,5) |
| <b>Mediana ratio CD4/CD8</b>               | 0,3 (IQR 0,11 a 1,6)                   | 0,9 (IQR 0,5 a 1,2)  | N/A                    |
| <b>Mediana número CD4 (células/ml)</b>     | 786,0 (IQR 178,0 to 1.014,0)           | 906 (IQR 601,5 a 1.137,4)  | N/A                    |
| <b>TAR (n)</b>                             | 2 INTI, 1 IIN (2)<br>1 IIN, 1 IP/c (1) | 2 INTI, 1 IIN (8)<br>2 INTI, 1 INNTI (10)<br>2 INTI, 1 IIN /c (5)<br>1 INTI, 1 IIN (1)<br>2 INTI, 1 IP/c (4)<br>2 INTI, 1 IP (1)<br>1 INTI, 1 IP (1)<br>1 IP/c (1)<br>2 INTI, 1 IP 1 IIN/c (1) | N/A                    |
| <b>Riesgo Sokal (A/Int/B/Indet) (n)</b>    | 0/1/0/2                                | N/A  | 11/4/3/0               |
| <b>Respuesta a toma muestra (n)</b>        | <b>RCC</b>                             | 0  | N/A                    |
|  | <b>RMM</b>                             | 1  | N/A                    |
|  | <b>RMP</b>                             | 2  | N/A                    |

A: Alto; B: Bajo; c: cobicitat; Indet: Indeterminado; IIN: Inhibidor de la integrasa; Int: Intermedio; INTI: Inhibidor de la transcriptasa inversa de tipo nucleósido; INNTI: Inhibidor de la transcriptasa inversa de tipo no nucleósido; IP: Inhibidor de la proteasa; IQR; Rango intercuartílico; N/A: No aplica; RCC: Respuesta Citogenética Completa; RMM: Respuesta Molecular Mayor; RMP: Respuesta Molecular Profunda.



Tabla 7. Características más relevantes de los pacientes incluidos en el Estudio 2

|     | Código | Género (H/M) | Edad diagnóstica infección VIH-1 (años) | Edad diagnóstica LMC (años) | Nadir CD4 | CD4 /mm <sup>3</sup> | Ratio CD4/CD8 | TAR               | Riesgo Sokal | Respuesta molecular (log) | Exposición previa a dasatinib (S/N, cuál) | Tiempo en tratamiento con dasatinib (meses) |
|-----|--------|--------------|---|-----------------------------|-----------|----------------------|---------------|-------------------|--------------|---------------------------|---|---|
| TAR | 1      | H            | 40                                      | N/A                         | 618,8     | 840,1                | 1,2           | 3TC/ABC/DTG       | N/A          | N/A                       | N/A                                       | N/A   |
|     | 2      | H            | 40                                      | N/A                         | 252,2     | 346,5                | 0,4           | 3TC/ABC/DTG       | N/A          | N/A                       | N/A                                       | N/A   |
|     | 3      | H            | Indet                                   | N/A                         | Indet     | 793,0                | 0,5           | BIC/FTC/TAF       | N/A          | N/A                       | N/A                                       | N/A   |
|     | 4      | H            | 39                                      | N/A                         | 123,1     | Indet                | Indet         | BIC/FTC/TAF       | N/A          | N/A                       | N/A                                       | N/A   |
|     | 5      | H            | 47                                      | N/A                         | 534,6     | 815,1                | 1,5           | BIC/FTC/TAF       | N/A          | N/A                       | N/A                                       | N/A   |
|     | 6      | H            | 42                                      | N/A                         | 722,5     | Indet                | 0,5           | 3TC/DTG           | N/A          | N/A                       | N/A                                       | N/A   |
|     | 7      | H            | Indet                                   | N/A                         | 142,8     | 458,5                | 0,5           | DRV/c             | N/A          | N/A                       | N/A                                       | N/A   |
|     | 8      | H            | 15                                      | N/A                         | 478,2     | 1.097,4              | 1,0           | BIC/FTC/TAF       | N/A          | N/A                       | N/A                                       | N/A   |
|     | 9      | H            | 25                                      | N/A                         | 388,0     | 1.250,0              | Indet         | EVG/FTC/TDF/c     | N/A          | N/A                       | N/A                                       | N/A   |
|     | 10     | H            | 22                                      | N/A                         | 313,0     | 1.108,0              | Indet         | EVG/FTC/TDF/c     | N/A          | N/A                       | N/A                                       | N/A   |
|     | 11     | H            | 47                                      | N/A                         | 530,0     | 1.462,0              | Indet         | 3TC/ABC/RPV       | N/A          | N/A                       | N/A                                       | N/A   |
|     | 12     | H            | 24                                      | N/A                         | 336,0     | 559,0                | Indet         | 3TC/ABC/DTG/DRV/c | N/A          | N/A                       | N/A                                       | N/A   |
|     | 13     | H            | 31                                      | N/A                         | 292,0     | 763,0                | Indet         | EFV/FTC/TDF       | N/A          | N/A                       | N/A                                       | N/A   |
|     | 14     | M            | 24                                      | N/A                         | Indet     | 979,2                | Indet         | EVG/FTC/TDF/c     | N/A          | N/A                       | N/A                                       | N/A   |
|     | 15     | M            | 32                                      | N/A                         | 91,0      | 969,0                | Indet         | FTC/LOP/r         | N/A          | N/A                       | N/A                                       | N/A   |
|     | 16     | M            | 37                                      | N/A                         | 283,0     | 1.240,0              | 1,2           | 3TC/ABC/NVP       | N/A          | N/A                       | N/A                                       | N/A   |
|     | 17     | H            | 27                                      | N/A                         | 90,0      | 832,0                | 1,3           | DRV/FTC/TDF/c     | N/A          | N/A                       | N/A                                       | N/A   |
|     | 18     | H            | 32                                      | N/A                         | 144,0     | 669,0                | 0,9           | EVG/FTC/TAF/c     | N/A          | N/A                       | N/A                                       | N/A   |
|     | 19     | M            | 29                                      | N/A                         | 167,0     | 1.098,0              | 1,5           | 3TC/ABC/NVP       | N/A          | N/A                       | N/A                                       | N/A   |
|     | 20     | H            | 31                                      | N/A                         | Indet     | 892,0                | 1,1           | 3TC/ABC/DTG       | N/A          | N/A                       | N/A                                       | N/A   |
|     | 21     | H            | 43                                      | N/A                         | 510,0     | 920,0                | 1,1           | 3TC/ABC/NVP       | N/A          | N/A                       | N/A                                       | N/A   |
|     | 22     | M            | 37                                      | N/A                         | 363,0     | 2.134,0              | 2,4           | 3TC/ABC/DTG       | N/A          | N/A                       | N/A                                       | N/A   |
|     | 23     | H            | 35                                      | N/A                         | 521,0     | 1.081,0              | 0,4           | FTC/RPV/TDF       | N/A          | N/A                       | N/A                                       | N/A   |
|     | 24     | H            | 38                                      | N/A                         | Indet     | 1.380,0              | 0,6           | 3TC/ABC/DRV/c     | N/A          | N/A                       | N/A                                       | N/A   |
|     | 25     | M            | 22                                      | N/A                         | Indet     | 579,0                | 0,4           | DRV/FTC/TDF/c     | N/A          | N/A                       | N/A                                       | N/A   |
|     | 26     | H            | 23                                      | N/A                         | 268,0     | 609,0                | 0,7           | 3TC/ABC/DTG       | N/A          | N/A                       | N/A                                       | N/A   |
|     | 27     | H            | 36                                      | N/A                         | 490,0     | 1.099,0              | 1,2           | EFV/FTC/TDF       | N/A          | N/A                       | N/A                                       | N/A   |
|     | 28     | H            | 28                                      | N/A                         | 245,0     | 484,0                | Indet         | DRV/FTC/TAF/c     | N/A          | N/A                       | N/A                                       | N/A   |
|     | 29     | M            | 31                                      | N/A                         | Indet     | 1.368,0              | Indet         | 3TC/ABC/ATV       | N/A          | N/A                       | N/A                                       | N/A   |
|     | 30     | H            | 39                                      | N/A                         | 209,0     | 1.225,6              | Indet         | 3TC/ABC/RPV       | N/A          | N/A                       | N/A                                       | N/A   |

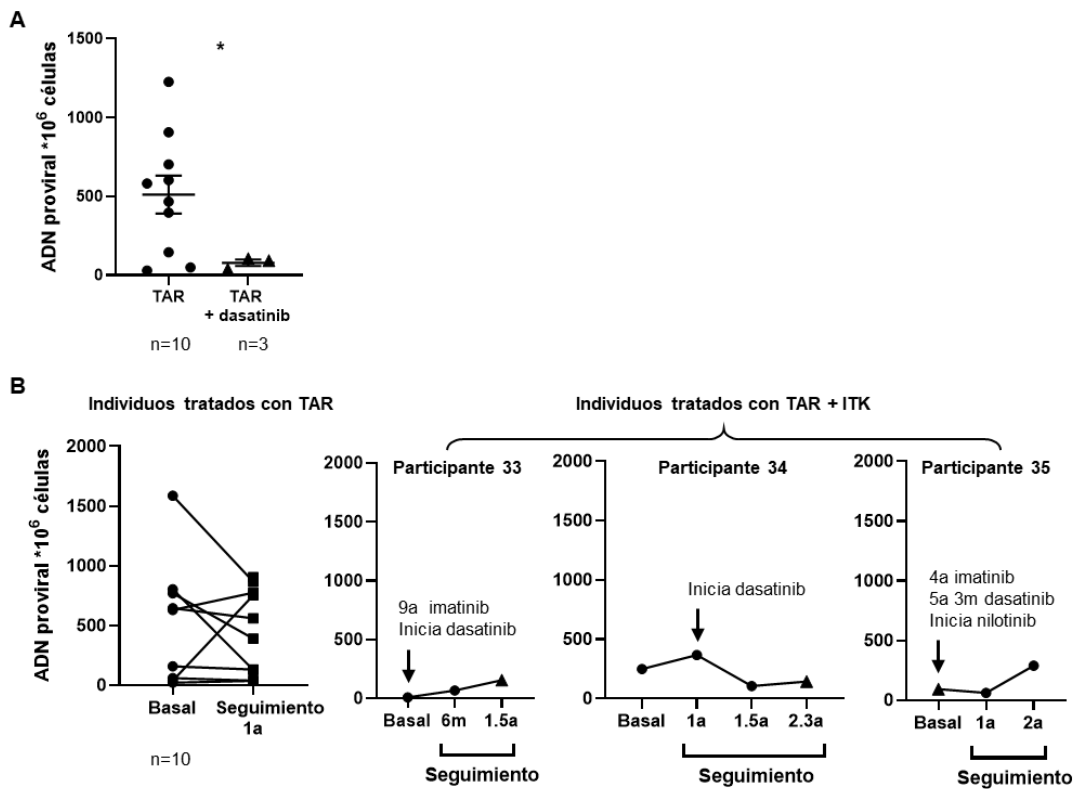
|               |    |     |     |     |        |         |       |               |         |     |                                 |     |
|---------------|----|-----|-----|-----|--------|---------|-------|---------------|---------|-----|---------------------------------|-----|
|               | 31 | H   | 37  | N/A | 349,0  | 540,0   | Indet | EVG/FTC/TDF/c | N/A     | N/A | N/A                             | N/A |
|               | 32 | H   | 31  | N/A | 258,0  | 518,0   | Indet | FTC/RPV/TDF   | N/A     | N/A | N/A                             | N/A |
| TAR+dasatinib | 33 | H   | 33  | 37  | 563,0  | 1.014,0 | 1,6   | BIC/FTC/TAF   | Indet   | 5   | Imatinib                        | 15  |
|               | 34 | H   | 37  | 58  | <200,0 | 786,0   | 0,3   | BIC/FTC/TAF   | Alto    | 3   | N                               | 16  |
|               | 35 | H   | 25  | 42  | 77,0   | 178,0   | 0,11  | DTG/DRV/c     | Interm. | 4,5 | Imatinib                        | 63  |
| Dasatinib     | 36 | M   | N/A | 49  | N/A    | N/A     | N/A   | N/A           | Bajo    | 4   | Imatinib                        | 30  |
|               | 37 | M   | N/A | 27  | N/A    | N/A     | N/A   | N/A           | Bajo    | 4,5 | Imatinib, dasatinib, ponatinib  | 10  |
|               | 38 | H   | N/A | 55  | N/A    | N/A     | N/A   | N/A           | Bajo    | 3   | Imatinib, bosutinib             | 30  |
|               | 39 | M   | N/A | 41  | N/A    | N/A     | N/A   | N/A           | Bajo    | N   | Imatinib, nilotinib, dasatinib. | 1   |
|               | 40 | H   | N/A | 24  | N/A    | N/A     | N/A   | N/A           | Bajo    | 3   | N                               | 84  |
|               | 41 | M   | N/A | 57  | N/A    | N/A     | N/A   | N/A           | Interm. | 3   | Nilotinib                       | 35  |
|               | 42 | M   | N/A | 59  | N/A    | N/A     | N/A   | N/A           | Bajo    | 4   | N                               | 30  |
|               | 43 | M   | N/A | 57  | N/A    | N/A     | N/A   | N/A           | Bajo    | 3   | Imatinib                        | 72  |
|               | 44 | H   | N/A | 39  | N/A    | N/A     | N/A   | N/A           | Alto    | N   | Nilotinib                       | 1   |
|               | 45 | M   | N/A | 56  | N/A    | N/A     | N/A   | N/A           | Alto    | 5   | N                               | 48  |
|               | 46 | M   | N/A | 55  | N/A    | N/A     | N/A   | N/A           | Alto    | 5   | N                               | 4.5 |
|               | 47 | H   | N/A | 43  | N/A    | N/A     | N/A   | N/A           | Bajo    | 4,5 | N                               | 12  |
|               | 48 | H   | N/A | 44  | N/A    | N/A     | N/A   | N/A           | Interm. | 4,5 | Imatinib                        | 84  |
|               | 49 | M   | N/A | 60  | N/A    | N/A     | N/A   | N/A           | Interm. | 5   | N                               | 12  |
|               | 50 | M   | N/A | 43  | N/A    | N/A     | N/A   | N/A           | Bajo    | 5   | Imatinib, nilotinib             | 42  |
|               | 51 | M   | N/A | 59  | N/A    | N/A     | N/A   | N/A           | Interm. | 5   | Dasatinib                       | 12  |
|               | 52 | H   | N/A | 72  | N/A    | N/A     | N/A   | N/A           | Bajo    | 4   | N                               | 48  |
| 53            | H  | N/A | 26  | N/A | N/A    | N/A     | N/A   | Bajo          | 5       | N   | 80                              |     |

H: Hombre; Indet: Indeterminado; Interm: Intermedio; M: Mujer; N: No; N/A: No aplica.

## 2.2 Cuantificación de la integración proviral de VIH-1

La frecuencia de células infectadas con VIH-1 en aquellos individuos tratados con TAR o TAR y dasatinib se cuantificó por dPCR. Siendo el tiempo de tratamiento con TAR similar en ambos grupos, la integración proviral fue de media 5,7 veces menor en individuos tratados con dasatinib ( $p < 0,05$ ) (Figura 20A). Se realizó un seguimiento de hasta dos años en los individuos en tratamiento con TAR y dasatinib para analizar los cambios en el ADN proviral. No se observaron cambios significativos entre muestras (Figura 20B).

Figura 20



**Figura 20. El tratamiento con TAR y dasatinib redujo la frecuencia de células latentemente infectadas.** (A) Cuantificación por dPCR del ADN proviral por millón de células de PBLs de individuos infectados con VIH-1 en tratamiento con TAR y dasatinib (Participantes 33, 34 y 35) en comparación con individuos tratados solo con TAR. (B) Seguimiento de los pacientes indicados anteriormente, resaltando la muestra representada en el gráfico A de los participantes 33, 34 y 35 (triángulo negro) y los individuos tratados solo con TAR (círculo negro). Cada punto corresponde a una única muestra y las líneas representan la media  $\pm$  SEM. Los puntos sin rellenar corresponden a valores indetectables. La significancia estadística se calculó con el test Mann-Whitney. \* $p < 0,05$ .

## 2.3 Efecto del dasatinib en la reactivación del VIH-1 *in vitro* y *ex vivo*

Con el objetivo de determinar si la presencia de dasatinib interfería con la reactivación *in vitro* del provirus del reservorio de individuos infectados con VIH-1, los linfocitos T CD4<sup>+</sup> aislados de los PBLs de pacientes tratados con TAR se activaron durante 7 días con  $\alpha$ -CD3/CD28 e IL-2

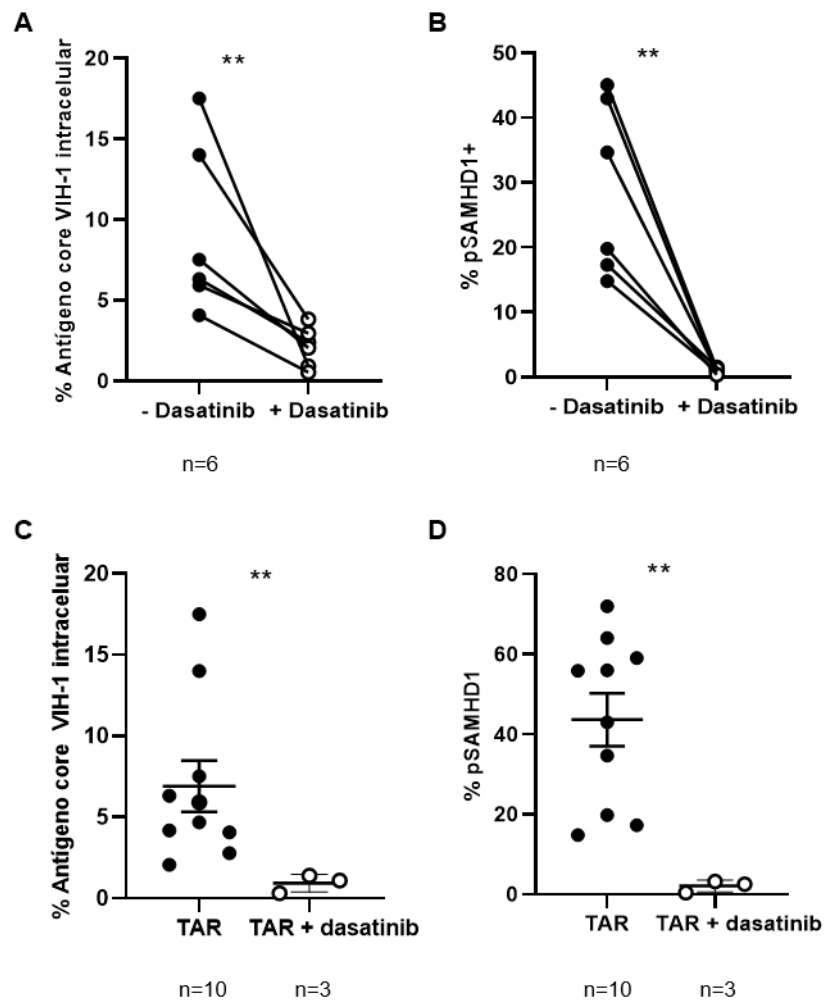
en presencia (+) o ausencia (-) de dasatinib en el medio. La reactivación del provirus se indujo con el tratamiento de PMA e inomicina durante 18 horas en presencia de brefeldina A para evitar la salida de proteínas virales al medio de cultivo. La pureza de los linfocitos T CD4+ fue del 98%. El tratamiento previo *in vitro* con dasatinib redujo de media 4,4 veces la producción de antígenos del core de VIH-1 del reservorio viral ( $p < 0,01$ ) (Figura 21A). La fosforilación de SAMHD1 se redujo de media más de 30 veces ( $p < 0,01$ ) en los linfocitos T CD4+ cuando se añadió dasatinib al medio de cultivo antes de poner el estímulo activador (Figura 21B).

El efecto *in vivo* de dasatinib en la reactivación de provirus se analizó en los linfocitos T CD4+ aislados de los PBLs de los pacientes VIH+ con LMC en tratamiento con TAR y dasatinib, y se comparó con la reactivación proviral de los linfocitos T CD4+ aislados de los PBLs de los pacientes infectados con VIH-1 con TAR. Los linfocitos T CD4+ fueron activados durante 7 días con CD3/CD28/IL-2. La producción de antígenos del core de VIH-1 del reservorio viral se redujo de media 7,3 veces ( $p < 0,01$ ) en los linfocitos T CD4+ de los individuos tratados con TAR y dasatinib (Figura 21C). El tratamiento *in vivo* con dasatinib disminuyó drásticamente la fosforilación de SAMHD1 en los linfocitos T CD4+, que se redujo de media más de 21 veces en los individuos tratados con TAR y dasatinib ( $p < 0,01$ ) (Figura 21D), respecto a los tratados solo con TAR.

#### 2.4 Cuantificación de provirus intactos

Nuestro grupo ha descrito previamente el potente efecto citostático de dasatinib en los linfocitos T CD4+ que no podían activarse tras la estimulación mediada por TCR o por la proliferación homeostática inducida por citoquinas (81, 182). Sin embargo, la posibilidad de que dasatinib también pudiera interferir en la capacidad replicativa de los virus integrados debido a una mayor actividad sobre provirus no defectivos fue analizada. Así, la proporción de provirus intactos se evaluó por ensayo de ADN proviral intacto (*Intact Provirus DNA Assay*, IPDA) en los individuos 33 y 34 en comparación con aquellos individuos tratados solo con TAR que tenían niveles similares de provirus integrado (Figura 22A). Este análisis no se realizó en el paciente 35 debido a la escasez de muestra. No se encontraron diferencias significativas en la proporción de provirus intactos en el reservorio de los pacientes tratados con TAR y dasatinib en comparación con los individuos tratados solo TAR (Figura 22A). Los niveles de hipermutados 3´deleccionados y 5´deleccionados estaba ligeramente aumentado en el paciente 33, quien había estado en tratamiento con imatinib más de 9 años y luego con dasatinib durante 1,25 años, en comparación con el paciente 34, quien había estado tratado con dasatinib durante 1,3 años (Figura 22B y 22C).

Figura 21



**Figura 21. El tratamiento con dasatinib interfirió eficientemente con la reactivación del VIH-1 mediada por la activación del TCR.** La síntesis de antígenos del core de VIH-1 (A) y la fosforilación de SAMHD1 (B) se cuantificó mediante citometría de flujo en los linfocitos T CD4+ aislados de los PBLs de individuos infectados con VIH-1 en tratamiento con TAR después de la activación con bolas magnéticas antiCD3/CD28/IL-2 durante 7 días en presencia (+) o ausencia (-) de dasatinib en el medio de cultivo. La síntesis de antígenos de core de VIH-1 (C) y la fosforilación de SAMHD1 también se cuantificaron mediante citometría de flujo en los linfocitos T CD4+ aislados de los PBLs de individuos infectados en tratamiento solo con TAR o con TAR + dasatinib (Participantes 33, 34 y 35), después de la activación con bolas magnéticas antiCD3/CD28/IL-2 durante 7 días. Cada punto corresponde a una única muestra y las líneas representan la media  $\pm$  SEM. Los puntos sin rellenar corresponden a valores indetectables. La significancia estadística se calculó con el test Mann-Whitney. **\*\*** $p < 0,01$ .

Figura 22

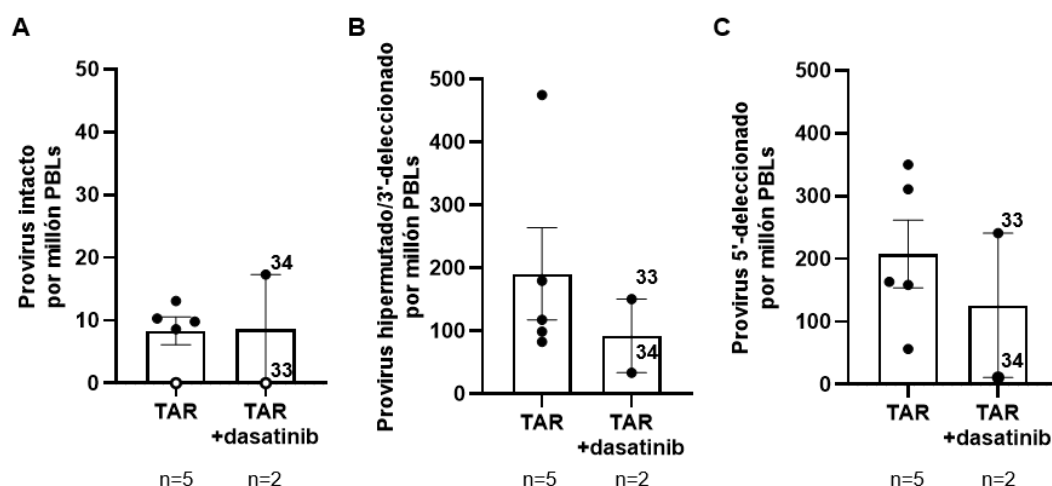


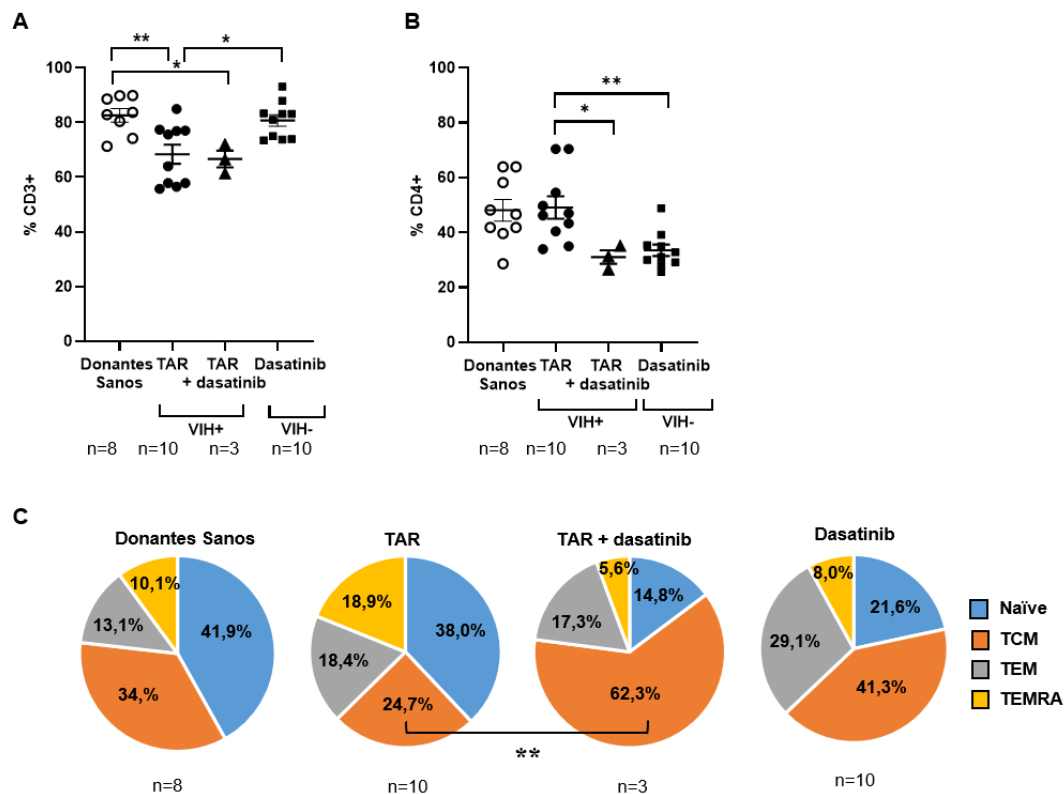
Figura 22. El tratamiento con dasatinib no cambió significativamente la proporción de provirus VIH-1 intactos y defectivos en PBLs de los individuos 33 y 34. La proporción de provirus intactos (A), hipermutados/3'deleccionados (B) y 5'deleccionados (C) por millón de células se evaluó por IPDA en los PBLs de los individuos 33 y 34 en comparación con individuos infectados con VIH-1 tratados solo con TAR. Cada punto corresponde a una única muestra y las líneas representan la media  $\pm$  SEM. Los puntos sin rellenar corresponden a valores indetectables. La significancia estadística se calculó con el test Mann-Whitney.

## 2.5 Distribución de las subpoblaciones de linfocitos T CD4+

Los niveles totales de los linfocitos CD3+ no se vieron afectados significativamente por el tratamiento con dasatinib en los individuos infectados con VIH-1 (Figura 24A). Sin embargo, los niveles de linfocitos T CD4+ estaban reducidos de media 1,6 veces en los individuos tratados con dasatinib, tanto en tratamiento con TAR ( $p < 0,05$ ) como solo con dasatinib ( $p < 0,01$ ) (Figura 23B). Esta linfopenia de CD4+ se había descrito anteriormente en el tratamiento con dasatinib, y de acuerdo con esto, nosotros observamos los mismos niveles de CD4+ en aquellos individuos con LMC tratados con dasatinib ( $p < 0,01$ ). A pesar de los bajos niveles de CD4+, los niveles totales de CD3+ estaban aumentados en los pacientes con LMC en comparación con los pacientes infectados con VIH-1. (Figura 23A).

El tratamiento con dasatinib aumentó de media 2,5 veces la proporción de linfocitos T CD4+ de memoria central (TCM) en los pacientes infectados con VIH+ en tratamiento con TAR y dasatinib (62,8%), en comparación con los individuos tratados solo con TAR (24,7%) ( $p < 0,01$ ) (Figura 23C). Contrariamente, los niveles de linfocitos T CD4+ memoria efectora terminal (TEMRA) estaban de media reducidos 3,3 veces en estos individuos. Los linfocitos T CD4+ naïve estaban reducidos 2,5 veces en los individuos tratados con TAR y dasatinib en comparación con los individuos infectados con VIH-1 y tratados con TAR.

Figura 23



**Figure 23. El tratamiento con dasatinib modificó la distribución de las subpoblaciones de linfocitos T CD4+ en los individuos infectados con VIH-1.** La proporción de linfocitos CD3+ (A) y CD4+ (B) en PBLs de individuos infectados con VIH-1 solo tratados con TAR o con TAR + dasatinib (individuos 33, 34 y 35) se compararon con los niveles de individuos VIH negativos con LMC en tratamiento con dasatinib y donantes sanos. (C) La distribución de las subpoblaciones de linfocitos T CD4+ en PBLs aislados de estos cuatro grupos de individuos se determinó mediante citometría de flujo usando los anticuerpos CCR7 y CD45RA. Cada punto representa un único valor y las líneas representan SEM. La significancia estadística se calculó usando ANOVA one-way. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ .

## 2.6 Efecto del dasatinib en los niveles de las citoquinas homeostáticas en plasma

Los individuos infectados con VIH-1 tratados con TAR y dasatinib mostraron una reducción media de 2,3 veces de los niveles de IL-7 en plasma en comparación con los individuos tratados solo con TAR (Figura 24A). Los niveles plasmáticos de IL-21 e IL-15 estaban reducidos de media 1,7 y 1,6 veces, respectivamente (Figura 24B y 24C), mientras que los niveles de IL-2 no mostraron cambios entre ambos grupos (Figura 24D).

Figura 24

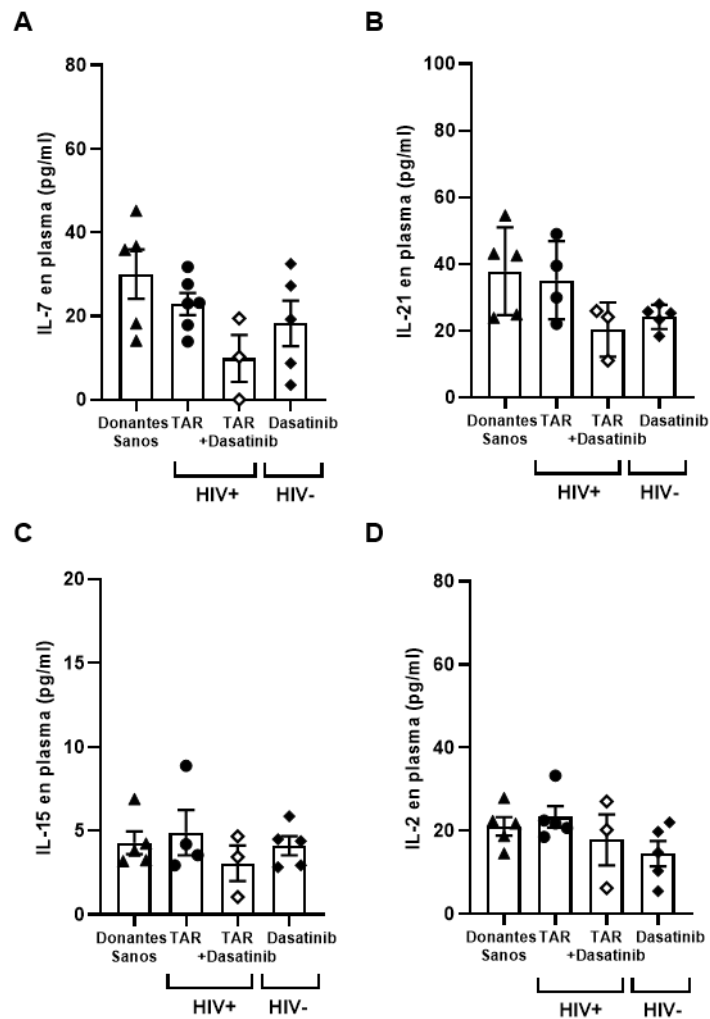


Figure 24. El tratamiento con dasatinib modificó los niveles de citoquinas homeostáticas en plasma en los individuos infectados por VIH-1. Los niveles plasmáticos de IL-7 (A), IL-21 (B), IL-15 (C) e IL-2 (D) de individuos infectados por VIH-1 y tratados con TAR o TAR + dasatinib (individuos 33, 34 y 35) se analizaron por Luminex y se compararon con los niveles de individuos VIH negativos con LMC en tratamiento con dasatinib y donantes sanos. Cada punto corresponde a un único valor y las líneas representan la media  $\pm$  SEM. La significancia estadística se calculó usando el test Mann-Whitney.



# DISCUSIÓN

La infección por el VIH-1 es actualmente incurable debido a la formación y mantenimiento de reservorios que albergan provirus competentes con capacidad de replicación. Se ha descrito que la tasa de disminución de provirus intactos es más rápida que la de provirus defectivos (199), estimándose que más del 88% de los provirus que conforman el reservorio viral son defectivos (200). Sin embargo, la presencia de una pequeña parte de provirus intactos en la mayoría de los sujetos infectados con VIH-1 es suficiente para producir repuntes de viremia en ausencia de TAR (128, 201, 202). Esto es debido a la existencia de distintos mecanismos de persistencia viral como la latencia de provirus intactos en los linfocitos T CD4+ de larga vida y otros tipos celulares, la replicación a bajo nivel en presencia de TAR, la proliferación homeostática inducida por  $\gamma$ C-citoquinas IL-2 o IL-7 o la proliferación antígeno dependiente vía TCR. Estos mecanismos hacen que el reservorio sea muy dinámico, y a pesar de que el tratamiento temprano con TAR permite mantener la integridad del sistema inmune, es incapaz de impedir la formación del reservorio. Esta formación ocurre en etapas muy tempranas de la infección, incluso antes de ser la viremia detectable (62). En este sentido, con el objetivo de combatir los diferentes mecanismos de persistencia viral y destruir el reservorio, nuevas estrategias, hasta ahora sin éxito total en ninguna de ellas, se están desarrollando en laboratorios de todo el mundo.

El tratamiento temprano en las primeras etapas de la infección ha permitido mantener la viremia indetectable durante largos períodos de tiempo, aunque la suspensión del tratamiento se asocia con un repunte de la viremia (127, 128). El uso de bNAbs como inmunoterapia ha supuesto una estrategia útil como prevención, terapia y cura. Sin embargo, la necesidad de una combinación de dos o más bNAbs para evitar las mutaciones de resistencia, el coste y la dificultad para realizar estos tratamientos en un número elevado de pacientes llevan a la necesidad de buscar nuevos abordajes (141). Por otro lado, la estrategia *block and lock* es capaz de simular el estado natural de latencia profunda permitiendo alcanzar la cura funcional. Sin embargo, algunos agentes capaces de promover la latencia tienen como diana proteínas virales por lo que podrían desarrollarse mutaciones de resistencia a dichos fármacos (111). Adicionalmente, la estrategia conocida como *shock and kill* ha resultado bastante prometedora. La mayoría de los LRAs han mostrado su eficacia revirtiendo la latencia, aunque no han sido capaces de inducir el *killing* debido a la ausencia de una respuesta inmune potente y eficaz (203, 204). Por lo tanto, siguen siendo necesarias nuevas estrategias capaces de potenciar la respuesta inmune citotóxica, y permitan destruir aquellas células con provirus reactivado y eliminar el reservorio viral.

Anteriormente hemos descrito que los PBLs de pacientes con LMC en tratamiento con ITKs son altamente resistentes a la infección *ex vivo* por VIH-1 (81, 205), principalmente debido a la capacidad de los ITKs de interferir con la fosforilación de SAMHD1 (205, 206). Además, los ITKs podrían también interferir con la activación y proliferación mediada por  $\gamma$ c-citoquinas como IL-2 o IL-7 (182). En base a esto, dasatinib podría actuar sobre el establecimiento y persistencia de los reservorios del VIH a distintos niveles. Por una parte, podría ser útil evitando la formación del reservorio de VIH-1 cuando se administra de manera pre-exposición (187). Por otra parte, su efecto inhibitorio de la proliferación de los linfocitos T podría afectar al mantenimiento y expansión del reservorio viral, actuando como un LPA, pero este punto no ha sido demostrado en pacientes con infección crónica por VIH. Por último, ITKs como imatinib o dasatinib podrían también actuar como inmunomoduladores capaces de inducir una potente respuesta citotóxica no sólo contra las células cancerosas (207-209) sino frente los linfocitos infectados por el VIH.

En el primer estudio descrito en esta tesis determinamos que los linfocitos T CD4+ aislados de pacientes con LMC que discontinuaron el tratamiento un año antes del estudio recuperan la capacidad de ser activados y proliferar en respuesta a estímulos como PHA y la  $\gamma$ c-citoquina IL-2. Esta recuperación indica que la inmunosupresión inducida por los ITKs se restaura tras retirar el tratamiento. Sin embargo, estos linfocitos T CD4+ mostraron resistencia a la infección *ex vivo* por VIH-1, que no es debido a una fosforilación disminuida de SAMHD1 ya que se encontró incrementada en pacientes con LMC en comparación con el grupo control. Además, en este estudio analizamos si la potente respuesta antileucémica desarrollada durante el tratamiento con ITKs en pacientes con LMC podría tener un papel antiviral frente al VIH-1, al igual que ocurre con otros virus, como CMV (210, 211). En algunos pacientes con LMC que han estado en tratamiento con ITKs y mantenido RMP durante al menos 2 años es posible y seguro interrumpir el tratamiento, indicando la existencia de una respuesta inmune de memoria frente a las células tumorales. Estas respuestas antileucémicas podrían también estar dirigidas contra células infectadas con virus, abriendo la posibilidad de generar y aplicar estas respuestas citotóxicas contra infecciones virales crónicas, como la infección por VIH-1. En este sentido, las células NK son un componente del sistema inmune innato (212) que desempeñan un importante papel antitumoral y antiviral (213, 214). Esto permite postular que los avances realizados con inmunomoduladores frente al cáncer podrían ser ampliables a las infecciones virales. En concreto, los ITKs han mostrado su papel inmunomodulador en el control de la LMC potenciando la proliferación de células LGLs de fenotipo citotóxico, a la vez que inducen un potente efecto citostático en los linfocitos T CD4+ (173, 205). De hecho, el

30% de los pacientes tratados con dasatinib desarrollan por expansión clonal linfocitos T citotóxicos y células NK que rápidamente controlan las células leucémicas, haciendo que el tratamiento sea muy exitoso en estos pacientes (210, 215, 216). Más allá de esto, la expansión de los LGLs con capacidad de memoria durante el tratamiento con ITKs parece ser dirigida por la infección por CMV incluso en ausencia de viremia (211, 217). Encontramos que todos los pacientes con LMC reclutados para el estudio 1 eran seropositivos para CMV. Esto podría indicar que la existencia de CMV en células de pacientes con LMC en tratamiento con los ITKs podría inducir una potente respuesta inmune no sólo contra las células leucémicas sino frente a células infectadas por el virus. Esta respuesta inmune podría mantenerse debido a la generación de una respuesta de memoria, basada principalmente en células NK CD3-CD56+CD57+ y linfocitos T CD8 $\pm$ TCR $\gamma\delta$ . Ambas poblaciones de células estaban aumentadas en los pacientes LMC en ausencia del tratamiento. Además de la destrucción de células infectadas, estas células serían capaces de proteger a los linfocitos T CD4+ de la infección *ex vivo* por VIH-1 al disminuir la infectividad de los linfocitos T CD4+ cuando fueron infectados en presencia de células NK. En este sentido, los ITKs serían capaces de inducir una potente respuesta citotóxica, equiparable a la observada en los pacientes controladores de élite aunque no estaría mediada por linfocitos CD8 $\alpha\beta$  sino por NK y linfocitos  $\gamma\delta$ . (105, 218).

En el segundo objetivo de la tesis analizamos el efecto *in vivo* del dasatinib sobre el reservorio del VIH-1 en tres individuos (paciente 33, 34 y 35) en tratamiento con TAR y dasatinib. Los individuos infectados con VIH-1 que desarrollan LMC y están en tratamiento con TAR e ITKs son una cohorte especial de pacientes, por lo que la dificultad para reclutar pacientes debido a la baja incidencia de infección por VIH-1 y LMC en un mismo individuo es una importante limitación del estudio. Estos tres pacientes tenían menor cantidad de provirus integrado que el grupo control de pacientes infectados por VIH-1 en tratamiento TAR. Además, el reservorio del paciente 33, que había estado en tratamiento con imatinib durante 9 años y después con dasatinib durante 1,25 años, tenía niveles indetectables de provirus intacto y más altos niveles de provirus defectivos que el paciente 34, el cual llevaba en tratamiento con dasatinib como fármaco de primera línea durante 1,3 años. Durante el seguimiento que se realizó, la frecuencia de células infectadas latentemente del paciente 34 disminuyó a niveles muy bajos después de 5 meses de tratamiento con dasatinib, mientras que el tamaño del reservorio del paciente 35 aumentó al año de cambiar dasatinib por nilotinib. Así, el largo tratamiento con ITKs parece tener un efecto positivo sobre la reducción del tamaño del reservorio, siendo la combinación imatinib y dasatinib la que mostró mejores resultados.

Similar a lo observado en el reservorio de los pacientes infectados con VIH-1 tratados con TAR e ITKs, menor reservorio y número de provirus intactos han sido previamente descritos en pacientes controladores de élite (31). Sin embargo, niveles indetectables de provirus intactos, como lo observado en el paciente 33, únicamente han sido descritos en casos excepcionales de controladores de élite y en sujetos trasplantados con células madre procedentes de un donante con la mutación de resistencia a la infección CCR5 $\Delta$ 32 (219).

Tras ver que el tamaño del reservorio era menor, nos planteamos si era posible la reactivación de provirus mediada por la activación del TCR, al menos en los PBLs del participante 34, debido a la presencia de provirus intactos. Sin embargo, aunque el reservorio latente de los PBLs de los individuos tratados con TAR e ITKs era detectable, no pudo reactivarse *in vitro* en respuesta a una potente activación mediada por el TCR e IL-2. Esto podría deberse al potente efecto citostático inducido por el dasatinib, reflejado también en los bajos niveles de pSAMHD1 y en la activación defectiva de factores transcripcionales como NK- $\kappa$ B (182) como ha sido descrito previamente (205).

Sin embargo, otros mecanismos podrían estar involucrados en el efecto del dasatinib sobre el tamaño del reservorio del VIH-1 observado en estos individuos, pues el tratamiento con dasatinib disminuye los niveles totales de provirus integrado, tanto intacto como defectivo. Previamente, nuestro grupo describió que los linfocitos T CD4<sup>+</sup> de individuos tratados con dasatinib no son capaces de responder a la proliferación homeostática inducida por IL-7 (81). Esta interferencia con la proliferación de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> no afectó a la viabilidad de las células, pero debido al potente efecto antiproliferativo, podría interferir con el mantenimiento del reservorio, y, por consiguiente, contribuir a la disminución del tamaño del reservorio. Más allá de esto, el tratamiento con dasatinib mostró una tendencia a disminuir los niveles de IL-7 *in vivo* en aquellos individuos tratados con TAR y dasatinib, aunque no se alcanzó significación estadística debido a la dispersión de datos. Es de destacar que el paciente 33 (imatinib durante 9 años y cambió a dasatinib) tenía los niveles más bajos de IL-7 en correlación con los niveles indetectables de provirus intacto. Estos datos sugieren, al igual que otros estudios previos publicados por nuestro laboratorio, que dasatinib interfiere con los mecanismos de proliferación homeostática (182).

El dasatinib también afecta a la distribución de las subpoblaciones de linfocitos T CD4<sup>+</sup> (187). Aunque los linfocitos T CD4<sup>+</sup> TCM son considerados el principal componente del reservorio (80, 220), las principales células que contribuyen al mantenimiento y repositorio del reservorio de VIH-1 son los linfocitos T CD4<sup>+</sup> de memoria efectora, como las TEM y TEMRA

(221). Los individuos tratados con TAR y dasatinib tenían los niveles más bajos de linfocitos T CD4+ TEMRA, células que expresan altos niveles de marcadores de activación (222) y contienen gran variedad de formas virales inestables (223), contribuyendo así en mayor medida al repunte proviral y el mantenimiento del reservorio. Además, los linfocitos T CD4+ naïve, los cuales se consideran como importantes contribuidores del reservorio latente (224, 225) y tendrían larga esperanza de vida (1-8 años) (226), estaban también disminuidos en los individuos con TAR y dasatinib. Como consecuencia, la proporción de linfocitos T CD4+ TCM estaba aumentada en comparación con los individuos tratados solo con TAR. Esta diferente distribución de las subpoblaciones de linfocitos T CD4+ podría sugerir un dinamismo restringido del reservorio viral en presencia de dasatinib.

Sin embargo, los linfocitos T CD4+ son el principal reservorio de VIH-1 pero no el único. Así, más análisis son necesarios para evaluar el efecto de TAR y dasatinib no solo en los linfocitos T CD4+ de sangre periférica, sino también en otros reservorios como macrófagos y otros santuarios anatómicos como el GALT y los ganglios linfáticos. Estos santuarios podrían ser altamente estables debido a una baja concentración de fármaco en estos tipos celulares y la existencia de un nivel de replicación inferior al de linfocitos (223). Sin embargo, el volumen aparente de distribución de dasatinib se ha estimado en 2.505L, sugiriendo que es ampliamente distribuido en el espacio extravascular (227).

Por otro lado, estudios *in vitro* y *ex vivo* sugieren que menores concentraciones de dasatinib que la dosis habitual usada en paciente con LMC serían suficientes para mantener el efecto antiviral (228). La dosis de dasatinib usada *ex vivo* fue de 75nM (38ng/ml) lo que se correlaciona con la concentración máxima alcanzada en individuos sanos después de la administración de 50mg una vez al día (227), aunque la dosis recomendada de dasatinib es 100 mg/día (227). Nuestro grupo ha demostrado previamente que la menor dosis de dasatinib efectiva como antiviral es 16nM (8,26ng/ml) (182), lo cual significa la novena parte de la dosis recomendada para el tratamiento de LMC, pudiendo ser usado como adyuvante de TAR sin un riesgo de toxicidad importante. También demostramos que el tratamiento con dasatinib *ex vivo* era seguro, con un índice de selectividad mayor a 600 (182). Por otro lado, el aparente estado de inmunosupresión derivado del tratamiento con ITKs no tiene consecuencias clínicas, pues los pacientes con LMC en tratamiento con ITKs son rara vez susceptibles a infecciones oportunistas, aunque hay grupos que describen que el tratamiento continuo con dasatinib podría incrementar el riesgo de infecciones bacterianas (229-231). Consecuentemente, los principales efectos adversos atribuidos al dasatinib son efusión pleural y complicaciones infecciosas (227), siendo probablemente infrecuentes con dosis

menores durante cortos períodos de tiempo (187, 228). Estos potenciales efectos adversos podrían ser monitorizados durante la administración simultánea de TAR y dasatinib debido a que el dasatinib es principalmente metabolizado por el citocromo P450 3A4 (CYP3A4) (227, 232) y con ello, se deberían evitar interacciones con algunas pautas TAR (228). Concretamente, las pautas de TAR que contienen inhibidores de CYP3A4 como ritonavir o cobicistat no deberían usarse simultáneamente con dasatinib para evitar posibles efectos adversos (233). Contrariamente, potenciadores de CYP3A4 como INNTI, principalmente efavirenz, etravirina y nevirapina (234) podrían reducir el efecto antiviral de dasatinib al administrarse simultáneamente. Sin embargo, no serían esperables efectos adversos al coadministrar dasatinib con las pautas recomendadas que incluyen INTI e IIN como raltegravir o dolutegravir.

Los resultados expuestos en este trabajo podrían suponer un gran avance en el desarrollo de las estrategias frente al VIH. Desde el punto de vista de la estrategia de shock & kill, la coadministración de ITKs con LRAs podría estimular una potente respuesta citotóxica frente al reservorio reactivado de VIH-1. Esta estrategia combinada promovería la reactivación y destrucción de células latentemente infectadas que albergaran provirus competentes. Pero ITKs como el dasatinib también presentan un perfil de LPA, siendo capaces de inducir un estado de super latencia en las células que componen el reservorio (block & lock), que irían decayendo progresivamente en ausencia de una replicación homeostática eficiente.

Finalmente, la seguridad y tolerancia de la coadministración de la pauta habitual de TAR con diferentes ITKs observada en los pacientes infectados de VIH-1 que desarrollan LMC proporciona una base sólida para el desarrollo de ensayos clínicos en los que se pueda determinar la eficacia real de ITKs como el dasatinib sobre el reservorio viral de personas con infección crónica por VIH.

# CONCLUSIONES



1. Los ITKs son capaces de modular la respuesta inmune, generando una potente actividad antileucémica y antiviral que se mantiene incluso después de la retirada del tratamiento.
2. Esta respuesta inmune sería llevada a cabo por células NK de memoria y linfocitos T CD8+ TCRγδ.
3. La actividad antiviral inducida por los ITKs es capaz de interferir eficazmente con la infección por VIH-1 en los linfocitos T CD4+.
4. Los individuos tratados con TAR y dasatinib tienen un reservorio menor, similar al observado en los pacientes controladores de élite.
5. La baja frecuencia de células latentemente infectadas observada en los individuos tratados con TAR y dasatinib podría deberse a varias causas, entre ellas, la baja fosforilación de SAMHD1 en presencia de dasatinib, la interferencia con los mecanismos de proliferación homeostática, o la mayor respuesta citotóxica antiviral de memoria.
6. El tratamiento con dasatinib y/o imatinib parece modificar la composición del reservorio en la proporción de provirus intactos y defectivos.
7. El potente efecto citostático del dasatinib en los linfocitos T CD4+ impide la activación y reactivación del provirus latente, por lo que el dasatinib actúa como un LPA de la estrategia block & lock.
8. Dasatinib bloquearía el mantenimiento del reservorio del VIH-1 inducido por la proliferación homeostática mediada por IL-7, reforzando su papel como LPA.
9. El dasatinib induce cambios en la proporción de las subpoblaciones de memoria de los linfocitos T CD4+, disminuyendo los niveles de células de memoria efectora, que son las células que más activamente contribuyen al repoblamiento del reservorio.
10. El uso del dasatinib como adyuvante de TAR o de LRAs dentro de la estrategia de shock & kill podría ser considerado como una potencial intervención farmacológica para incidir eficazmente sobre el reservorio y avanzar hacia una cura funcional de la infección por VIH.

# BIBLIOGRAFÍA

1. 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;305(24):1425-31.
2. Centers for Disease C. Pneumocystis pneumonia--Los Angeles. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 1981;30(21):250-2.
3. Chermann JC, Barre-Sinoussi F, Dauguet C, Brun-Vezinet F, Rouzioux C, Rozenbaum W, et al. Isolation of a new retrovirus in a patient at risk for acquired immunodeficiency syndrome. *Antibiot Chemother (1971).* 1983;32:48-53.
4. Gallo RC, Salahuddin SZ, Popovic M, Shearer GM, Kaplan M, Haynes BF, et al. Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science.* 1984;224(4648):500-3.
5. Coffin J, Haase A, Levy JA, Montagnier L, Oroszlan S, Teich N, et al. Human immunodeficiency viruses. *Science.* 1986;232(4751):697.
6. UNAIDS. Global HIV & AIDS statistics - 2021 fact sheet 2021 [Available from: <https://www.unaids.org/es/resources/fact-sheet>].
7. Unidad de Vigilancia de VIH Iyh. Vigilancia Epidemiológica del VIH y sida en España 2020: Sistema de Información sobre Nuevos Diagnósticos de VIH y Registro Nacional de Casos de Sida. In: Madrid PNseS-DGdSPCNdE-I, editor. 2021.
8. UNAIDS. Core epidemiology slides. 2022.
9. Viruses ICoTo. Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.2012.
10. Whittle H, Morris J, Todd J, Corrah T, Sabally S, Bangali J, et al. HIV-2-infected patients survive longer than HIV-1-infected patients. *AIDS.* 1994;8(11):1617-20.
11. Robertson DL, Anderson JP, Bradac JA, Carr JK, Foley B, Funkhouser RK, et al. HIV-1 nomenclature proposal. *Science.* 2000;288(5463):55-6.
12. Worobey M, Telfer P, Souquiere S, Hunter M, Coleman CA, Metzger MJ, et al. Island biogeography reveals the deep history of SIV. *Science.* 2010;329(5998):1487.
13. Arien KK, Vanham G, Arts EJ. Is HIV-1 evolving to a less virulent form in humans? *Nat Rev Microbiol.* 2007;5(2):141-51.
14. Bbosa N, Kaleebu P, Ssemwanga D. HIV subtype diversity worldwide. *Curr Opin HIV AIDS.* 2019;14(3):153-60.
15. Muesing MA, Smith DH, Cabradilla CD, Benton CV, Lasky LA, Capon DJ. Nucleic acid structure and expression of the human AIDS/lymphadenopathy retrovirus. *Nature.* 1985;313(6002):450-8.
16. Frankel AD, Young JA. HIV-1: fifteen proteins and an RNA. *Annu Rev Biochem.* 1998;67:1-25.
17. Turner BG, Summers MF. Structural biology of HIV. *J Mol Biol.* 1999;285(1):1-32.
18. Li G, De Clercq E. HIV Genome-Wide Protein Associations: a Review of 30 Years of Research. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2016;80(3):679-731.
19. Roebuck KA, Saifuddin M. Regulation of HIV-1 transcription. *Gene Expr.* 1999;8(2):67-84.
20. Karn J. Tackling Tat. *J Mol Biol.* 1999;293(2):235-54.
21. Ellery PJ, Tippet E, Chiu YL, Paukovics G, Cameron PU, Solomon A, et al. The CD16+ monocyte subset is more permissive to infection and preferentially harbors HIV-1 in vivo. *J Immunol.* 2007;178(10):6581-9.
22. Coleman CM, Wu L. HIV interactions with monocytes and dendritic cells: viral latency and reservoirs. *Retrovirology.* 2009;6:51.
23. Clapham PR, Weiss RA. Immunodeficiency viruses. Spoilt for choice of co-receptors. *Nature.* 1997;388(6639):230-1.
24. José Alcamí MC. Immunopathogenesis of HIV infection. 2011. p. 216-26.

25. Zila V, Margiotta E, Turonova B, Muller TG, Zimmerli CE, Mattei S, et al. Cone-shaped HIV-1 capsids are transported through intact nuclear pores. *Cell*. 2021;184(4):1032-46 e18.
26. CATALOG NAR.
27. Hu WS, Hughes SH. HIV-1 reverse transcription. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012;2(10).
28. Shen Q, Wu C, Freniere C, Tripler TN, Xiong Y. Nuclear Import of HIV-1. *Viruses*. 2021;13(11).
29. Christensen DE, Ganser-Pornillos BK, Johnson JS, Pornillos O, Sundquist WI. Reconstitution and visualization of HIV-1 capsid-dependent replication and integration in vitro. *Science*. 2020;370(6513).
30. Schaller T, Ocwieja KE, Rasaiyaah J, Price AJ, Brady TL, Roth SL, et al. HIV-1 capsid-cyclophilin interactions determine nuclear import pathway, integration targeting and replication efficiency. *PLoS Pathog*. 2011;7(12):e1002439.
31. Jiang C, Lian X, Gao C, Sun X, Einkauf KB, Chevalier JM, et al. Distinct viral reservoirs in individuals with spontaneous control of HIV-1. *Nature*. 2020;585(7824):261-7.
32. Martinez-Picado J, Zurakowski R, Buzon MJ, Stevenson M. Episomal HIV-1 DNA and its relationship to other markers of HIV-1 persistence. *Retrovirology*. 2018;15(1):15.
33. Karn J, Stoltzfus CM. Transcriptional and posttranscriptional regulation of HIV-1 gene expression. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012;2(2):a006916.
34. Le Blanc I, Prevost MC, Dokhelar MC, Rosenberg AR. The PPPY motif of human T-cell leukemia virus type 1 Gag protein is required early in the budding process. *J Virol*. 2002;76(19):10024-9.
35. Sundquist WI, Krausslich HG. HIV-1 assembly, budding, and maturation. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012;2(7):a006924.
36. Chen Q, Zeng D, She Y, Lyu Y, Gong X, Feinstein MJ, et al. Different transmission routes and the risk of advanced HIV disease: A systematic review and network meta-analysis of observational studies. *EClinicalMedicine*. 2019;16:121-8.
37. Quinn TC, Wawer MJ, Sewankambo N, Serwadda D, Li C, Wabwire-Mangen F, et al. Viral load and heterosexual transmission of human immunodeficiency virus type 1. Rakai Project Study Group. *N Engl J Med*. 2000;342(13):921-9.
38. Rottingen JA, Cameron DW, Garnett GP. A systematic review of the epidemiologic interactions between classic sexually transmitted diseases and HIV: how much really is known? *Sex Transm Dis*. 2001;28(10):579-97.
39. Atashili J, Poole C, Ndumbe PM, Adimora AA, Smith JS. Bacterial vaginosis and HIV acquisition: a meta-analysis of published studies. *AIDS*. 2008;22(12):1493-501.
40. Keele BF, Giorgi EE, Salazar-Gonzalez JF, Decker JM, Pham KT, Salazar MG, et al. Identification and characterization of transmitted and early founder virus envelopes in primary HIV-1 infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(21):7552-7.
41. Sagar M. HIV-1 transmission biology: selection and characteristics of infecting viruses. *J Infect Dis*. 2010;202 Suppl 2:S289-96.
42. Trautmann L, Janbazian L, Chomont N, Said EA, Gimmig S, Bessette B, et al. Upregulation of PD-1 expression on HIV-specific CD8+ T cells leads to reversible immune dysfunction. *Nat Med*. 2006;12(10):1198-202.
43. Richman DD, Wrin T, Little SJ, Petropoulos CJ. Rapid evolution of the neutralizing antibody response to HIV type 1 infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(7):4144-9.
44. Kelley CF, Barbour JD, Hecht FM. The relation between symptoms, viral load, and viral load set point in primary HIV infection. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2007;45(4):445-8.
45. Pantaleo G, Fauci AS. Immunopathogenesis of HIV infection. *Annu Rev Microbiol*. 1996;50:825-54.
46. WHO. HIV/AIDS. Signs and symptoms.
47. ECDC. HIV infection and AIDS. 2022.
48. CDC. AIDS and Opportunistic Infections.

49. Furman PA, Barry DW. Spectrum of antiviral activity and mechanism of action of zidovudine. An overview. *Am J Med.* 1988;85(2A):176-81.
50. Administration USFaD. In: Services USDoHaH, editor. HIV/AIDS Treatment - HIV Treatment Information for Adults.
51. Tompa DR, Immanuel A, Srikanth S, Kadirvel S. Trends and strategies to combat viral infections: A review on FDA approved antiviral drugs. *Int J Biol Macromol.* 2021;172:524-41.
52. Thompson MA, Aberg JA, Hoy JF, Telenti A, Benson C, Cahn P, et al. Antiretroviral treatment of adult HIV infection: 2012 recommendations of the International Antiviral Society-USA panel. *JAMA.* 2012;308(4):387-402.
53. Saag MS, Gandhi RT, Hoy JF, Landovitz RJ, Thompson MA, Sax PE, et al. Antiretroviral Drugs for Treatment and Prevention of HIV Infection in Adults: 2020 Recommendations of the International Antiviral Society-USA Panel. *JAMA.* 2020;324(16):1651-69.
54. Gulick RM, Flexner C. Long-Acting HIV Drugs for Treatment and Prevention. *Annu Rev Med.* 2019;70:137-50.
55. Gardner EM, Burman WJ, Steiner JF, Anderson PL, Bangsberg DR. Antiretroviral medication adherence and the development of class-specific antiretroviral resistance. *AIDS.* 2009;23(9):1035-46.
56. Phanuphak N, Gulick RM. HIV treatment and prevention 2019: current standards of care. *Curr Opin HIV AIDS.* 2020;15(1):4-12.
57. Kelesidis T, Landovitz RJ. Preexposure prophylaxis for HIV prevention. *Curr HIV/AIDS Rep.* 2011;8(2):94-103.
58. Chou R, Evans C, Hoverman A, Sun C, Dana T, Bougatsos C, et al. Preexposure Prophylaxis for the Prevention of HIV Infection: Evidence Report and Systematic Review for the US Preventive Services Task Force. *JAMA.* 2019;321(22):2214-30.
59. Rutstein SE, Smith DK, Dalal S, Baggaley RC, Cohen MS. Initiation, discontinuation, and restarting HIV pre-exposure prophylaxis: ongoing implementation strategies. *Lancet HIV.* 2020;7(10):e721-e30.
60. Finzi D, Hermankova M, Pierson T, Carruth LM, Buck C, Chaisson RE, et al. Identification of a reservoir for HIV-1 in patients on highly active antiretroviral therapy. *Science.* 1997;278(5341):1295-300.
61. Chun TW, Davey RT, Jr., Engel D, Lane HC, Fauci AS. Re-emergence of HIV after stopping therapy. *Nature.* 1999;401(6756):874-5.
62. Whitney JB, Hill AL, Sanisetty S, Penaloza-MacMaster P, Liu J, Shetty M, et al. Rapid seeding of the viral reservoir prior to SIV viraemia in rhesus monkeys. *Nature.* 2014;512(7512):74-7.
63. Chun TW, Murray D, Justement JS, Hallahan CW, Moir S, Kovacs C, et al. Relationship between residual plasma viremia and the size of HIV proviral DNA reservoirs in infected individuals receiving effective antiretroviral therapy. *J Infect Dis.* 2011;204(1):135-8.
64. Chun TW, Justement JS, Pandya P, Hallahan CW, McLaughlin M, Liu S, et al. Relationship between the size of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) reservoir in peripheral blood CD4+ T cells and CD4+:CD8+ T cell ratios in aviremic HIV-1-infected individuals receiving long-term highly active antiretroviral therapy. *J Infect Dis.* 2002;185(11):1672-6.
65. Sharma G, Kaur G, Mehra N. Genetic correlates influencing immunopathogenesis of HIV infection. *Indian J Med Res.* 2011;134(6):749-68.
66. Mendoza D, Royce C, Ruff LE, Ambrozak DR, Quigley MF, Dang T, et al. HLA B\*5701-positive long-term nonprogressors/elite controllers are not distinguished from progressors by the clonal composition of HIV-specific CD8+ T cells. *J Virol.* 2012;86(7):4014-8.
67. Boulassel MR, Chomont N, Pai NP, Gilmore N, Sekaly RP, Routy JP. CD4 T cell nadir independently predicts the magnitude of the HIV reservoir after prolonged suppressive antiretroviral therapy. *J Clin Virol.* 2012;53(1):29-32.

68. Dahabieh MS, Ooms M, Simon V, Sadowski I. A doubly fluorescent HIV-1 reporter shows that the majority of integrated HIV-1 is latent shortly after infection. *J Virol.* 2013;87(8):4716-27.
69. Lopez-Huertas MR, Palladino C, Garrido-Arquero M, Esteban-Cardelle B, Sanchez-Carrillo M, Martinez-Roman P, et al. HCV-coinfection is related to an increased HIV-1 reservoir size in cART-treated HIV patients: a cross-sectional study. *Sci Rep.* 2019;9(1):5606.
70. Crooks AM, Bateson R, Cope AB, Dahl NP, Griggs MK, Kuruc JD, et al. Precise Quantitation of the Latent HIV-1 Reservoir: Implications for Eradication Strategies. *J Infect Dis.* 2015;212(9):1361-5.
71. Eriksson S, Graf EH, Dahl V, Strain MC, Yukl SA, Lysenko ES, et al. Comparative analysis of measures of viral reservoirs in HIV-1 eradication studies. *PLoS Pathog.* 2013;9(2):e1003174.
72. Caroline Dufour MJR, Amélie Pagliuzza, Amélie Cattin, Tomas Raul Wiche Salinas, Syim Salahuddin, Stephanie Burke Schinkel, Cecilia Theresa Costiniuk, Mohammad-Ali Jenabian, Petronela Ancuta, Jean-Pierre Routy, Eric A. Cohen, Christopher Power, Jonathan B. Angel, Nicolas Chomont. Expansion and extensive recirculation of HIV-infected cells in multiple organs. *CROI2022-Abstract Book2022.* p. 27.
73. Chun TW, 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;197(5):714-20.
74. Lorenzo-Redondo R, Fryer HR, Bedford T, Kim EY, Archer J, Pond SLK, et al. Persistent HIV-1 replication maintains the tissue reservoir during therapy. *Nature.* 2016;530(7588):51-6.
75. Saleh S, Solomon A, Wightman F, Xhilaga 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;110(13):4161-4.
76. Murray JM, Zaunders JJ, McBride KL, Xu Y, Bailey M, Suzuki K, et al. HIV DNA subspecies persist in both activated and resting memory CD4+ T cells during antiretroviral therapy. *J Virol.* 2014;88(6):3516-26.
77. Castellano P, Prevedel L, Eugenin EA. HIV-infected macrophages and microglia that survive acute infection become viral reservoirs by a mechanism involving Bim. *Sci Rep.* 2017;7(1):12866.
78. Narasipura SD, Kim S, Al-Harathi L. Epigenetic regulation of HIV-1 latency in astrocytes. *J Virol.* 2014;88(5):3031-8.
79. Deeks SG, Archin N, Cannon P, Collins S, Jones RB, de Jong M, et al. Research priorities for an HIV cure: International AIDS Society Global Scientific Strategy 2021. *Nat Med.* 2021;27(12):2085-98.
80. Chomont N, El-Far M, Ancuta P, Trautmann L, Procopio FA, Yassine-Diab B, et al. HIV reservoir size and persistence are driven by T cell survival and homeostatic proliferation. *Nat Med.* 2009;15(8):893-900.
81. Coiras M, Bermejo M, Descours B, Mateos E, Garcia-Perez J, Lopez-Huertas MR, et al. IL-7 Induces SAMHD1 Phosphorylation in CD4+ T Lymphocytes, Improving Early Steps of HIV-1 Life Cycle. *Cell Rep.* 2016;14(9):2100-7.
82. Katlama C, Lambert-Niclot S, Assoumou L, Papagno L, Lecardonnel F, Zoorob R, et al. Treatment intensification followed by interleukin-7 reactivates HIV without reducing total HIV DNA: a randomized trial. *AIDS.* 2016;30(2):221-30.
83. Sereti I, Dunham RM, Spritzler J, Aga E, Proschan MA, Medvik K, et al. IL-7 administration drives T cell-cycle entry and expansion in HIV-1 infection. *Blood.* 2009;113(25):6304-14.
84. Lopez-Huertas MR, Li J, Zafar A, Rodriguez-Mora S, Garcia-Dominguez C, Mateos E, et al. PKC $\theta$  and HIV-1 Transcriptional Regulator Tat Co-exist at the LTR Promoter in CD4(+) T Cells. *Front Immunol.* 2016;7:69.
85. Wang X, Chuang HC, Li JP, Tan TH. Regulation of PKC- $\theta$  function by phosphorylation in T cell receptor signaling. *Front Immunol.* 2012;3:197.

86. Reeves DB, Duke ER, Wagner TA, Palmer SE, Spivak AM, Schiffer JT. A majority of HIV persistence during antiretroviral therapy is due to infected cell proliferation. *Nat Commun.* 2018;9(1):4811.
87. Hill AL. Mathematical Models of HIV Latency. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2018;417:131-56.
88. Hutter G, Nowak D, Mossner M, Ganepola S, Mussig A, Allers K, et al. Long-term control of HIV by CCR5 Delta32/Delta32 stem-cell transplantation. *N Engl J Med.* 2009;360(7):692-8.
89. Hutter G, Schneider T, Thiel E. Transplantation of selected or transgenic blood stem cells - a future treatment for HIV/AIDS? *J Int AIDS Soc.* 2009;12:10.
90. Gupta RK, Abdul-Jawad S, McCoy LE, Mok HP, Peppas D, Salgado M, et al. HIV-1 remission following CCR5Delta32/Delta32 haematopoietic stem-cell transplantation. *Nature.* 2019;568(7751):244-8.
91. Gupta RK, Peppas D, Hill AL, Galvez C, Salgado M, Pace M, et al. Evidence for HIV-1 cure after CCR5Delta32/Delta32 allogeneic haemopoietic stem-cell transplantation 30 months post analytical treatment interruption: a case report. *Lancet HIV.* 2020;7(5):e340-e7.
92. Salgado M, Kwon M, Galvez C, Badiola J, Nijhuis M, Bandera A, et al. Mechanisms That Contribute to a Profound Reduction of the HIV-1 Reservoir After Allogeneic Stem Cell Transplant. *Ann Intern Med.* 2018;169(10):674-83.
93. Bjorn-Erik O. Jensen EK, Nadine Lubke, Annemarie Wensing, Javier Martinez-Picado, Rolf Kaiser, Monique Nijhuis, Maria Salgado, Thomas Harrer, Eva Heger, Johanna M. Eberhard, Ilona Hauber, Carsten Munk, Dieter Haussinger, Guido Kobbe. 394 LB ANALYTIC TREATMENT INTERRUPTION (ATI) AFTER ALLOGENEIC CCR5-D32 HSCT FOR AML IN 2013 CROI2019\_abstract book; 2019.
94. Bjoern-Erik O. Jensen DH, Elena Knops, Annemarie Wensing, Javier Martinez-Picado, Monique Nijhuis, Maria Salgado, Jacob D. Estes, Nadine Lübke, Rolf Kaiser, Thomas Harrer, Johannes Fischer, Julian Schulze zur Wiesch, Johanna M. Eberhard, Guido Kobbe 348LB CCR5Δ32 SCT-INDUCED HIV REMISSION: TRACES OF HIV DNA BUT FADING IMMUNE REACTIVITY CROI2020\_Abstract Book; 2020.
95. JingMei Hsu KVB, Marshall J. Glesby, Anne Coletti, Savita G. Pahwa, Meredith Warsaw, Amanda Golner, Frederic Bone, Nicole Tobin, Marcie Riches, John W. Mellors, Renee Browning, Deborah Persaud, Yvonne Bryson. HIV-1 remission with CCR5Δ32Δ32 haplo-cord transplant in a U.S Woman: IMPAACT P1107. CROI2022\_Abstract\_Book; 2022. p. 26.
96. Henrich TJ, Hu Z, Li JZ, Sciaranghella G, Busch MP, Keating SM, et al. Long-term reduction in peripheral blood HIV type 1 reservoirs following reduced-intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation. *J Infect Dis.* 2013;207(11):1694-702.
97. Huang Y, Paxton WA, Wolinsky SM, Neumann AU, Zhang L, He T, et al. The role of a mutant CCR5 allele in HIV-1 transmission and disease progression. *Nat Med.* 1996;2(11):1240-3.
98. de Roda Husman AM, Koot M, Cornelissen M, Keet IP, Brouwer M, Broersen SM, et al. Association between CCR5 genotype and the clinical course of HIV-1 infection. *Ann Intern Med.* 1997;127(10):882-90.
99. Duarte RF, Salgado M, Sanchez-Ortega I, Arnan M, Canals C, Domingo-Domenech E, et al. CCR5 Delta32 homozygous cord blood allogeneic transplantation in a patient with HIV: a case report. *Lancet HIV.* 2015;2(6):e236-42.
100. Peterson CW, Kiem HP. Lessons from London and Berlin: Designing A Scalable Gene Therapy Approach for HIV Cure. *Cell Stem Cell.* 2019;24(5):685-7.
101. Peterson CW, Wang J, Deleage C, Reddy S, Kaur J, Polacino P, et al. Differential impact of transplantation on peripheral and tissue-associated viral reservoirs: Implications for HIV gene therapy. *PLoS Pathog.* 2018;14(4):e1006956.
102. Li JZ, Blankson JN. How elite controllers and posttreatment controllers inform our search for an HIV-1 cure. *J Clin Invest.* 2021;131(11).

103. Saez-Cirion 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;9(3):e1003211.
104. Casado C, Galvez C, Pernas M, Tarancon-Diez L, Rodriguez C, Sanchez-Merino V, et al. Permanent control of HIV-1 pathogenesis in exceptional elite controllers: a model of spontaneous cure. *Sci Rep.* 2020;10(1):1902.
105. Galvez C, Urrea V, Dalmau J, Jimenez M, Clotet B, Monceaux V, et al. Extremely low viral reservoir in treated chronically HIV-1-infected individuals. *EBioMedicine.* 2020;57:102830.
106. Turk G, Seiger K, Lian X, Sun W, Parsons EM, Gao C, et al. A Possible Sterilizing Cure of HIV-1 Infection Without Stem Cell Transplantation. *Ann Intern Med.* 2022;175(1):95-100.
107. Mousseau G, Clementz MA, Bakeman WN, Nagarsheth N, Cameron M, Shi J, et al. An analog of the natural steroidal alkaloid cortistatin A potently suppresses Tat-dependent HIV transcription. *Cell Host Microbe.* 2012;12(1):97-108.
108. Moranguinho I, Valente ST. Block-And-Lock: New Horizons for a Cure for HIV-1. *Viruses.* 2020;12(12).
109. Anderson I, Low JS, Weston S, Weinberger M, Zhyvoloup A, Labokha AA, et al. Heat shock protein 90 controls HIV-1 reactivation from latency. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(15):E1528-37.
110. Mediouni S, Chinthalapudi K, Ekka MK, Usui I, Jablonski JA, Clementz MA, et al. Didehydro-Cortistatin A Inhibits HIV-1 by Specifically Binding to the Unstructured Basic Region of Tat. *mBio.* 2019;10(1).
111. Mousseau G, Kessing CF, Fromentin R, Trautmann L, Chomont N, Valente ST. The Tat Inhibitor Didehydro-Cortistatin A Prevents HIV-1 Reactivation from Latency. *mBio.* 2015;6(4):e00465.
112. Kessing CF, Nixon CC, Li C, Tsai P, Takata H, Mousseau G, et al. In Vivo Suppression of HIV Rebound by Didehydro-Cortistatin A, a "Block-and-Lock" Strategy for HIV-1 Treatment. *Cell Rep.* 2017;21(3):600-11.
113. Kim Y, Anderson JL, Lewin SR. Getting the "Kill" into "Shock and Kill": Strategies to Eliminate Latent HIV. *Cell Host Microbe.* 2018;23(1):14-26.
114. Abner E, Jordan A. HIV "shock and kill" therapy: In need of revision. *Antiviral Res.* 2019;166:19-34.
115. Archin NM, Kirchherr JL, Sung JA, Clutton G, Sholtis K, Xu Y, et al. Interval dosing with the HDAC inhibitor vorinostat effectively reverses HIV latency. *J Clin Invest.* 2017;127(8):3126-35.
116. Rasmussen TA, Tolstrup M, Brinkmann CR, Olesen R, Erikstrup C, Solomon A, et al. Panobinostat, a histone deacetylase inhibitor, for latent-virus reactivation in HIV-infected patients on suppressive antiretroviral therapy: a phase 1/2, single group, clinical trial. *Lancet HIV.* 2014;1(1):e13-21.
117. Sogaard 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;11(9):e1005142.
118. Vlach J, Pitha PM. Activation of human immunodeficiency virus type 1 provirus in T-cells and macrophages is associated with induction of inducer-specific NF-kappa B binding proteins. *Virology.* 1992;187(1):63-72.
119. Thibault S, Imbeault M, Tardif MR, Tremblay MJ. TLR5 stimulation is sufficient to trigger reactivation of latent HIV-1 provirus in T lymphoid cells and activate virus gene expression in central memory CD4+ T cells. *Virology.* 2009;389(1-2):20-5.
120. SenGupta D, Brinson C, DeJesus E, Mills A, Shalit P, Guo S, et al. The TLR7 agonist vesatolimod induced a modest delay in viral rebound in HIV controllers after cessation of antiretroviral therapy. *Sci Transl Med.* 2021;13(599).



121. Offersen R, Nissen SK, Rasmussen TA, Ostergaard L, Denton PW, Sogaard OS, et al. A Novel Toll-Like Receptor 9 Agonist, MGN1703, Enhances HIV-1 Transcription and NK Cell-Mediated Inhibition of HIV-1-Infected Autologous CD4+ T Cells. *J Virol*. 2016;90(9):4441-53.
122. Gulick RM, Lalezari J, Goodrich J, Clumeck N, DeJesus E, Horban A, et al. Maraviroc for previously treated patients with R5 HIV-1 infection. *N Engl J Med*. 2008;359(14):1429-41.
123. Lopez-Huertas MR, Gutierrez C, Madrid-Elena N, Hernandez-Novoa B, Olalla-Sierra J, Plana M, et al. Prolonged administration of maraviroc reactivates latent HIV in vivo but it does not prevent antiretroviral-free viral rebound. *Sci Rep*. 2020;10(1):22286.
124. Bullen CK, Laird GM, Durand CM, Siliciano JD, Siliciano RF. New ex vivo approaches distinguish effective and ineffective single agents for reversing HIV-1 latency in vivo. *Nat Med*. 2014;20(4):425-9.
125. Zhao M, De Crignis E, Rokx C, Verbon A, van Gelder T, Mahmoudi T, et al. T cell toxicity of HIV latency reversing agents. *Pharmacol Res*. 2019;139:524-34.
126. de Paula HHS, Ferreira ACG, Caetano DG, Delatorre E, Teixeira SLM, Coelho LE, et al. Reduction of inflammation and T cell activation after 6 months of cART initiation during acute, but not in early chronic HIV-1 infection. *Retrovirology*. 2018;15(1):76.
127. Persaud D, Gay H, Ziemniak C, Chen YH, Piatak M, Jr., Chun TW, et al. Absence of detectable HIV-1 viremia after treatment cessation in an infant. *N Engl J Med*. 2013;369(19):1828-35.
128. Luzuriaga K, Gay H, Ziemniak C, Sanborn KB, Somasundaran M, Rainwater-Lovett K, et al. Viremic relapse after HIV-1 remission in a perinatally infected child. *N Engl J Med*. 2015;372(8):786-8.
129. Chun TW, Justement JS, Moir S, Hallahan CW, Maenza J, Mullins JI, et al. Decay of the HIV reservoir in patients receiving antiretroviral therapy for extended periods: implications for eradication of virus. *J Infect Dis*. 2007;195(12):1762-4.
130. Khaitan A, Unutmaz D. Revisiting immune exhaustion during HIV infection. *Curr HIV/AIDS Rep*. 2011;8(1):4-11.
131. Sousa AE, Carneiro J, Meier-Schellersheim M, Grossman Z, Victorino RM. CD4 T cell depletion is linked directly to immune activation in the pathogenesis of HIV-1 and HIV-2 but only indirectly to the viral load. *J Immunol*. 2002;169(6):3400-6.
132. Caskey M, Klein F, Lorenzi JC, Seaman MS, West AP, Jr., Buckley N, et al. Viraemia suppressed in HIV-1-infected humans by broadly neutralizing antibody 3BNC117. *Nature*. 2015;522(7557):487-91.
133. Igarashi T, Brown C, Azadegan A, Haigwood N, Dimitrov D, Martin MA, et al. Human immunodeficiency virus type 1 neutralizing antibodies accelerate clearance of cell-free virions from blood plasma. *Nat Med*. 1999;5(2):211-6.
134. Schoofs T, Klein F, Braunschweig M, Kreider EF, Feldmann A, Nogueira L, et al. HIV-1 therapy with monoclonal antibody 3BNC117 elicits host immune responses against HIV-1. *Science*. 2016;352(6288):997-1001.
135. Malbec M, Porrot F, Rua R, Horwitz J, Klein F, Halper-Stromberg A, et al. Broadly neutralizing antibodies that inhibit HIV-1 cell to cell transmission. *J Exp Med*. 2013;210(13):2813-21.
136. Trkola A, Kuster H, Rusert P, Joos B, Fischer M, Leemann C, et al. Delay of HIV-1 rebound after cessation of antiretroviral therapy through passive transfer of human neutralizing antibodies. *Nat Med*. 2005;11(6):615-22.
137. Scheid JF, Mouquet H, Ueberheide B, Diskin R, Klein F, Oliveira TY, et al. Sequence and structural convergence of broad and potent HIV antibodies that mimic CD4 binding. *Science*. 2011;333(6049):1633-7.
138. Lynch RM, Boritz E, Coates EE, DeZure A, Madden P, Costner P, et al. Virologic effects of broadly neutralizing antibody VRC01 administration during chronic HIV-1 infection. *Sci Transl Med*. 2015;7(319):319ra206.

139. Caskey M, Schoofs T, Gruell H, Settler A, Karagounis T, Kreider EF, et al. Antibody 10-1074 suppresses viremia in HIV-1-infected individuals. *Nat Med.* 2017;23(2):185-91.
140. Mendoza P, Gruell H, Nogueira L, Pai JA, Butler AL, Millard K, et al. Combination therapy with anti-HIV-1 antibodies maintains viral suppression. *Nature.* 2018;561(7724):479-84.
141. Liberatore RA, Ho DD. The Miami Monkey: A Sunny Alternative to the Berlin Patient. *Immunity.* 2019;50(3):537-9.
142. Wang Z, Gurule EE, Brennan TP, Gerold JM, Kwon KJ, Hosmane NN, et al. Expanded cellular clones carrying replication-competent HIV-1 persist, wax, and wane. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2018;115(11):E2575-E84.
143. Boyman O, Purton JF, Surh CD, Sprent J. Cytokines and T-cell homeostasis. *Curr Opin Immunol.* 2007;19(3):320-6.
144. Surh CD, Sprent J. Homeostasis of naive and memory T cells. *Immunity.* 2008;29(6):848-62.
145. Bosque A, Famiglietti M, Weyrich AS, Goulston C, Planelles V. Homeostatic proliferation fails to efficiently reactivate HIV-1 latently infected central memory CD4+ T cells. *PLoS Pathog.* 2011;7(10):e1002288.
146. Coiras M, Ambrosioni J, Cervantes F, Miro JM, Alcami J. Tyrosine kinase inhibitors: potential use and safety considerations in HIV-1 infection. *Expert Opin Drug Saf.* 2017;16(5):547-59.
147. Siegel RL, Fedewa SA, Miller KD, Goding-Sauer A, Pinheiro PS, Martinez-Tyson D, et al. Cancer statistics for Hispanics/Latinos, 2015. *CA Cancer J Clin.* 2015;65(6):457-80.
148. Woessner DW, Lim CS, Deininger MW. Development of an effective therapy for chronic myelogenous leukemia. *Cancer J.* 2011;17(6):477-86.
149. Gschwind A, Fischer OM, Ullrich A. The discovery of receptor tyrosine kinases: targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 2004;4(5):361-70.
150. Kim LC, Song L, Haura EB. Src kinases as therapeutic targets for cancer. *Nat Rev Clin Oncol.* 2009;6(10):587-95.
151. Rowley JD. The Philadelphia chromosome translocation. A paradigm for understanding leukemia. *Cancer.* 1990;65(10):2178-84.
152. AEMPS. Imatinib
153. Thompson PA, Kantarjian HM, Cortes JE. Diagnosis and Treatment of Chronic Myeloid Leukemia in 2015. *Mayo Clin Proc.* 2015;90(10):1440-54.
154. AEMPS. Dasatinib.
155. AEMPS. Nilotinib.
156. AEMPS. Bosutinib.
157. O'Hare T, Walters DK, Stoffregen EP, Jia T, Manley PW, Mestan J, et al. In vitro activity of Bcr-Abl inhibitors AMN107 and BMS-354825 against clinically relevant imatinib-resistant Abl kinase domain mutants. *Cancer Res.* 2005;65(11):4500-5.
158. Puttini M, Coluccia AM, Boschelli F, Cleris L, Marchesi E, Donella-Deana A, et al. In vitro and in vivo activity of SKI-606, a novel Src-Abl inhibitor, against imatinib-resistant Bcr-Abl+ neoplastic cells. *Cancer Res.* 2006;66(23):11314-22.
159. AEMPS. Ponatinib.
160. Simoneau CA. Treating chronic myeloid leukemia: improving management through understanding of the patient experience. *Clin J Oncol Nurs.* 2013;17(1):E13-20.
161. Liu X, Rothe K, Yen R, Fruhstorfer C, Maetzig T, Chen M, et al. A novel AHI-1-BCR-ABL-DNM2 complex regulates leukemic properties of primitive CML cells through enhanced cellular endocytosis and ROS-mediated autophagy. *Leukemia.* 2017;31(11):2376-87.
162. Cáncer INd.
163. Efficace F, Baccarani M, Breccia M, Alimena G, Rosti G, Cottone F, et al. Health-related quality of life in chronic myeloid leukemia patients receiving long-term therapy with imatinib compared with the general population. *Blood.* 2011;118(17):4554-60.

164. Nowell PC. The minute chromosome (Ph1) in chronic granulocytic leukemia. *Blut*. 1962;8:65-6.
165. Etienne G, Guilhot J, Rea D, Rigal-Huguet F, Nicolini F, Charbonnier A, et al. Long-Term Follow-Up of the French Stop Imatinib (STIM1) Study in Patients With Chronic Myeloid Leukemia. *J Clin Oncol*. 2017;35(3):298-305.
166. Saussele S, Richter J, Guilhot J, Gruber FX, Hjorth-Hansen H, Almeida A, et al. Discontinuation of tyrosine kinase inhibitor therapy in chronic myeloid leukaemia (EURO-SKI): a prespecified interim analysis of a prospective, multicentre, non-randomised, trial. *Lancet Oncol*. 2018;19(6):747-57.
167. Okada M, Imagawa J, Tanaka H, Nakamae H, Hino M, Murai K, et al. Final 3-year Results of the Dasatinib Discontinuation Trial in Patients With Chronic Myeloid Leukemia Who Received Dasatinib as a Second-line Treatment. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2018;18(5):353-60 e1.
168. Mahon FX, Rea D, Guilhot J, Guilhot F, Huguet F, Nicolini F, et al. Discontinuation of imatinib in patients with chronic myeloid leukaemia who have maintained complete molecular remission for at least 2 years: the prospective, multicentre Stop Imatinib (STIM) trial. *Lancet Oncol*. 2010;11(11):1029-35.
169. Rousselot P, Charbonnier A, Cony-Makhoul P, Agape P, Nicolini FE, Varet B, et al. Loss of major molecular response as a trigger for restarting tyrosine kinase inhibitor therapy in patients with chronic-phase chronic myelogenous leukemia who have stopped imatinib after durable undetectable disease. *J Clin Oncol*. 2014;32(5):424-30.
170. Vigon L, Luna A, Galan M, Rodriguez-Mora S, Fuertes D, Mateos E, et al. Identification of Immunological Parameters as Predictive Biomarkers of Relapse in Patients with Chronic Myeloid Leukemia on Treatment-Free Remission. *J Clin Med*. 2020;10(1).
171. PubChem 2021 [Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>].
172. Hahnel T, Baldow C, Guilhot J, Guilhot F, Saussele S, Mustjoki S, et al. Model-Based Inference and Classification of Immunologic Control Mechanisms from TKI Cessation and Dose Reduction in Patients with CML. *Cancer Res*. 2020;80(11):2394-406.
173. Hayashi Y, Nakamae H, Katayama T, Nakane T, Koh H, Nakamae M, et al. Different immunoprofiles in patients with chronic myeloid leukemia treated with imatinib, nilotinib or dasatinib. *Leuk Lymphoma*. 2012;53(6):1084-9.
174. Ilander M, Olsson-Stromberg U, Schlums H, Guilhot J, Bruck O, Lahteenmaki H, et al. Increased proportion of mature NK cells is associated with successful imatinib discontinuation in chronic myeloid leukemia. *Leukemia*. 2017;31(5):1108-16.
175. Ishiyama K, Kitawaki T, Sugimoto N, Sozu T, Anzai N, Okada M, et al. Principal component analysis uncovers cytomegalovirus-associated NK cell activation in Ph(+) leukemia patients treated with dasatinib. *Leukemia*. 2017;31(1):203-12.
176. Adane T, Getawa S. Cytomegalovirus seroprevalence among blood donors: a systematic review and meta-analysis. *J Int Med Res*. 2021;49(8):3000605211034656.
177. Schlums H, Cichocki F, Tesi B, Theorell J, Beziat V, Holmes TD, et al. Cytomegalovirus infection drives adaptive epigenetic diversification of NK cells with altered signaling and effector function. *Immunity*. 2015;42(3):443-56.
178. Kared H, Martelli S, Ng TP, Pender SL, Larbi A. CD57 in human natural killer cells and T-lymphocytes. *Cancer Immunol Immunother*. 2016;65(4):441-52.
179. Kadowaki N, Ishiyama K, Kitawaki T. Cytomegalovirus pulls strings behind NK cells. *Oncotarget*. 2017;8(55):93297-8.
180. Lamb LS, Jr., Henslee-Downey PJ, Parrish RS, Godder K, Thompson J, Lee C, et al. Increased frequency of TCR gamma delta + T cells in disease-free survivors following T cell-depleted, partially mismatched, related donor bone marrow transplantation for leukemia. *J Hematother*. 1996;5(5):503-9.

181. Giansanti P, Preisinger C, Huber KV, Gridling M, Superti-Furga G, Bennett KL, et al. Evaluating the promiscuous nature of tyrosine kinase inhibitors assessed in A431 epidermoid carcinoma cells by both chemical- and phosphoproteomics. *ACS Chem Biol.* 2014;9(7):1490-8.
182. Bermejo M, Ambrosioni J, Bautista G, Climent N, Mateos E, Rovira C, et al. Evaluation of resistance to HIV-1 infection ex vivo of PBMCs isolated from patients with chronic myeloid leukemia treated with different tyrosine kinase inhibitors. *Biochem Pharmacol.* 2018;156:248-64.
183. Pogliaghi M, Papagno L, Lambert S, Calin R, Calvez V, Katlama C, et al. The tyrosine kinase inhibitor Dasatinib blocks in-vitro HIV-1 production by primary CD4+ T cells from HIV-1 infected patients. *AIDS.* 2014;28(2):278-81.
184. Baldauf HM, Pan X, Erikson E, Schmidt S, Daddacha W, Burggraf M, et al. SAMHD1 restricts HIV-1 infection in resting CD4(+) T cells. *Nat Med.* 2012;18(11):1682-7.
185. Lahouassa H, Daddacha W, Hofmann H, Ayinde D, Logue EC, Dragin L, et al. SAMHD1 restricts the replication of human immunodeficiency virus type 1 by depleting the intracellular pool of deoxynucleoside triphosphates. *Nat Immunol.* 2012;13(3):223-8.
186. Shultz LD, Ishikawa F, Greiner DL. Humanized mice in translational biomedical research. *Nat Rev Immunol.* 2007;7(2):118-30.
187. Salgado M, Martinez-Picado J, Galvez C, Rodriguez-Mora S, Rivaya B, Urrea V, et al. Dasatinib protects humanized mice from acute HIV-1 infection. *Biochem Pharmacol.* 2020;174:113625.
188. Schlaberg R, Fisher JG, Flamm MJ, Murty VV, Bhagat G, Alobeid B. Chronic myeloid leukemia and HIV-infection. *Leuk Lymphoma.* 2008;49(6):1155-60.
189. Peng B, Lloyd P, Schran H. Clinical pharmacokinetics of imatinib. *Clin Pharmacokinet.* 2005;44(9):879-94.
190. Wang L, Christopher LJ, Cui D, Li W, Iyer R, Humphreys WG, et al. Identification of the human enzymes involved in the oxidative metabolism of dasatinib: an effective approach for determining metabolite formation kinetics. *Drug Metab Dispos.* 2008;36(9):1828-39.
191. Antoniou T, Tseng AL. Interactions between antiretrovirals and antineoplastic drug therapy. *Clin Pharmacokinet.* 2005;44(2):111-45.
192. 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;59(2):284-91.
193. Garcia-Perez J, Sanchez-Palomino S, Perez-Olmeda M, Fernandez B, Alcami J. A new strategy based on recombinant viruses as a tool for assessing drug susceptibility of human immunodeficiency virus type 1. *J Med Virol.* 2007;79(2):127-37.
194. Brussel A, Sonigo P. Analysis of early human immunodeficiency virus type 1 DNA synthesis by use of a new sensitive assay for quantifying integrated provirus. *J Virol.* 2003;77(18):10119-24.
195. Dismuke DJ, Aiken C. Evidence for a functional link between uncoating of the human immunodeficiency virus type 1 core and nuclear import of the viral preintegration complex. *J Virol.* 2006;80(8):3712-20.
196. Bruner KM, Wang Z, Simonetti FR, Bender AM, Kwon KJ, Sengupta S, et al. A quantitative approach for measuring the reservoir of latent HIV-1 proviruses. *Nature.* 2019;566(7742):120-5.
197. Kinloch NN, Ren Y, Conce Alberto WD, Dong W, Khadka P, Huang SH, et al. HIV-1 diversity considerations in the application of the Intact Proviral DNA Assay (IPDA). *Nat Commun.* 2021;12(1):165.
198. Gastpar R, Gehrman M, Bausero MA, Asea A, Gross C, Schroeder JA, et al. Heat shock protein 70 surface-positive tumor exosomes stimulate migratory and cytolytic activity of natural killer cells. *Cancer Res.* 2005;65(12):5238-47.

199. Peluso MJ, Bacchetti P, Ritter KD, Beg S, Lai J, Martin JN, et al. Differential decay of intact and defective proviral DNA in HIV-1-infected individuals on suppressive antiretroviral therapy. *JCI Insight*. 2020;5(4).
200. Ho YC, Shan L, Hosmane NN, Wang J, Laskey SB, Rosenbloom DI, et al. Replication-competent noninduced proviruses in the latent reservoir increase barrier to HIV-1 cure. *Cell*. 2013;155(3):540-51.
201. Katusiime MG, Halvas EK, Wright I, Joseph K, Bale MJ, Kirby-McCullough B, et al. Intact HIV Proviruses Persist in Children Seven to Nine Years after Initiation of Antiretroviral Therapy in the First Year of Life. *J Virol*. 2020;94(4).
202. Siliciano JD, Kajdas J, Finzi D, Quinn TC, Chadwick K, Margolick JB, et al. Long-term follow-up studies confirm the stability of the latent reservoir for HIV-1 in resting CD4+ T cells. *Nat Med*. 2003;9(6):727-8.
203. Huang SH, Ren Y, Thomas AS, Chan D, Mueller S, Ward AR, et al. Latent HIV reservoirs exhibit inherent resistance to elimination by CD8+ T cells. *J Clin Invest*. 2018;128(2):876-89.
204. Rodriguez-Munoz J, Moreno S. Strategies for the cure of HIV infection. *Enferm Infecc Microbiol Clin (Engl Ed)*. 2019;37(4):265-73.
205. Bermejo M, Lopez-Huertas MR, Garcia-Perez J, Climent N, Descours B, Ambrosioni J, et al. Dasatinib inhibits HIV-1 replication through the interference of SAMHD1 phosphorylation in CD4+ T cells. *Biochem Pharmacol*. 2016;106:30-45.
206. Szaniawski MA, Spivak AM, Cox JE, Catrow JL, Hanley T, Williams E, et al. SAMHD1 Phosphorylation Coordinates the Anti-HIV-1 Response by Diverse Interferons and Tyrosine Kinase Inhibition. *mBio*. 2018;9(3).
207. Chen CI, Maecker HT, Lee PP. Development and dynamics of robust T-cell responses to CML under imatinib treatment. *Blood*. 2008;111(11):5342-9.
208. Hassold N, Seystahl K, Kempf K, Urlaub D, Zekl M, Einsele H, et al. Enhancement of natural killer cell effector functions against selected lymphoma and leukemia cell lines by dasatinib. *Int J Cancer*. 2012;131(6):E916-27.
209. Chang MC, Cheng HI, Hsu K, Hsu YN, Kao CW, Chang YF, et al. NKG2A Down-Regulation by Dasatinib Enhances Natural Killer Cytotoxicity and Accelerates Effective Treatment Responses in Patients With Chronic Myeloid Leukemia. *Front Immunol*. 2018;9:3152.
210. Kreutzman A, Juvonen V, Kairisto V, Ekblom M, Stenke L, Seggewiss R, et al. Mono/oligoclonal T and NK cells are common in chronic myeloid leukemia patients at diagnosis and expand during dasatinib therapy. *Blood*. 2010;116(5):772-82.
211. Kreutzman A, Ladell K, Koechel C, Gostick E, Ekblom M, Stenke L, et al. Expansion of highly differentiated CD8+ T-cells or NK-cells in patients treated with dasatinib is associated with cytomegalovirus reactivation. *Leukemia*. 2011;25(10):1587-97.
212. Robertson MJ, Ritz J. Biology and clinical relevance of human natural killer cells. *Blood*. 1990;76(12):2421-38.
213. Franks SE, Wolfson B, Hodge JW. Natural Born Killers: NK Cells in Cancer Therapy. *Cancers (Basel)*. 2020;12(8).
214. Myers JA, Miller JS. Exploring the NK cell platform for cancer immunotherapy. *Nat Rev Clin Oncol*. 2021;18(2):85-100.
215. Mustjoki S, Auvinen K, Kreutzman A, Rousselot P, Hernesniemi S, Melo T, et al. Rapid mobilization of cytotoxic lymphocytes induced by dasatinib therapy. *Leukemia*. 2013;27(4):914-24.
216. Schiffer CA, Cortes JE, Hochhaus A, Saglio G, le Coutre P, Porkka K, et al. Lymphocytosis after treatment with dasatinib in chronic myeloid leukemia: Effects on response and toxicity. *Cancer*. 2016;122(9):1398-407.
217. Cannon MJ, Schmid DS, Hyde TB. Review of cytomegalovirus seroprevalence and demographic characteristics associated with infection. *Rev Med Virol*. 2010;20(4):202-13.

218. Migueles SA, Osborne CM, Royce C, Compton AA, Joshi RP, Weeks KA, et al. Lytic granule loading of CD8+ T cells is required for HIV-infected cell elimination associated with immune control. *Immunity*. 2008;29(6):1009-21.
219. Yukl SA, Boritz E, Busch M, Bentsen C, Chun TW, 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.
220. Pallikkuth S, Sharkey M, Babic DZ, Gupta S, Stone GW, Fischl MA, et al. Peripheral T Follicular Helper Cells Are the Major HIV Reservoir within Central Memory CD4 T Cells in Peripheral Blood from Chronically HIV-Infected Individuals on Combination Antiretroviral Therapy. *J Virol*. 2015;90(6):2718-28.
221. Kulpa DA, Talla A, Brehm JH, Ribeiro SP, Yuan S, Bebin-Blackwell AG, et al. Differentiation into an Effector Memory Phenotype Potentiates HIV-1 Latency Reversal in CD4(+) T Cells. *J Virol*. 2019;93(24).
222. Benito JM, Lopez M, Lozano S, Gonzalez-Lahoz J, Soriano V. Down-regulation of interleukin-7 receptor (CD127) in HIV infection is associated with T cell activation and is a main factor influencing restoration of CD4(+) cells after antiretroviral therapy. *J Infect Dis*. 2008;198(10):1466-73.
223. Tremeaux P, Lenfant T, Boufassa F, Essat A, Melard A, Gousset M, et al. Increasing contribution of integrated forms to total HIV DNA in blood during HIV disease progression from primary infection. *EBioMedicine*. 2019;41:455-64.
224. Zerbato JM, McMahon DK, Sobolewski MD, Mellors JW, Sluis-Cremer N. Naive CD4+ T Cells Harbor a Large Inducible Reservoir of Latent, Replication-competent Human Immunodeficiency Virus Type 1. *Clin Infect Dis*. 2019;69(11):1919-25.
225. Venanzi Rullo E, Cannon L, Pinzone MR, Ceccarelli M, Nunnari G, O'Doherty U. Genetic Evidence That Naive T Cells Can Contribute Significantly to the Human Immunodeficiency Virus Intact Reservoir: Time to Re-evaluate Their Role. *Clin Infect Dis*. 2019;69(12):2236-7.
226. De Boer RJ, Perelson AS. Quantifying T lymphocyte turnover. *J Theor Biol*. 2013;327:45-87.
227. EMA. SPRYCEL EPAR Product information.
228. Ambrosioni J, Coiras M, Alcamí J, Miro JM. Potential role of tyrosine kinase inhibitors during primary HIV-1 infection. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2017;15(5):421-3.
229. Breccia M, Girmenia C, Latagliata R, Loggisci G, Santopietro M, Federico V, et al. Low incidence rate of opportunistic and viral infections during imatinib treatment in chronic myeloid leukemia patients in early and late chronic phase. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 2011;3(1):e2011021.
230. Rodriguez GH, Ahmed SI, Al-akhrass F, Rallapalli V, Safdar A. Characteristics of, and risk factors for, infections in patients with cancer treated with dasatinib and a brief review of other complications. *Leuk Lymphoma*. 2012;53(8):1530-5.
231. Reinwald M, Boch T, Hofmann WK, Buchheidt D. Risk of Infectious Complications in Hemato-Oncological Patients Treated with Kinase Inhibitors. *Biomark Insights*. 2015;10(Suppl 3):55-68.
232. Johnson FM, Agrawal S, Burris H, Rosen L, Dhillon N, Hong D, et al. Phase 1 pharmacokinetic and drug-interaction study of dasatinib in patients with advanced solid tumors. *Cancer*. 2010;116(6):1582-91.
233. Nguyen T, McNicholl I, Custodio JM, Szwarcberg J, Piontkowsky D. Drug Interactions with Cobicistat- or Ritonavir-Boosted Elvitegravir. *AIDS Rev*. 2016;18(2):101-11.
234. Stolbach A, Paziana K, Heverling H, Pham P. A Review of the Toxicity of HIV Medications II: Interactions with Drugs and Complementary and Alternative Medicine Products. *J Med Toxicol*. 2015;11(3):326-41.

# PUBLICACIONES

1. **Vigón L**, Vázquez-Morón S, Berenguer J, González-García J, Jiménez-Sousa MÁ, Guardiola JM, Crespo M, de Los Santos I, Von Wichmann MA, Carrero A, Yélamos MB, Gómez J, Resino S, Martínez I; GESIDA 3603b Cohort Study Group. Rapid decrease in titer and breadth of neutralizing anti-HCV antibodies in HIV/HCV-coinfected patients who achieved SVR. *Sci Rep.* 2019 Aug 21;9(1):12163. doi: 10.1038/s41598-019-48592-5. PMID: 31434968; PMCID: PMC6704069.
2. Rodríguez-Mora S, De Wit F, García-Perez J, Bermejo M, López-Huertas MR, Mateos E, Martí P, Rocha S, **Vigón L**, Christ F, Debyser Z, Vílchez JJ, Coiras M, Alcamí J. The mutation of Transportin 3 gene that causes limb girdle muscular dystrophy 1F induces protection against HIV-1 infection. *PLoS Pathog.* 2019 Aug 29;15(8):e1007958. doi: 10.1371/journal.ppat.1007958. PMID: 31465518; PMCID: PMC6715175.
3. **Vigón L\***, Rodríguez-Mora S\*, Luna A, Sandonís V, Mateos E, Bautista G, Steegmann JL, Climent N, Plana M, Pérez-Romero P, de Ory F, Alcamí J, García-Gutierrez V, Planelles V, López-Huertas MR, Coiras M. Cytotoxic cell populations developed during treatment with tyrosine kinase inhibitors protect autologous CD4+ T cells from HIV-1 infection. *Biochem Pharmacol.* 2020 Dec;182:114203. doi: 10.1016/j.bcp.2020.114203. Epub 2020 Aug 20. PMID: 32828803; PMCID: PMC7686055.
4. **Vigón L**, Luna A, Galán M, Rodríguez-Mora S, Fuertes D, Mateos E, Piris-Villaespesa M, Bautista G, San José E, Rivera-Torres J, Steegmann JL, de Ory F, Pérez-Olmeda M, Alcamí J, Planelles V, López-Huertas MR, García-Gutiérrez V, Coiras M. Identification of Immunological Parameters as Predictive Biomarkers of Relapse in Patients with Chronic Myeloid Leukemia on Treatment-Free Remission. *J Clin Med.* 2020 Dec 25;10(1):42. doi: 10.3390/jcm10010042. PMID: 33375572; PMCID: PMC7795332.
5. **Vigón L**, Fuertes D, García-Pérez J, Torres M, Rodríguez-Mora S, Mateos E, Corona M, Saez-Marín AJ, Malo R, Navarro C, Murciano-Antón MA, Cervero M, Alcamí J, García-Gutiérrez V, Planelles V, López-Huertas MR, Coiras M. Impaired Cytotoxic Response in PBMCs From Patients With COVID-19 Admitted to the ICU: Biomarkers to Predict Disease Severity. *Front Immunol.* 2021 May 26;12:665329. doi: 10.3389/fimmu.2021.665329. PMID: 34122423; PMCID: PMC8187764.
6. **Vigón L**, García-Pérez J, Rodríguez-Mora S, Torres M, Mateos E, Castillo de la Osa M, Cervero M, Malo De Molina R, Navarro C, Murciano-Antón MA, García-Gutiérrez V, Planelles V, Alcamí J, Pérez-Olmeda M, Coiras M, López-Huertas MR. Impaired Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity in a Spanish Cohort of Patients With COVID-19 Admitted to the ICU. *Front Immunol.* 2021 Sep 20;12:742631. doi: 10.3389/fimmu.2021.742631. PMID: 34616404; PMCID: PMC8488389.
7. **Vigón L**, Martínez-Román P, Rodríguez-Mora S, Torres M, Puertas MC, Mateos E, Salgado M, Navarro A, Sánchez-Conde M, Ambrosioni J, Cervero M, Wyen C, Hoffmann C, Miró JM, Alcamí J, Podzamczar D, García-Gutiérrez V, Martínez-Picado J, Briz V, Rosa López-Huertas M, Planelles V, Coiras M; Multidisciplinary Group of Study of HIV-1 Reservoir MGS-HIVRES. Provirus reactivation is impaired in HIV-1 infected individuals on treatment with dasatinib and antiretroviral therapy. *Biochem Pharmacol.* 2021 Oct;192:114666. doi: 10.1016/j.bcp.2021.114666. Epub 2021 Jun 26. PMID: 34186065; PMCID: PMC8478809.
8. Galán M\*, **Vigón L\***, Fuertes D, Murciano-Antón MA, Casado-Fernández G, Domínguez-Mateos S, Mateos E, Ramos-Martín F, Planelles V, Torres M, Rodríguez-Mora S, López-Huertas MR, Coiras M. Persistent Overactive Cytotoxic Immune Response in a Spanish Cohort of Individuals With Long-COVID: Identification of Diagnostic Biomarkers. *Front Immunol.* 2022 Mar 25;13:848886. doi: 10.3389/fimmu.2022.848886. PMID: 35401523; PMCID: PMC8990790.



9. **Vigón L**, Sánchez-Tornero A, Rodríguez-Mora S, García-Pérez J, Corona de Lapuerta M, Pérez-Lamas L, Casado-Fernández G, Moreno G, Torres M, Mateos E, Murciano-Antón MA, Alcamí J, Pérez-Olmeda M, López-Jiménez J, García-Gutiérrez V, Coiras M, On Behalf Of Multidisciplinary Group Of Study Of Covid-Mgs-Covid. Strong Cellular Immune Response, but Not Humoral, against SARS-CoV-2 in Oncohematological Patients with Autologous Stem Cell Transplantation after Natural Infection. *J Clin Med.* 2022 Apr 11;11(8):2137. doi: 10.3390/jcm11082137. PMID: 35456230; PMCID: PMC9032116.
10. Torres M\*, Casado G\*, **Vigón L\***, Rodríguez-Mora S, Mateos E, Ramos-Martín F, López-Wolf D, Sanz-Moreno J, Ryan-Murua P, Taboada-Martínez ML, López-Huertas MR, Cervero M, Coiras M; Multidisciplinary Group of Study of COVID-19 (MGS-COVID); Contributing members of the Multidisciplinary Group of Study of COVID-19 (in alphabetical order). Changes in the immune response against SARS-CoV-2 in individuals with severe COVID-19 treated with high dose of vitamin D. *Biomed Pharmacother.* 2022 Apr 14;150:112965. doi: 10.1016/j.biopha.2022.112965. Epub ahead of print. PMID: 35468580.
11. Rodríguez-Mora S, Corona M, Torres M, Casado-Fernández G, García-Pérez J, Ramos-Martín F, **Vigón L**, Manzanares M, Mateos E, Martín-Moro F, Zurdo-Castronuño A, Murciano-Antón MA, Alcamí J, Pérez-Olmeda M, López-Jiménez J, García-Gutiérrez V, Coiras M, On Behalf Of The Multidisciplinary Group Of Study Of Covid-Mgs-Covid. Early Cellular and Humoral Responses Developed in Oncohematological Patients after Vaccination with One Dose against COVID-19. *J Clin Med.* 2022 May 16;11(10):2803. doi: 10.3390/jcm11102803. PMID: 35628927; PMCID: PMC9147947.