Universitat Autònoma de Barcelona

Caracterització funcional de limfòcits T en individus VIH amb pobra recuperació immunològica. Estudi dels mecanismes implicats en la resposta immunodiscordant al tractament antiretroviral

Elisabet Gómez Mora

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons: http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons: http://es.creativecommons.org/blog/licencias/

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license: https://creativecommons.org/licenses/?lang=en

Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i d'Immunologia
Facultat de Medicina
Universitat Autònoma de Barcelona

Caracterització funcional de limfòcits T en individus VIH$^+$ amb pobra recuperació immunològica.

Estudi dels mecanismes implicats en la resposta immunodiscordant al tractament antiretroviral

Elisabet Gómez Mora

Institut de Recerca de la Sida (IrsiCaixa), Hospital Germans Trias i Pujol i
Institut d'Investigació en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol (IGTP)

Memòria de la tesi presentada per obtenir el grau de Doctora en Immunologia
per la Universitat Autònoma de Barcelona, maig de 2017

Directors: Dra. Cecilia Cabrera i Dr. Julià Blanco

La Dra. Cecilia Cabrera Navarro (Directora) i Julià Blanco Arbués (Director i Tutor), investigadors de l'Institut de Recerca de la Sida (IrsiCaixa) i de l'Institut d'Investigació en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol (IGTP) de l'Hospital Germans Trias i Pujol,

Fan constar:

Que el treball experimental i la redacció de la memòria de la Tesi doctoral titulada ***"Caracterització funcional de limfòcits T en individus VIH⁺ amb pobra recuperació immunològica. Estudi dels mecanismes implicats en la resposta immunodiscordant al tractament antiretroviral"*** ha estat realitzat per n'Elisabet Gómez Mora sota llur direcció i tutoria i consideren que és apta per ser presentada per optar el grau de Doctora en Immunologia per la Universitat Autònoma de Barcelona.

I per tal que quedi constància, signen aquest document.

Badalona, 24 de maig de 2017.

Dra. Cecilia Cabrera Navarro

Dr. Julià Blanco Arbués

Disseny portada: Jordi Brunet, 2017

Aquest treball ha rebut el suport del projecte EC-11-045 (Ministerio de Sanidad y Política Social), la '*Red Temática Cooperativa de Investigación en SIDA*' (RD12/0017/0002) cofundada per l'*Instituto de Salud Carlos III* (ISCIII) i el *European Fund for Regional Development* (FEDER)), I *el International Scientific Cooperation Proje*ct (PICS N°159836, *Le Centre national de la recherche scientifique* CNRS).

La impressió d'aquesta tesi ha estat possible gràcies al finançament de la Universitat Autònoma de Barcelona.

"Nothing in life is to be feared, it is only to be understood"

Marie Curie

ÍNDEX

Resum 3
Abstract 4
Resumen 5
Abreviacions 7

INTRODUCCIÓ 9

1. El sistema immunitari 11
1.1. Resposta immunitària innata i adaptativa 11
1.2. Diferenciació de cèl·lules B 12
1.3. Diferenciació de cèl·lules T 13
2. El virus de la immunodeficiència humana 16
2.1. Origen de la pandèmia i epidemiologia 16
2.2. VIH-1, agent etiològic 17
2.3. Curs natural de la infecció per VIH 18
2.4. Desregulació de l'homeòstasi cel·lular durant la infecció per VIH 19
2.5. Continua activació immunitària i conseqüències 22
2.6. Resposta immunològica a TARGA: reconstitució quantitativa i qualitativa 24
2.7. Resposta immunoconcordant i immunodiscordant 27
3. Infecció pel CMV i coinfecció VIH-CMV 35
3.1. Característiques generals i epidemiologia 35
3.2. Infecció pel CMV 35
3.3 Diagnòstic de la infecció pel CMV 36
3.4. Control immunològic de la infecció pel CMV 37
3.5. Coinfecció VIH-CMV 39
4. Autofàgia i infecció pel VIH 43
4.1. Auto-canibalisme regulat 43
4.2. Mesurant autofàgia 44
4.3. Supervivència vs. mort cel·lular 45
4.4. Autofàgia i resposta immunitària 46
4.5. Autofàgia i VIH. Rivals o aliats? 50

HIPÒTESIS i OBJECTIUS 53

RESULTATS 57

CAPÍTOL I 59

Anàlisi de la recuperació de la funció cel·lular policlonal i específica (VIH i CMV) en individus VIH$^+$ en TARGA i suprimits virològicament . 59

Abstract 61
Introduction 62
Methods 63

Results 66
Discussion 77
References 82
Supplementary data 86
CAPÍTOL II 89
Estudi de la resposta humoral contra CMV en individus VIH⁺ en TARGA i suprimits virològicament 89
Abstract 91
Introduction.....92
Methods.....93
Results 94
Discussion 102
References 106
Supplementary data 109
CAPÍTOL III 111
Estudi de la resposta autofàgica en cèl·lules T CD4 d'individus VIH⁺ en TARGA i suprimits virològicament 111
Abstract 113
Introduction.....113
Methods.....114
Results 115
Discussion 120
References 123
DISCUSSIÓ FINAL 125
CONCLUSIONS..... 135
PUBLICACIONS 139
BIBLIOGRAFIA 143

Resum

La pobra recuperació immunològica que té lloc en una proporció d'individus VIH$^+$ després d'iniciar TARGA s'ha associat a un perfil de maduració cel·lular alterat, un estat elevat d'inflamació, senescència accelerada i hiperactivació immunològica, però es desconeix l'impacte que totes aquestes alteracions tenen en la recuperació de la funcionalitat del compartiment de limfòcits T. En l'estudi dels mecanismes que poden associar-se a la resposta immunodiscordant s'ha descrit que la infecció per CMV contribueix a l'increment de l'activació immunológica, però es desconeix el paper que té la resposta CMV-especifica en les alteracions immunològiques d'individus immunodiscordants. A més, donat que l'apoptosi en cèl·lules T CD4 està altament associada amb una pobra recuperació immunològica, el procés d'autofàgia, associat a resposta inflamatòria i a mort cel·lular, podria estar també involucrat en la resposta immunodiscordant. Per això, els objectius d'aquesta tesi van ser determinar (i) el nivell funcional del compartiment T CD4 i CD8, (ii) la resposta immunitària, cel·lular i humoral contra CMV i (iii) la capacitat de les cèl·lules T CD4 d'activar autofàgia en un grup d'individus VIH$^+$ virològicament suprimits per TARGA i amb resposta immunològica favorable o no favorable. Els nostres resultats mostren que els individus immunodiscordants mantenen la funcionalitat cel·lular policlonal i virus-específica en comparació amb individus immunoconcordants o amb població VIH-negativa. Els individus immunodiscordants presenten una major resposta cel·lular i humoral CMV-específica que estaria impulsada per reactivacions asimptomàtiques repetides al llarg del temps. S'ha observat també una autofàgia disminuïda en cèl·lules T CD4 d'individus immunodiscordants que podria estar contribuint a l'estat d'activació i inflamació elevat d'aquests individus. Així, els nostres resultats mostren en conjunt que el individus immunodiscordants, malgrat presentar alteracions immunològiques, tenen una diversitat funcional conservada. L'estat d'hiperactivació observat en individus immunodiscordants, a més, podria estar associat a un major nombre de reactivacions de CMV i una menor autofàgia al compartiment T CD4, que a la vegada conduiria a una elevada resposta immunitària CMV-especifica, contribuint al perfil de maduració alterat i el major risc de progressió clínica observada en aquest grup.

Abstract

Poor immune recovery after HAART observed in a proportion of HIV$^+$ individuals has been associated with an altered cell maturation profile, elevated inflammation, accelerated senescence and immune hyperactivation. However, the impact that all of these alterations have on the T-cell functionality is unknown. Beside other mechanisms associated with the immunodiscordant response, it has been described that CMV infection contributes to an increased immune activation, although the role of the CMV-specific response among other immunological alterations related to immunodiscordant individuals is unknown. In addition, since apoptosis in CD4 T cells is highly associated with poor immune recovery, the autophagy process, which is involved in inflammation and cell death, may also contribute to the immunodiscordant response. Therefore, the objectives of this thesis were to determine (i) the functional level of the CD4 and CD8 T-cell compartments, (ii) the cellular and humoral immune response against CMV and (iii) the ability of CD4 T cells to activate autophagy in a group of virologically suppressed treated HIV$^+$ individuals with favorable or unfavorable immune response. Our results show that immunodiscordant individuals maintain polyclonal and virus-specific cellular functionality as compared to immunoconcordant individuals or HIV-negative populations. Immunodiscordant individuals have a greater cellular and humoral CMV-specific response that would be driven by repeated asymptomatic reactivations over time. Decreased autophagy has also been observed in CD4 T cells from immunodiscordant individuals, and this fact may be contributing to the high activation and inflammation status of these individuals. Our results show that immunodiscordant individuals exhibit a conserved functional diversity and that the hyperactivation state observed in these individuals could be associated with a greater number of CMV reactivations and impaired autophagy in CD4 T cells, leading to a high CMV-specific immune response and driving the altered maturation profile and the increased risk of clinical progression observed in this group.

Resumen

La pobre recuperación inmunológica que se da en una proporción de individuos VIH$^+$ después de iniciar TARGA se ha asociado a un perfil de maduración celular alterado, un estado elevado de inflamación, senescencia acelerada y hiperactivación immunològica; pero se desconoce el impacto que todas estas alteraciones tienen en la recuperación de la funcionalidad del compartimento de linfocitos T. En el estudio de los mecanismos que se asocian a la respuesta inmunodiscordante se ha descrito que la infección por CMV contribuye al incremento de la activación inmunológica, pero se desconoce el papel que tiene la respuesta CMV-especifica en las alteraciones inmunológicas de estos individuos. Además, dado que la apoptosis en células T CD4 está altamente asociada con una pobre recuperación inmune, el proceso de autofagia, asociado a inflamación y muerte celular, podría estar también involucrado en la respuesta inmunodiscordante. Por ello, los objetivos de esta tesis fueron determinar (i) el nivel funcional del compartimento T CD4 y CD8, (ii) la respuesta inmune celular y humoral contra CMV y (iii) la capacidad de las células T CD4 de activar autofagia en un grupo de individuos VIH$^+$ en TARGA y virológicamente suprimidos con respuesta inmunológica favorable o no favorable. Nuestros resultados muestran que los individuos inmunodiscordantes mantienen la funcionalidad celular policlonal y virus-específica en comparación con individuos inmunoconcordantes o población VIH-negativa. Los individuos inmunodiscordantes presentan una mayor respuesta celular y humoral CMV-específica que estaría impulsada por reactivaciones asintomáticas repetidas a lo largo del tiempo. Se ha observado también una autofagia disminuida en células T CD4 de individuos inmunodiscordantes que podría estar contribuyendo al estado de activación y inflamación elevado de estos individuos. Nuestros resultados muestran en conjunto que los individuos inmunodiscordantes presentan una diversidad funcional conservada y que el estado de hiperactivación observado en estos individuos, podría estar asociado a un mayor número de reactivaciones de CMV y una menor autofagia en el compartimento T CD4, que a su vez conduciría a una elevada respuesta inmunitaria CMV-especifica, contribuyendo al perfil de maduración alterado y el mayor riesgo de progresión clínica observada en este grupo.

Abreviacions

ADN	Àcid desoxiribonucleic
APC	Cèl·lula presentadora d'antigen (*Antigen Presenting Cell*)
ARN	Àcid ribonucleic
Atg	Gen relacionat amb autofàgia (*Autophagy-related Genes*)
ATG	Proteïna relacionada amb autofàgia
CMV	Citomegalovirus
CLP	Precursor limfoide comú (*Common Lymphoid Precursor*)
CTL	Limfòcit T citotòxic (*Cytotoxic Lymphocyte*)
CV	Càrrega viral
DC	Cèl·lula dendrítica (*Dendrític Cell*)
EBV	Virus Epstein-Barr
GALT	Teixit limfoide associat a mucosa gastro-intestinal (*Gut Associated Lymphoid Tissue*)
HSC	Cèl·lula mare hematopoètica (*Hematopoietic Stem Cell*)
Ig	Immunoglobulina
IFN- γ	Interferó gamma
IL-2	Interleuquina 2
LC3	Cadena lleugera 3 de la proteïna 1A/1B associada a microtúbuls. (*Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3*)
LPS	Lipopolisacàrid
MHC	Complex Major d'Histocompatibilitat (*Major Histocompatibility Complex*)
NK	Cèl·lula assassina natural (*Natural Killer*)
PD-1	Receptor de Mort programada 1 (*Program Cell Death 1*)
ROS	Espècies reactives de l'oxigen (*Reactive Oxigen Species*)
sCD14	CD14 soluble
TAR	Tractament antiretroviral
TARGA	Tractament antiretroviral de gran activitat
TCR	Receptor de cèl·lula T (T-cell Receptor)
TEC	Cèl·lula tímica epitelial (*Thymic Epithelial Cell*)

TLR	Receptor de tipus *Toll (Toll-like Receptor)*
TNF-α	Factor de necrosi tumoral (*Tumor Necrosis Factor*)
VHC	Virus de l'hepatitis C
VIH	Virus de la immunodeficiència humana

INTRODUCCIÓ

1. El sistema immunitari

El sistema immunològic està format per molècules, cèl·lules, teixits i òrgans que en conjunt tenen la funció de protegir l'organisme en front d'agressions externes o internes. Els diferents tipus cel·lulars del sistema immunitari es generen a la medul·la òssia, des d'on maduraran i migraran per la sang fins ser reclutats pel teixit afectat, on actuaran com a cèl·lules efectores i eliminaran l'organisme invasor (paràsits, fongs, bacteris o virus) (1).

1.1. Resposta immunitària innata i adaptativa

La defensa del sistema immunitari en front els patògens es pot dividir en dos tipus de resposta: la resposta innata i l'adaptativa, implicades en la coordinació de la resposta immunitària global i en el manteniment de l'homeòstasi cel·lular.

La **resposta innata** és essencial en la iniciació i posterior coordinació de la resposta adaptativa, a l'hora que participa en l'eliminació de patògens intracel·lulars i extracel·lulars. Els principals elements de la resposta innata inclouen barreres anatòmiques (cèl·lules epitelials), factors solubles (com el complement, citocines o pèptids antimicrobians i defensines), factors cel·lulars (factors de restricció) i una diversitat de cèl·lules incloent cèl·lules assassines naturals (NKs), granulòcits i cèl·lules fagocítiques, com cèl·lules dendrítiques (DCs) i macròfags. L'activació de la resposta innata és ràpida i va acompanyada de l'alliberació de factors solubles que inicien la resposta contra patògens en mucoses i teixits, permetent la seva eliminació i contenció fins que es genera la resposta immunitària adaptativa (2). Així doncs, la resposta immunitària innata limita la disseminació de patògens, indueix respostes inflamatòries locals, evita l'establiment de la infecció i elimina residus patogènics.

La **resposta adaptativa**, antigen-específica, necessita diversos dies o setmanes fins a ser protectora. Els components de la resposta immunitària adaptativa són els limfòcits B (responsables de la resposta immunitària humoral) i els limfòcits T (responsables de la resposta immunitària mitjançada per cèl·lules). En el cas dels limfòcits T, la inducció de la resposta adaptativa s'inicia al teixit infectat, on les DCs

immadures fagociten el patogen, activant-se i migrant seguidament a teixits limfoides perifèrics, on presentaran l'antigen a limfòcits T. L'activació de les cèl·lules B es produeix mitjançant la unió directa de l'antigen al receptor de cèl·lula B i pot ser dependent o independent de cél·lules T. Per tal de generar un número suficient de limfòcits antigen-específics efectors que puguin combatre les infeccions de l'organisme, un limfòcit amb una especificitat determinada ha d'activar-se i proliferar abans d'assolir la diferenciació final. Aquest procés es coneix com expansió clonal, i és característic de totes les respostes immunitàries adaptatives. Els limfòcits B activats es diferencien en cèl·lules plasmàtiques i secreten anticossos específics d'antigen. Les cèl·lules T activades es converteixen en cèl·lules efectores, amb capacitat d'eliminar cèl·lules infectades o activar altres cèl·lules dels sistema immunitari. Les cèl·lules efectores posseeixen un temps de vida limitat i, tot i que de forma general moren per apoptosi una vegada eliminat l'antigen, algunes romanen com a cèl·lules memòria circulants, constituint la memòria immunològica. Aquestes cèl·lules memòria garanteixen una resposta més ràpida i efectiva en posteriors re-trobaments amb patògens, facilitant per tant una immunitat protectora a llarg termini (1).

Les cèl·lules de la resposta innata i adaptativa, així com altres tipus cel·lulars (cèl·lules estromals), secreten citocines que són importants mediadors de la resposta immunitària i que coordinen moltes de les seves funcions pròpies. Les citocines són proteïnes similars a les hormones, les quals faciliten la comunicació entre les cèl·lules immunitàries i juguen un paper integral en la iniciació, perpetuació, i el descens de la funció efectora de la resposta immunitària (3). D'aquesta forma, les citocines participen en els processos inflamatoris i en la diferenciació i maduració cel·lular.

1.2. Diferenciació de cèl·lules B

El desenvolupament dels limfòcits B té lloc a la medul·la òssia amb el procés seqüencial de re-ordenament d'immunoglobulines (Ig) (4). Les cèl·lules B poden generar cinc isotips principals d'immunoglobulines: IgM, IgD, IgG, IgE i IgA (5). La resposta immunitària humoral s'inicia amb la secreció d'IgMs, les quals presenten una afinitat baixa però una especialització alta, sent les primeres en contactar amb

l'antigen, però ràpidament progressa a la producció d'altres isotips, donant pas a immunoglobulines d'afinitat més elevada (IgG). Les IgMs es troben confinades principalment en sang. Les IgGs es troben principalment en sang i fluid extracel·lular, on poden neutralitzar toxines, virus i bacteris, que opsonitzen perquè puguin ser fagocitats i activar el sistema del complement. Les IgA són abundants en secrecions mucoses d'epiteli intestinal i respiratori i les IgE es troben en nivells molt baixos en sang units a la superfície de mastòcits (1).

1.3. Diferenciació de cèl·lules T

La població de limfòcits T juga un paper clau en la resposta immunitària en front infeccions i càncer. Tot i que el compartiment T és molt ampli i heterogeni, s'han descrit diversos estadis de diferenciació basats en la funcionalitat i l'expressió de diferents marcadors de superfície com CD45RA o CD45RO, CCR7, CD62, CD95, CD27 i CD28, que juntament amb la llargada relativa dels telòmers i l'expressió de receptors intracel·lulars proporcionen informació de l'estat de maduració de la cèl·lula (6,7). A nivell funcional, de forma general, s'assumeix que les cèl·lules $CCR7^+$ es caracteritzen per la secreció d'IL-2 i la inhabilitat de secretar IFN-γ i, contràriament, les cèl·lules $CCR7^-$ es caracteritzen funcionalment per la secreció d'IFN-γ (8). Tot i així, diversos estudis han descrit la capacitat de produir IFN-γ per part de cèl·lules $CCR7^+$ (9–11).

El llinatge de cèl·lules T deriva de cèl·lules mare hematopoètiques (HSCs) de la medul·la òssia, les quals migren a timus per completar la seva maduració: timòcits immadurs $CD4^-CD8^-$ maduren a $CD4^+$ o $CD8^+$ per selecció positiva i negativa, adquirint la capacitat de reconèixer antígens no propis. Aquestes cèl·lules apareixen en perifèria com a emigrants tímics recents que encara no s'han trobat amb antigen i passen a formar part dels limfòcits **T naïve (T_N)** que romanen en sang durant la vida adulta reduint-se amb l'edat degut a l'acumulació d'episodis d'estimulació antigènica. La unió de l'antigen específic condueix a l'activació de la cèl·lula naïve, l'expansió clonal i la generació de cèl·lules T efectores (T_E), les quals migren a teixits perifèrics i presenten funcions efectores immediates durant la infecció primària (12). Els limfòcits T efectors

tenen una vida molt curta i després de l'eliminació de l'antigen la majoria moren. Només una petita proporció sobreviu i roman a l'organisme per conferir protecció en front futurs contactes amb el mateix antigen. Aquesta població T de memòria és de vida llarga i pot activar funcions efectores de forma molt ràpida i expandir-se acceleradament després de re-exposicions antigèniques (13). Les cèl·lules T memòria es poden dividir en diferents subpoblacions que difereixen en quant a capacitats proliferatives i funcionals (7,8,14) (Figura 1). Les cèl·lules **de memòria centrals (T_{CM})** són de vida llarga, migren a teixit limfoide i es localitzen en nòduls limfàtics, melsa i sang conferint protecció a llarg termini. Quan es troben amb l'antigen produeixen principalment IL-2 i proliferen, diferenciant-se en cèl·lules efectores i produint grans quantitats de IFN-γ o IL-4. Les cèl·lules **de memòria efectores (T_{EM})** estan involucrades en protecció immediata, ràpidament migren a teixits perifèrics inflamats i desenvolupen una funció efectora potent. Les T_{EM} CD8 expressen grans quantitats de perforina i tant les T_{EM} CD4 com les CD8 produeixen IFN-γ, IL-2 i IL-5 poques hores desprès de l'estimulació antigènica, tot i que tenen una capacitat proliferativa reduïda. L'últim estadi de cèl·lules memòria són les cèl·lules **de memòria efectores que re-expressen CD45RA (T_{EMRA})**, una població efectora altament diferenciada sent les cèl·lules que expressen més perforina, però sense capacitat proliferativa i amb nivells més elevats d'esgotament cel·lular i senescència immunitària (8) (Figura 1).

Estudis recents han posat de manifest que la magnitud de la resposta immunitària no està directament relacionada amb protecció, ans al contrari es suggereix que la qualitat de la resposta de les cèl·lules T definida per la polifuncionalitat cel·lular (capacitat de produir múltiples citocines i d'executar múltiples funcions efectores) tindra un paper crític el control de les infeccions (15–18). En particular, cèl·lules amb capacitat de produir IFN-γ, IL-2 i TNF-α al mateix temps s'han associat amb protecció de la infecció després de la vacunació (16). A més, en la infecció per VIH-2 s'ha demostrat que la resposta T VIH-especifica polifuncional està causalment associada amb la no progressió de la malaltia (17). Així doncs, tant l'estat de maduració com la mesura de la funció cel·lular T són d'importància per entendre les infeccions cròniques.

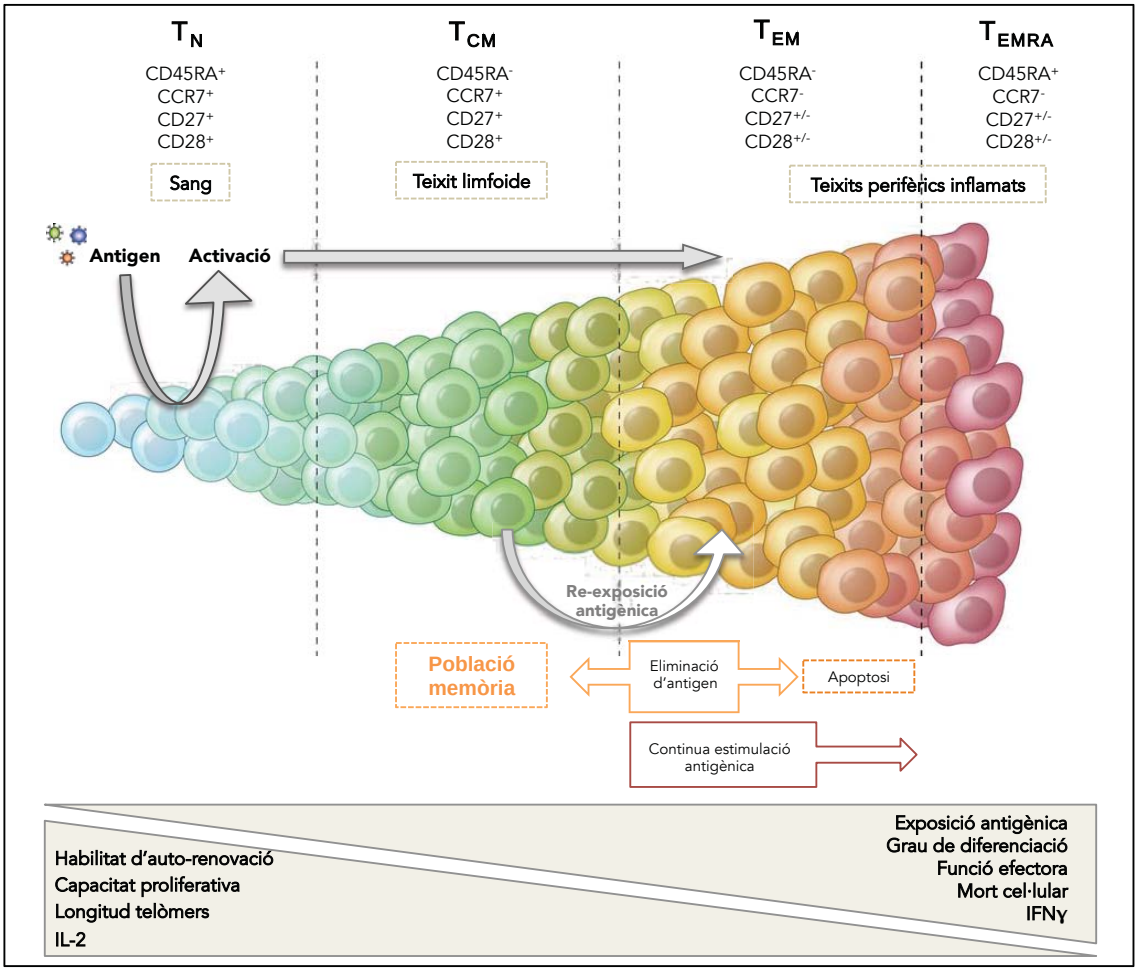

Figura 1. Model esquemàtic de diferenciació de limfòcits T. Després que les cèl·lules naïve (T_N) es trobin amb l'antigen, s'inicia un programa de proliferació i diferenciació cel·lular que culmina en la generació de cèl·lules terminalment diferenciades (T_{EM} i T_{EMRA}). Durant aquest procés de maduració, les cèl·lules T adquireixen capacitat efectora així com perden capacitat d'auto-renovació, generació de memòria i/o supervivència. Després del contacte antigènic, la majoria de les cèl·lules moren, i només una petita proporció de cèl·lules efectores sobreviu i s'estableix com a població memòria. Adaptat de Gattinoni 2013 (19).

2. El virus de la immunodeficiència humana

2.1. Origen de la pandèmia i epidemiologia

El virus de la immunodeficiència humana (VIH) és un lentivirus de la família dels retrovirus caracteritzat per induir una infecció crònica que condueix a una disminució gradual dels limfòcits T $CD4^+$ i que, en absència de tractament, pot desencadenar la síndrome d'immunodeficiència adquirida (sida). Els primers casos de sida es van descriure l'any 1981 en homes homosexuals que patien pneumònia i només dos anys després, l'any 1983 es va identificar el VIH de tipus 1 (VIH-1) com l'agent etiològic causant d'aquesta síndrome (20–22). La transmissió de VIH es dóna mitjançant la transferència de fluids corporals infectats (sang, semen, fluid vaginal o llet materna). L'exposició a sang per ús de drogues intravenoses, el contacte sexual o la transmissió vertical (mere-fill) són les principals rutes d'infecció (23). El VIH-1 es troba àmpliament distribuït a tot el mon. L'any 1986 es va descriure el VIH-2 (24), menys patogènic que VIH-1, distribuït principalment a l'Àfrica Occidental (25).

Cada 15 segons una persona s'infecta amb el VIH, la qual cosa es tradueix en 4 persones/minut i 5.760 persones/dia. Actualment hi ha aproximadament 36.7 milions de persones al món infectades amb el VIH-1 (més de 25 milions viuen a l'Àfrica), de les quals només 18.2 milions reben tractament antiretroviral. Des de l'any 2010, la incidència de la infecció per VIH només s'ha reduït de 2.2 a 2.1 milions d'individus infectats. Estem per tant davant una pandèmia que no sembla fer marxa enrere, almenys en països de l'Africa subsahariana, on tenen lloc al voltant del 66% de les noves infeccions i on 9 milions de persones encara no reben tractament (26) (Figura 2). Un dels principals motius que impedeix reduir la incidència de la infecció per VIH és el diagnòstic tardà que sovint es fa i que per tant augmenta el risc de nous contagis: s'estima que 1 de cada 4 persones no sap que està infectada. Tot i que el tractament antiretroviral ha representat una gran millora en quant a la disminució de la morbiditat i la mortalitat de la població infectada, encara queda un llarg camí per recórrer fins aconseguir que tota la població infectada tingui accés al tractament i poder posar així punt i final a la pandèmia de la sida.

Figura 2. Representació gràfica de l'epidemiologia de la infecció per VIH-1. En blau s'indica el número de persones estimades infectades amb VIH (36.7 milions en total), en verd les noves infeccions estimades (2.1 milions) i en vermell les morts estimades (1.1 milions). Adaptat de UNAIDS 2016.

2.2. VIH-1, agent etiològic

El VIH-1, de forma esfèrica i d'una mida d'entre 80 i 120nm de diàmetre, està format per dues còpies d'ARN embolcallades per una càpsida cònica formada per la proteïna viral p24 i que conté els enzims necessaris per la replicació viral: la transcriptasa inversa, la proteasa i la integrasa. La càpsida està envoltada per una bicapa lipídica provinent de la membrana plasmàtica de la cèl·lula hoste on s'insereixen les proteïnes de l'envolta viral, les glicoproteïnes gp120 i gp41 (27,28).

El cicle biològic del VIH es divideix en dues etapes ben diferenciades. **La fase primerenca** inclou l'entrada del virus a la cèl·lula hoste, la seva desencapsidació, retro-transcripció i la integració de l'ADN viral al genoma cel·lular. A partir d'aquest moment, el VIH pot romandre en estat de latència (forma proviral), sense replicar-se o bé iniciar la **fase tardana** amb la transcripció del genoma viral, la síntesi i processament de les proteïnes virals i la generació de nous virions infecciosos (29,30).

El VIH infecta principalment limfòcits T CD4 mitjançant la seva unió al receptor CD4 i als coreceptors CCR5 i CXCR4 presents a la superfície cel·lular (31) i destrueix aquestes cèl·lules per efectes citopàtics directes o indirectes (32). La infecció pel VIH i la destrucció de cèl·lules T CD4 pot afectar també altres tipus cel·lulars com monòcits,

macròfags, cèl·lules dendrítiques, limfòcits T CD8, cèl·lules B i cèl·lules NKs (33). El resultat, per tant, és una alteració de la resposta immunitària que, en absència de tractament, desencadena una severa immunosupressió.

2.3. Curs natural de la infecció per VIH

La història natural de la infecció per VIH en absència de tractament pot dividir-se en 3 etapes (34) (Figura 3):

a. **Fase aguda.** Durant aquesta fase inicial de la infecció (1-4 setmanes), generalment asimptomàtica, el virus es dissemina principalment a través del teixit limfoide associat a la mucosa gastro-intestinal (GALT), el qual té un paper clau en l'equilibri amb la microbiota intestinal. La infecció per VIH comporta una depleció preferencial dels limfòcits T CD4 de l'epiteli intestinal, conduint a una pèrdua de la integritat del GALT i un increment de la seva permeabilitat. Aquestes alteracions faciliten la invasió microbiana, donant lloc a un increment de l'activació immunitària, una producció elevada de citocines pro-inflamatòries i proliferació de cèl·lules T (35–37). Després de la invasió del GALT, el VIH es dissemina ràpidament als òrgans limfoides i teixit nerviós, on estableix una infecció persistent (38–40). El pic de virèmia plasmàtica s'assoleix després de 21-28 dies d'infecció, acompanyat d'una important davallada de cèl·lules T CD4 perifèriques. Durant aquesta fase es genera la resposta immunitària específica, amb la generació d'anticossos (sero-conversió) i l'expansió dels limfòcits T CD8 amb activitat citotòxica (CTL) (41). La resposta immunològica generada en aquesta fase és capaç de reduir la virèmia unes setmanes després de la primera exposició, però en cap cas d'eliminar la infecció (42).

b. **Fase crònica.** Durant aquesta fase, variable en el temps entre individus (1-10 anys), es dóna una replicació vírica baixa i persistent, continguda per la resposta immunitària tant humoral com cel·lular (43). La fase crònica es caracteritza per una latència clínica, malgrat que l'efecte citopàtic de la infecció

per VIH i la continua presència d'antígens virals condueix a un increment de l'activació immunitària i de la mort cel·lular; a més, donat que la població de limfòcits T CD4 es destrueix més ràpid que no pas es restableix, el nombre de cèl·lules T CD4 perifèriques disminueix durant aquest període de latència (44,45). La progressió de la infecció està determinada tant per factors virals (capacitat replicativa del virus o escapament immunològic), com de l'hoste (edat, sexe o coinfeccions amb altres virus).

c. **Fase de sida.** Durant aquesta fase es perd l'equilibri entre la replicació vírica i la resposta immunològica, incrementant-se notablement la replicació del VIH. L'augment de la càrrega viral, tant a òrgans limfoides com circulant, i la forta depleció de limfòcits T CD4 perifèrics són els marcadors principals del progrés de la infecció. Els individus que entren en aquesta fase pateixen infeccions oportunistes amb manifestacions clíniques evidents, incloent fallida de diversos òrgans, degeneració del sistema nerviós i la mort.

2.4. Desregulació de l'homeòstasi cel·lular durant la infecció per VIH

En individus sans, el nombre de cèl·lules T CD4 és el resultat d'un balanç homeostàtic entre producció i destrucció, així com del tràfic entre la circulació perifèrica i els teixits limfoides (46). En canvi, el desequilibri entre la producció i la destrucció de limfòcits T CD4 durant la infecció per VIH desencadena la depleció del compartiment T CD4, empremta més característica de la infecció per VIH, que només podrà recuperar-se amb la introducció de tractament antiretroviral (47–49).

a. Producció de cèl·lules T CD4

· **Hematopoesi:** la producció *de novo* de cèl·lules T CD4 té lloc a partir de precursors de medul·la òssia (hematopoesi). La infecció per VIH està associada a una disfunció hematopoètica directa degut la infecció de cèl·lules progenitores o bé per la mort induïda a través de la glicoproteïna de l'embolcall viral gp120 (50). Aquesta afectació

de la medul·la òssia té efectes devastadors a nivell immunològic afectant a progenitors de cèl·lules mieloides, granulòcits, eritròcits i limfòcits (51–53).

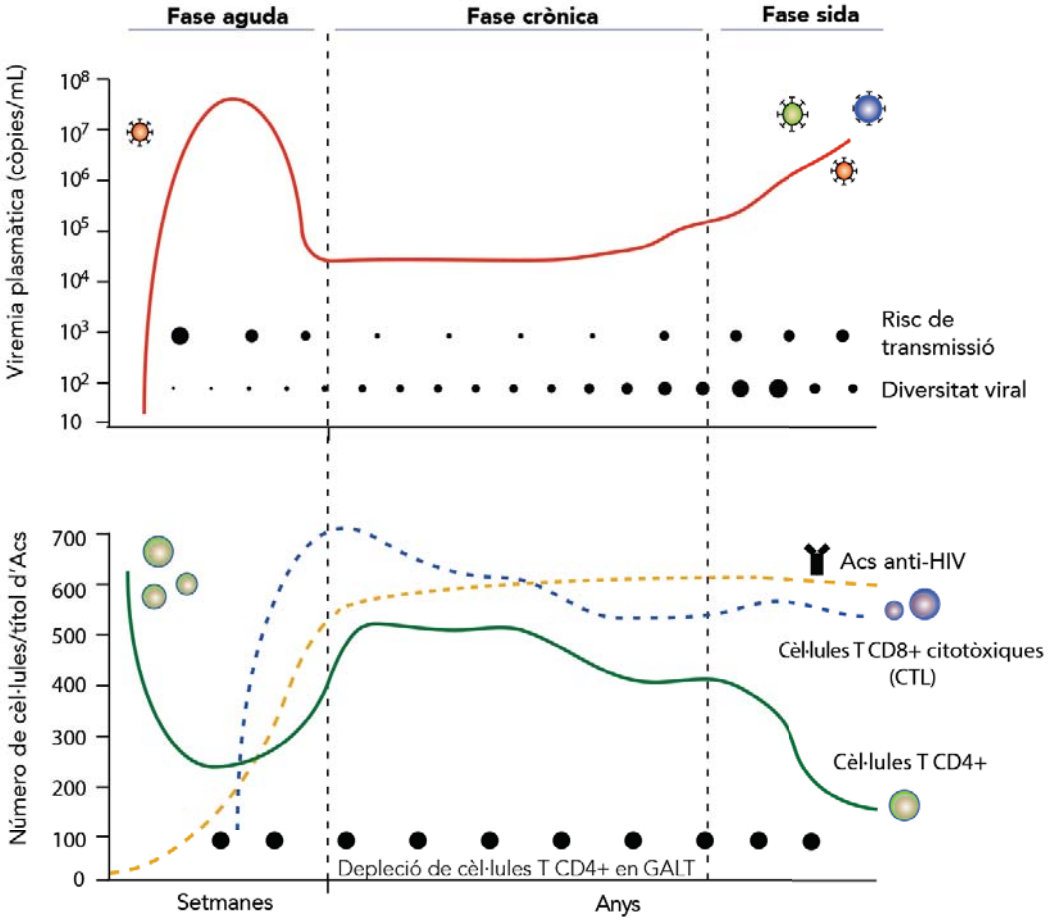

Figura 3. Evolució de la infecció per VIH-1 en absència de tractament antiretroviral i resposta immunitària. La fase aguda es caracteritza per una virèmia elevada (línia vermella), que en 2-3 setmanes pot assolir el pic màxim, així com per una ràpida pèrdua de limfòcits T CD4 (línia verda). Durant la fase crònica, s'estableix un equilibri entre resposta immunològica humoral (línia discontinua groga) i resposta CTL (línia discontinua blava) amb la replicació viral que pot durar anys i manté l'individu en un estat clínic asimptomàtic. La resposta CTL s'inicia 2-3 setmanes després de la infecció, arribant al seu *plateau* entre les 9 i 12 setmanes, mentre que la resposta humoral s'activa posterior a la resposta CTL, assolint nivells màxims a partir de les 12 setmanes després de la infecció. En absència de tractament, el progressiu deteriorament del sistema immunitari comporta la pèrdua de control de la replicació viral, entrant en fase sida. Adaptat de Simon et al. 2006 (54).

· **Funció tímica:** en absència de tractament existeix també una disfunció tímica marcada que incapacita una producció correcta de noves cèl·lules CD4 naïve (Revisat a (55)), alterant la proliferació de timòcits i desencadenant un deteriorament profund i una atrofia prematura del timus durant la fase crònica de la infecció (56,57). Per compensar la producció alterada, el compartiment T CD4 pateix una expansió

accelerada per proliferació homeostàtica on la interleucina 7 té un paper rellevant (58), donant lloc a un compartiment amb una població naïve disminuïda i elevades freqüències de cèl·lules memòria, així com una apoptosi incrementada i una resposta immunitària menys eficaç (56,57).

· **Proliferació homeostàtica dirigida per citocines:** la citocina IL-7 és determinant en la diferenciació de timòcits i en l'expansió perifèrica de cèl·lules T, sent per tant un important modulador de l'homeòstasi cel·lular i el manteniment de la població naïve, promovent la seva supervivència i proliferació (59). En individus VIH$^+$, la necessitat d'incrementar la producció de cèl·lules T CD4 dóna lloc a nivells plasmàtics elevats d'IL-7 (60,61), però la infecció s'associa amb una disminució de l'expressió del seu receptor (CD127) a la superfície dels limfòcits T CD4 i CD8 (62), havent-se descrit una associació entre la expressió del receptor i la progressió de la malaltia (63). Les citocines IL-2 i IL-15 també juguen un paper essencial en el procés d'homeòstasi cel·lular actuant com a reguladores de la proliferació, activació i diferenciació de cèl·lules T (64). Però a diferència d'IL-7, IL-15 i IL-2 estan disminuïdes en individus VIH$^+$ (revisat a (65)).

b. Destrucció de cèl·lules T CD4

· **Depleció de cèl·lules T CD4 en GALT:** la barrera anatòmica que constitueix el teixit gastrointestinal confereix protecció tant estructural com immunològica contra patògens. Durant la fase aguda de la infecció per VIH es dóna una pèrdua d'integritat de la superfície de la mucosa, donant pas a un increment de la permeabilitat intestinal i per tant una invasió augmentada de microorganismes i subproductes microbians (lipopolisacàrid, LPS) i un increment de citocines pro-inflamatòries. La inducció d'inflamació local comporta una hiperactivació del compartiment T CD4, augmentant així el nombre de dianes per al VIH i per tant la replicació viral i la depleció de limfòcits CD4 (66,67).

· **Disrupció de l'arquitectura i fibrosi incrementada del teixit limfoide:** l'estructura del teixit limfoide secundari juga també un paper clau en el manteniment homeostàtic i en la funció immunològica. L'activació immunitària persistent i la inflamació generada per l'augment de permeabilitat i translocació bacteriana comporten una deposició continua de col·lagen al teixit limfoide, conduint a una disrupció progressiva de l'arquitectura tissular, afectant negativament la capacitat del teixit limfoide per renovar el compartiment T (68–70).

· **Mecanismes de mort cel·lular:** la depleció massiva de limfòcits T CD4 en mucosa no reflecteix la pèrdua gradual de cèl·lules CD4 que es veu en sang perifèrica. S'han proposat diversos mecanismes per explicar la mort de les cèl·lules T CD4 en la infecció per VIH: (i) mecanismes directes de la replicació viral i el seu efecte citopàtic; (ii) apoptosi intrínseca (dependent de caspasa-3), associada a la formació de sincitis de vida curta entre cèl·lules infectades i no infectades mitjançant un mecanisme dependent de CD4 i CXCR4 i (iii) efecte citolític de cèl·lules T CD8 VIH-específiques i NKs (32,50,71,72). La freqüència de les cèl·lules T CD4 infectades en sang perifèrica, però, és molt baixa (0.01-1%) (72), la qual cosa suggereix una contribució important de cèl·lules no infectades als nivells totals de mort cel·lular (*mort bystander*). Aquesta mort de limfòcits CD4 no infectats pot induir-se per (i) la sostinguda activació immunitària (donat que les cèl·lules hiperactivades són més susceptibles a l'apoptosi) (73); (ii) contacte amb cèl·lules infectades i proteïnes virals en absència de fusió (50,74), induïnt-se apoptosi autofàgica (veure Apartat 4 de la Introducció) i (iii) infecció abortiva, donat lloc a una mort inflamatòria anomenada piroptosi (depenent de caspasa-1) (75,76).

2.5. Continua activació immunitària i conseqüències

L'activació del sistema immunitari és un reflex de la resposta immunitària antiviral, sent freqüent durant les infeccions agudes i associant-se amb un efecte positiu important en l'eliminació de les infeccions. En el cas de la infecció pel VIH, però, aquesta activació immunitària persisteix de forma anormal també durant la fase crònica,

manifestant-se en freqüències incrementades de cèl·lules T memòria expressant marcadors d'activació com HLA-DR i CD38, una producció incrementada de citocines pro-inflamatòries, nivells elevats d'apoptosi i sent considera una de les majors causes de la depleció del compartiment T CD4 en individus VIH$^+$ (77–79). Una conseqüència directa de la hiperactivació immunitària és l'increment de la transcripció dels virus integrats i per tant la producció de nous virions que infectaran noves cèl·lules diana (80), creant-se així un cercle viciós entre replicació del VIH i activació immunitària . Aquesta activació immunitària elevada i persistent contribueix de forma significativa a la patogènesi de la infecció, sent paradoxalment un factor predictor de la progressió de la malaltia i de la mortalitat (79,81–85). A més, la destrucció del compartiment T CD4 i la producció de citocines pro-inflamatòries durant la infecció pel VIH confereix un ambient òptim per la replicació d'altres virus. Durant la fase aguda de la infecció pel VIH destaquen les reactivacions virals de citomegalovirus (CMV) i virus Epstein-Barr (EBV), induint-se una estimulació antigènica afegida i col·laborant així en l'activació immunitària causada pel VIH (86,87).

L'activació constant del sistema immunitari que té lloc durant la infecció pel VIH, així com la reducció de la producció tímica resulta en un enriquiment de cèl·lules terminalment diferenciades, donant lloc a una senescència immunitària prematura. Aquest procés d'immunosenescència, que també s'observa durant l'envelliment natural (88), es caracteritza per un deteriorament de la immunocompetència que desencadena en un esgotament prematur del compartiment T, procés associat a l'expressió de PD-1 (mort programada tipus 1 o *programmed death-1*) (89) i una resposta immunològica pobra en front nous antígens i vacunes (89–91). De fet, la immunosenescència accelerada que provoca la infecció pel VIH va acompanyada també de disfuncions fisiològiques associades a l'envelliment tals com osteoporosi, arteriosclerosi o deteriorament neuro-cognitiu (Figura 4).

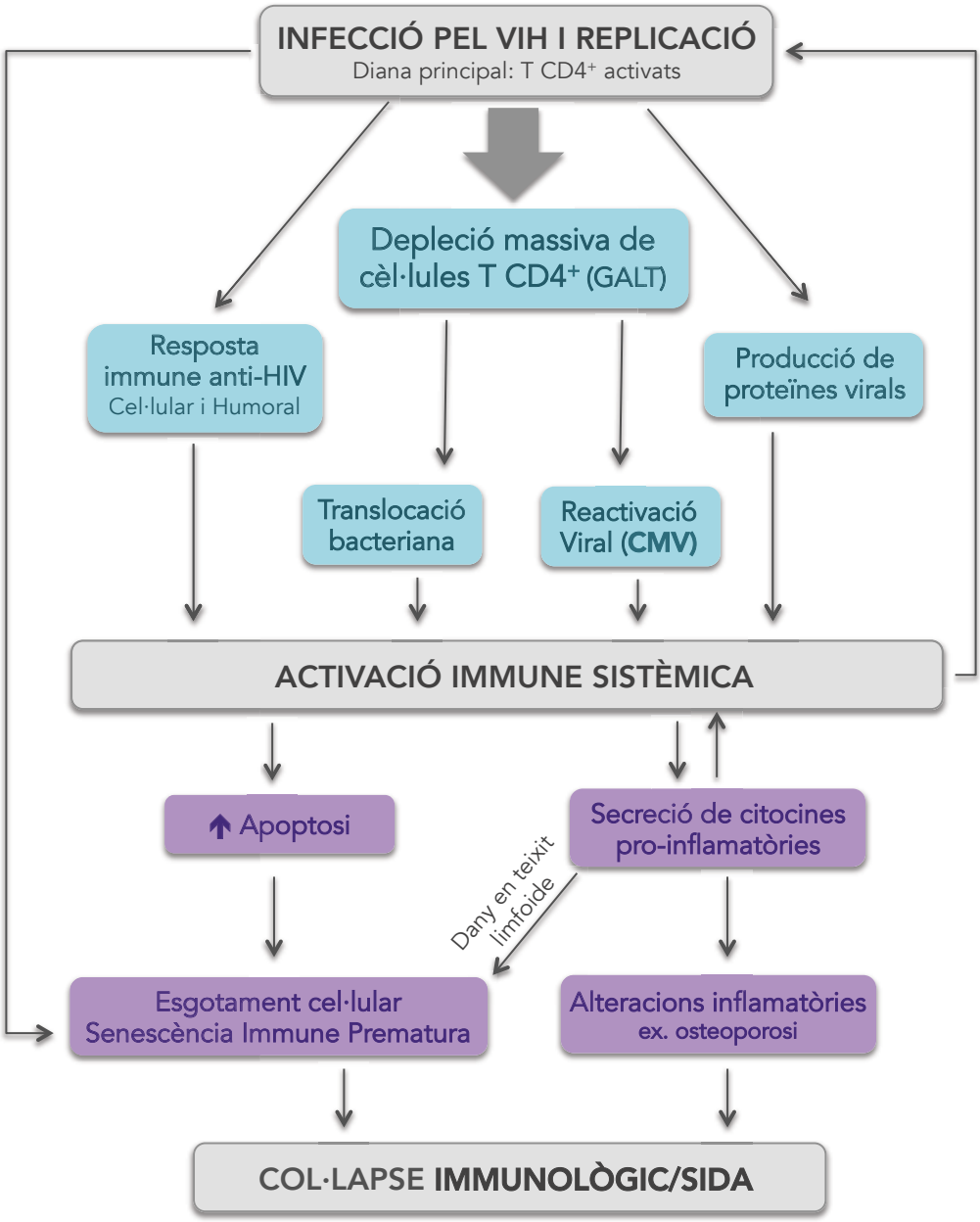

Figura 4. Model esquemàtic de les causes (blau) i conseqüències (lila) de la patogènesis associada a la infecció pel VIH-1. Adaptat de Appay et al, 2008 (80)

2.6. Resposta immunològica a TARGA: reconstitució quantitativa i qualitativa

El tractament TARGA ha demostrat un efecte molt significatiu en la millora de la morbiditat i mortalitat dels individus infectats, afavorint la recuperació tant quantitativa com qualitativa del sistema immunològic (55).

a) Reconstitució immunològica quantitativa: mecanismes homeostàtics

Per a la majoria dels individus infectats pel VIH, l'inici de TARGA suposa una reducció ràpida i sostinguda de la càrrega viral (CV) en plasma fins a nivells indetectables (<50 còpies/ml) així com un increment dels nivells de limfòcits T CD4 (92–95). La recuperació del compartiment T CD4 es dóna de forma bifàsica (Figura 5). En una primera fase, durant els primers 2-3 mesos de tractament, es produeix una davallada accelerada de la CV i una reducció de citocines i quimiocines inflamatòries circulants, reduint-se per tant els nivells d'activació immunitària i d'apoptosi (95,96) i conduint a un augment ràpid del nombre de cèl·lules T CD4. Aquest augment és degut principalment a la redistribució de cèl·lules T CD4 memòria des dels teixits limfoides cap a la sang. A més, el nombre de cèl·lules T CD8, cèl·lules NK i cèl·lules B també augmenta en sang perifèrica després de l'inici de TARGA, indicant que l'increment cel·lular en sang ve donat per mecanismes no específics (95).

La segona fase de la recuperació immunològica pot durar diversos anys i depèn principalment del control de la replicació viral (97). Aquesta fase es correspon amb un restabliment de la producció *de novo* de cèl·lules CD4 naïve que ve donada per tres mecanismes principals: (i) la recuperació de la funció tímica, (ii) la proliferació homeostàtica de la població CD4 i (iii) l'increment de la vida mitjana de les cèl·lules T CD4 (46,98,99) (Figura 5). És important destacar que aquests tres mecanismes no tenen el mateix resultat en la reconstitució immunològica: mentre que la producció *de novo* pot restaurar completament el repertori cel·lular, la proliferació homeostàtica i l'increment de la vida mitjana, en canvi, no s'associa amb una bona qualitat de la reconstitució immunològica ja que expandeix oligoclonalment el repertori cel·lular, malgrat que sí garanteix una recuperació del nombre de cèl·lules. Juntament amb aquests tres mecanismes, es frena la diferenciació incrementada de cèl·lules naïve a memòria, afavorint-se la recuperació d'aquesta població (95,100).

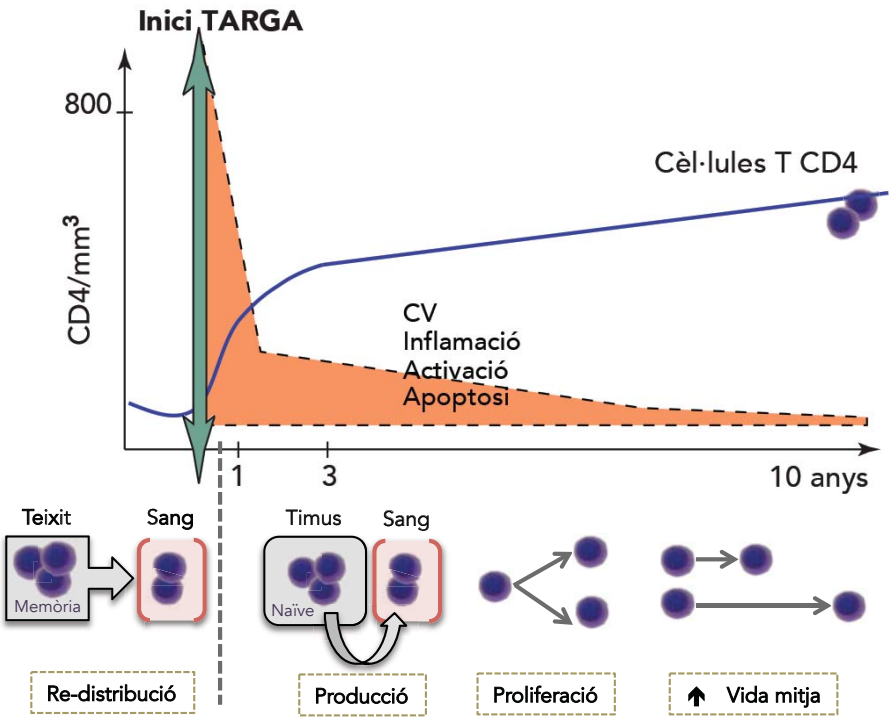

Figura 5. Principals mecanismes implicats en la recuperació del compartiment T CD4 durant TARGA. La ràpida davallada de càrrega viral després d'iniciar TARGA que ve acompanyada d'una ràpida disminució dels nivells d'inflamació, activació immunitària i mort cel·lular comporta un ràpid ascens del nombre de cèl·lules T CD4. Durant els primers 6 mesos aquesta recuperació de cèl.lules CD4 es correspon amb una redistribució de cèl·lules memòria de teixit limfoide a sang. En una segona fase de recuperació més lenta, es restableix la funció tímica i l'homeòstasi cel·lular, recuperant-se així la població CD4 naïve. Adaptat de Guihot A et al. 2010 i Corbeau et al. 2001 (55,101).

b) Reconstitució immunològica qualitativa: restauració de la funcionalitat

Tot i que el benefici clínic de TARGA és innegable, la mesura en la que TARGA normalitza completament la funció immunitària segueix sent un tema en controvèrsia (55). La disminució de les comorbiditats i la mortalitat associades a la infecció del VIH durant TARGA posen de manifest que la immunitat patogen-específica es recupera després d'iniciar tractament (102), malgrat que s'ha observat que aquesta recuperació és diferent en funció del patogen (103). Aquesta recuperació patogen-depenent queda reflectida en els defectes funcionals observats després de la vacunació contra diferents patògens (galteres, grip, pneumococ o verola) (104).

La reconstitució funcional de la resposta contra diferents infeccions oportunistes contrasta clarament amb la reducció de la immunitat VIH-específica. L'efecte de TARGA en les cèl·lules T CD8$^+$ citotòxiques ha estat estudiat extensament (105–107), demostrant-se que la davallada de CV induïda en iniciar tractament és paral·lela a una disminució de la freqüència de cèl·lules T CD8$^+$ efectores VIH-específiques. Aquesta caiguda no reflecteix una deficiència immunitària persistent, sinó simplement un fenomen homeostàtic normal en resposta a la caiguda de l'exposició antigènica. De fet, també s'observa una caiguda del nivell de cèl·lules B de memòria VIH-específiques en sang perifèrica paral·lelament amb la reducció de la CV plasmàtica del VIH (108).
Respecte a la recuperació de la immunitat CD4 VIH-especifica durant TARGA, els estudis realitzats són més discrepants. Mentre uns estudis han observat una resposta CD4 VIH-específica detectable però no incrementada en individus VIH$^+$ (109–112), d'altres estudis han descrit una reconstitució de la capacitat proliferativa de les cèl·lules CD4 VIH-específiques (113–118), teoria recolzada per un augment de la producció VIH-específica d'IL-2, tot i que no d'IFN-γ (118–120). Però, malgrat que els individus VIH-positius presenten cèl·lules T CD8 i CD4 VIH-específiques (121), aquesta resposta no és capaç d'eliminar completament el virus (122). Tot i així, s'ha observat una associació entre control viral i la qualitat de la resposta de les cèl·lules T VIH-específiques mesurada com a polifuncionalitat (15,17).

2.7. Resposta immunoconcordant i immunodiscordant

Malgrat que la majoria d'individus VIH$^+$ en TARGA assoleix una recuperació immunològica favorable (resposta immunoconcordant) i presenten taxes de morbiditat i mortalitat comparables a individus VIH-negatius (123), aproximadament un 20% dels individus VIH$^+$ presenten una resposta paradoxal, i malgrat aconseguir una resposta virològica favorable al tractament (supressió virològica) no aconsegueixen incrementar els nivells de limfòcits T CD4 i presenten taxes de morbilitat i mortalitat majors (46,95,98,99,124) Aquest grup d'individus amb resposta immunològica no favorable al tractament s'ha anomenat immunodiscordants, no responedors o no repobladors (Figura 6). Existeixen diversos criteris que defineixen la immunodiscordància basats

principalment en el recompte de cèl·lules T CD4 o en la caiguda de la relació CD4/CD8. Les definicions més restrictives consideren una resposta immunodiscordant quan els nivells de CD4 són <200 cèl·lules/µl, tot i que un recompte de <350 cèl·lules/µl o bé <500 cèl·lules/µl (nivells recomanats per la iniciació de TARGA) també està àmpliament acceptat (46,125–128).

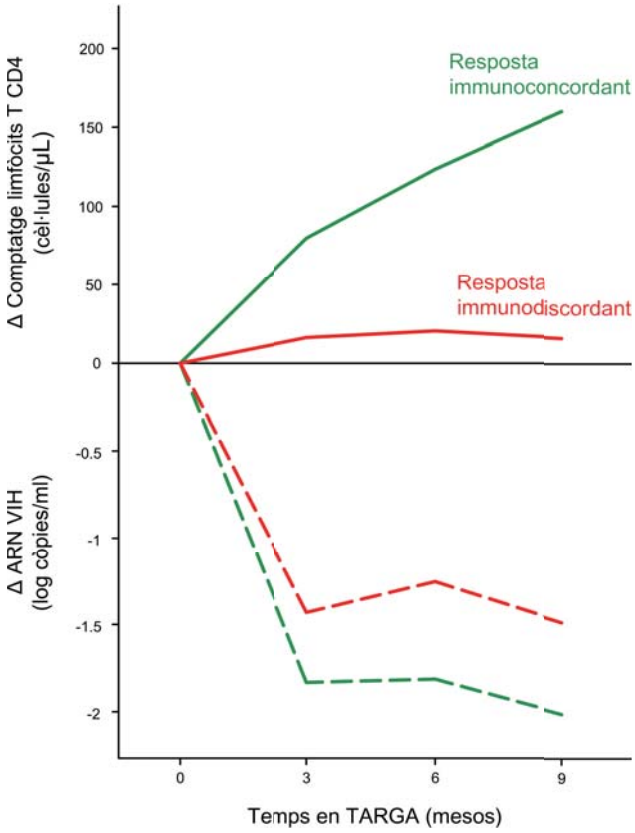

Figura 6. Resposta immunoconcordant i immunodiscordant al tractament antiretroviral. Després d'iniciar el tractament, la majoria d'individus VIH+ mostren una davallada de la càrrega viral i un increment del recompte absolut de cèl·lules T CD4 (verd), però els individus immunodiscordants (vermell) mostren una resposta immunològica no favorable, no incrementant-se el recompte de cèl·lules T CD4 malgrat suprimir la càrrega viral. Adaptat de: Piketty et al, 1998 (98).

▪ DETERMINANTS D'UNA POBRA RECUPERACIÓ IMMUNOLÒGICA

La raó per la qual la contenció de la replicació del VIH induïda per TARGA no sempre va acompanyada d'una normalització del compartiment T CD4 en individus VIH+ no està definida en la seva totalitat, i es postula un origen multifactorial. Des d'un punt de vista simplista, dos grans mecanismes podrien resultar en una pobra recuperació

immunològica: una producció insuficient de noves cèl·lules o una destrucció excessiva de les cèl·lules T CD4 existents (Revisat a (101,129,130)).

a) Alteracions en la producció de cèl·lules T CD4

· Producció de cèl·lules T CD4 naïve en medul·la òssia i timus

Com s'ha descrit anteriorment, alteracions en la funció hematopoètica o tímica estan directament associades amb una disminució de la producció limfocitària (98,124,131). Tot i que la disfunció hematopoètica es normalitza després d'iniciar TARGA, en individus immunodiscordants s'observa una producció reduïda de cèl·lules $CD34^+$ degut a esgotament de la medul·la òssia (131) i a nivells incrementats d'apoptosi en cèl·lules progenitores, la qual cosa té impacte directe en una producció alterada i una reconstitució immunològica subòptima (131–134). D'altra banda, en la infecció pel VIH, la mida del timus es correlaciona amb el recompte de cèl·lules naïve circulants, amb el nombre de cèl·lules T CD4 totals i amb l'amplitud del repertori del sistema immunitari (135,136). Els individus immunodiscordants presenten un compartiment T naïve reduït, amb una disminució del volum tímic (137,138) i un nombre menor de cèl·lules tímiques emigrants recents en comparació amb els individus immunoconcordants (137–140). Malgrat les disfuncions tímiques descrites, alguns estudis han mostrat que la producció tímica no sembla ser el contribuïdor major de la pobra recuperació immunològica (139,141).

· Proliferació homeostàtica

Els nivells de proliferació de cèl·lules T CD4 en individus VIH^+ es mantenen incrementats fins a 2 anys després d'iniciar TARGA (142), especialment en individus immunodiscordants, fet que pot ser resposta a la marcada depleció del compartiment T CD4 en aquests individus (143,144) i que probablement està regulat per IL-7 (145). En concordança amb la correlació negativa descrita entre IL-7 i el recompte de cèl·lules CD4 (60), s'han observat nivells incrementats d'IL-7 en individus immunodiscordants. Però aquests individus també presenten una reducció en la expressió del receptor d'IL-7 (CD127) especialment en cèl·lules memòria (T_{CM}), la qual

cosa pot explicat l'apoptosi incrementada d'aquestes cèl·lules (146) i pot comprometre de forma directa la seva capacitat de regenerar la població de cèl·lules T (125,147). A més, també s'ha observat una producció disminuïda d'IL-2 en individus immunodiscordants en comparació amb individus immunoconcordants i que també podria estar jugant un paper en la pobra recuperació immunològica (126).

b) Alteracions en la destrucció de cèl·lules T CD4

· Hiperactivació, mort cel·lular i immunosenescència

La persistent activació immunitària (mesurada com cèl·lules T CD8 o CD4 $CD38^+$ o $CD38^+HLA\text{-}DR^+$) observada en la infecció pel VIH, que no arriba a normalitzar-se després d'iniciar TARGA, s'ha associat amb un guany menor de cèl·lules T CD4 en sang perifèrica, fins i tot en supressió viral (148,149). Els individus immunodiscordants mostren nivells d'activació immunitària majors que els individus immunoconcordants, especialment al compartiment T CD4 (139,147). Aquesta hiperactivació està implicada en una susceptibilitat major a mort cel·lular (139), especialment en el compartiment memòria T_{CM} (146) així com en nivells més elevats d'apoptosi limfocitària en individus immunodiscordants en comparació amb immunoconcordants (140,147,150).

L'activació immunitària persistent i el continu recanvi de cèl·lules T en individus immunodiscordants estan implicats, a més, en una acumulació de cèl·lules senescents ($CD28^-CD57^+$). Els individus immunodiscordants presenten, a més, un fenotip associat a l'esgotament cel·lular (definit principalment com cèl·lules $CD4^+PD\text{-}1^+$). Tots dos fenotips es corresponen amb una pèrdua de funció efectora i de capacitat proliferativa de cèl·lules memòria (125,139). Aquestes cèl·lules "esgotades" són més susceptibles a l'apoptosi, la qual cosa està també en concordança amb la major mort cel·lular que presenten els individus immunodiscordants (139,150).

Diversos mecanismes poden explicar aquesta activació elevada i persistent:

- Disfunció de les cèl·lules T reguladores (Tregs): els individus immunodiscordants presenten freqüències més elevades de Tregs al compartiment T CD4 però en canvi el nivell en la població total de limfòcits s'observa disminuït. El paper que tenen aquestes cèl·lules en la reconstitució

immunològica encara no és clar. Mentre que els nivells baixos de Tregs a la població de limfòcits podria afavorir l'activació immunitària en individus immunodiscordants, l'elevada freqüència de Tregs dins el compartiment T CD4 podria participar en l'homeostasi i proliferació de les cèl·lules naïve (125,151).

· Disrupció del GALT i translocació bacteriana incrementada: la inducció d'inflamació local durant la disrupció de GALT condueix a una activació de les cèl·lules T CD4 circumdants, les quals es convertiran en dianes addicionals pel VIH, incrementant la replicació viral. Els individus immunodiscordants presenten nivells més elevats de translocació bacteriana, procés que està inversament correlacionat amb la magnitud del compartiment T CD4 (139,152–154)

· Producció viral residual (principalment en teixits limfoides): el reservori viral de cèl·lules T CD4 latentment infectades pot desencadenar en una virèmia plasmàtica residual. Aquesta replicació residual es una font d'hiperactivació que s'observa a la majoria d'individus infectats en TARGA (155). Els individus immunodiscordants presenten nivells majors de virèmia residual en plasma (156), però la seva contribució a l'estat d'hiperactivació en aquest grup encara no s'ha demostrat (157).

· Coinfeccions: la coinfecció amb el virus de l'hepatitis C ha estat associada amb nivells elevats d'immunoactivació i mort cel·lular (158,159). Diversos estudis han vinculat també la coinfecció amb el CMV amb un estat permanent d'activació immunitària (160), un baix recompte de cèl·lules T CD4 i un perfil immunològic senescent (87,161), proposant la coinfecció amb el CMV com un factor addicional implicat en la recuperació immunològica d'individus VIH$^+$ en tractament (veure apartat 3 de la Introducció).

c) Altres mecanismes implicats en la resposta immunodiscordant

· Nadir de cèl·lules T CD4

Un baix recompte nadir de cèl·lules T CD4 sembla ser el principal factor determinant d'una resposta immunològica insuficient (133,150,162). El recompte nadir pot interpretar-se com una mesura de destrucció del sistema immunitari, que es tradueix

en un menor producció de precursors en la medul·la òssia (163), disfunció tímica (150,164) o destrucció de teixit en nòduls limfàtics (165). Els individus amb un recompte nadir de <100 cèl·lules/µl presenten un compartiment T esbiaixat cap a un fenotip de memòria, mentre que si s'inicia teràpia amb nivells de CD4 >350cèl·lules/µl s'observa un increment ràpid de la població naïve, normalitzant-se els nivells naïve/memòria durant els primers anys en TARGA (166). Tot i així, alguns individus immunoconcordants que presenten un baix nadir (<50cèl·lules/µl) sí aconsegueixen recuperar els nivells de cèl·lules T $CD4^+$ (167), suggerint que existeixen altres factors addicionals que participen en el control de la resposta immunodiscordant.

· Toxicitat del TARGA

La llarga exposició dels individus VIH^+ al tractament antiretroviral està lligada a l'aparició de diversos efectes adversos que són altament dependents del regim TARGA administrat, com per exemple toxicitat en cèl·lules hematopoètiques, desordres metabòlics, reaccions a la pell o increment del risc cardiovascular que podrien complicar la recuperació immunològica (168–170). Alguns estudis però, han descrit que el guany de cèl·lules T CD4 és independent de la composició del règim TARGA (150,171,172).

· Sexe i edat

De forma general, els homes presenten major risc de resposta immunològica no favorable al tractament (167,172). S'han descrit diversos factors que podrien explicar aquestes diferències: major producció tímica en dones (173), efecte anti-apoptòtic de les hormones femenines (174) o menor activació immunitària en dones (175). Una edat avançada, que pot ser determinant d'una producció tímica menor, també ha estat relacionada amb una pobra recuperació immunològica (176,177).

· Predisposició genètica

Polimorfismes associats al gen apoptòtic *fas/fasl* (178) s'han vinculat també amb la recuperació de cèl·lules CD4 després d'iniciar tractament, així com polimorfismes en gens que codifiquen per citocines com IL-2, IL-6, IL-15 i els seus receptors TRAIL, Bim, TNF-α o IFN-α també poden tenir impacte en el guany de cèl·lules T CD4 durant

TARGA (179,180). S'ha establert també una correlació entre un polimorfisme en el gen que codifica pel co-receptor CCR5 i la recuperació de limfòcits T CD4 (181).

Cap d'aquests factors, però, explica totalment la recuperació immunològica insuficient en individus immunodiscordants, que probablement sigui el resultat d'un cercle viciós generat entre una hiperactivació immunitària persistent i una apoptosi elevada, acompanyades de fibrosi i dany tissular i una immunosenescència accelerada (Figura 7).

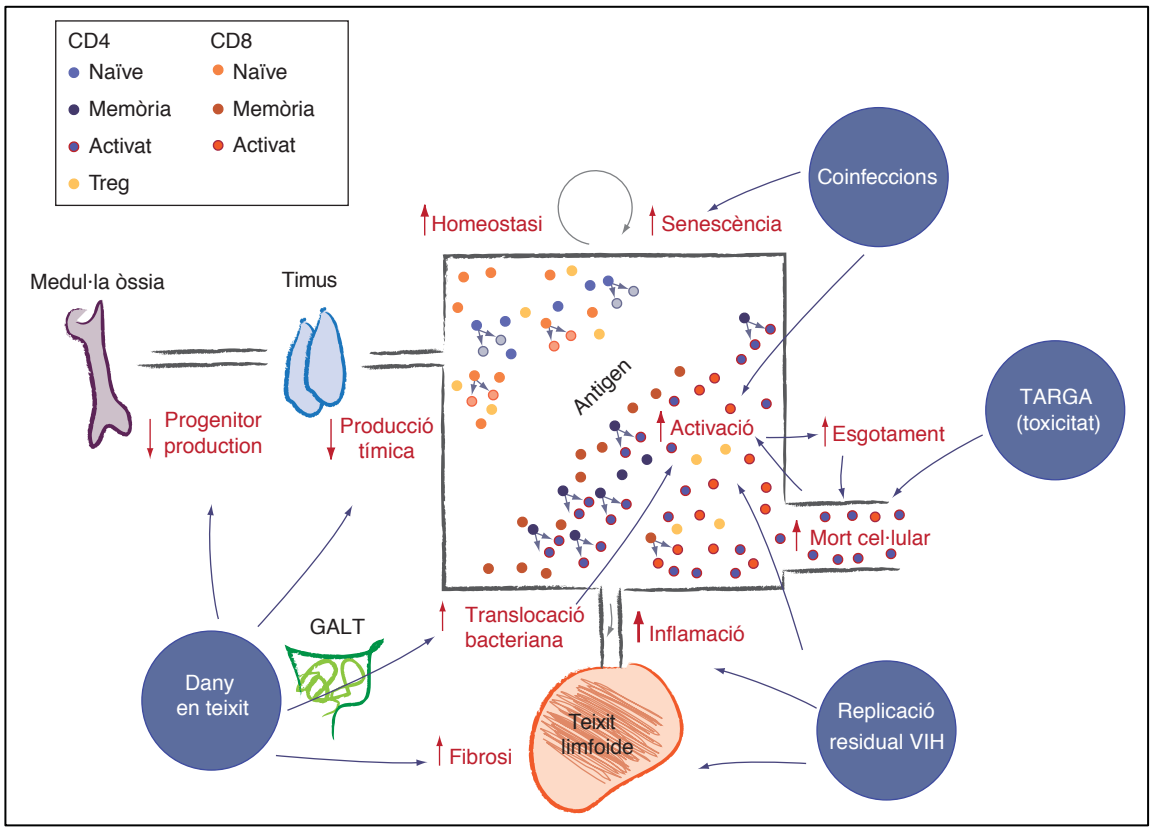

Figura 7. Representació dels principals mecanismes associats a una resposta immunodiscordant. La figura mostra alteracions en el balanç de la producció i destrucció de cèl·lules T CD4 en individus immunodiscordants. Una producció en medul·la òssia i timus reduïda condueix a una disminució de cèl·lules naïve i un augment de la proliferació homeostàtica; aquesta producció alterada podria estar associada a danys en teixit degut a la infecció pel VIH, que també afectaria al teixit limfoide; en GALT la translocació bacteriana que acompanya la replicació del VIH contribueix a la hiperactivació immune, incrementada també per coinfeccions amb altres virus (VHC, CMV); aquest augment l'activació immunitària condueix en última instància a un esgotament cel·lular i un increment de mort cel·lular. Altres mecanismes com la proliferació homeostàtica en resposta a la depleció del compartiment T CD4, disfuncions de les cèl·lules Tregs o virèmia residual podrien explicar també la hiperactivació del sistema immune. La toxicitat del TARGA a més afecta directament la destrucció de les cèl·lules T CD4. Les possibles causes d'una resposta immune no favorable estan indicades en blau, i els processos alterats en vermell. El número de cèl·lules representa la quantitat relativa de cada subpoblació de cèl·lules T. Adaptat de Massanella et al, 2013 (129).

3. Infecció pel CMV i coinfecció VIH-CMV

3.1. Característiques generals i epidemiologia

El Citomegalovirus (CMV) és un virus ADN que pertany a la família *Herpesviridae,* membre de la subfamília dels β-herpesvirus (182–184). Els herpesrvirus es caracteritzen per una infecció aguda amb simptomatologia febril no específica seguida per una persistència per tota la vida en l'hoste. El CMV té doncs l'habilitat d'infectar les cèl·lules de forma latent però són característics els intervals de reactivacions esporàdiques (185). La infecció pel CMV en humans és molt comú, amb una seroprevalença mundial d'entre 40 i 100% en funció de la zona geogràfica, l'edat o el grup socioeconòmic (186). Generalment, la seroprevalença del CMV és major en dones que en homes i incrementa amb l'edat (Revisat a (187)).

3.2. Infecció pel CMV

Les persones amb una infecció activa secreten el virus en fluids corporals, com la orina, saliva, sang, llàgrimes, semen i llet materna (Revisat a (188)), fent que el virus es transmeti per contacte sexual, a través de la saliva, la sang, l'alletament o la placenta durant l'embaràs. La transmissió pot donar-se també durant transplantaments d'òrgans sòlids o cèl·lules mare hematopoètiques (185,189) on té una enorme rellevància clínica.

La infecció activa del CMV, definida com una replicació viral detectable, pot ser deguda a una infecció primària, quan el CMV infecta un hoste naïve sero-negatiu o a una reactivació viral, en un individu sero-positiu (190). Existeixen diferents factors que poden determinar que el CMV desperti de la seva fase latent i entri en replicació viral activa (190), entre els quals destaquen la immunosupressió de l'hoste, l'activació del sistema immunitari o processos inflamatoris.

En individus immunocompetents, el CMV condueix a una infecció crònica subclínica generalment sense símptomes (191). Contràriament, en individus immunodeprimits i durant el desenvolupament fetal la infecció pel CMV afecta de forma significativa les

taxes de morbiditat i mortalitat (46,98,99). Les complicacions clíniques associades a la infecció pel CMV s'han estudiat principalment en la infecció congènita i neonatal (192,193) així com en post-transplantaments (190,194), però aquesta infecció també té un paper molt rellevant en la infecció pel VIH. En individus VIH$^+$ amb una resposta immunitària compromesa, el CMV replica de forma activa incrementant l'estat d'immunoactivació i accelerant la progressió a sida (195,196).

3.3 Diagnòstic de la infecció pel CMV

Malgrat l'elevada seroprevalença, en individus amb un sistema immunològic favorable la infecció crònica pel CMV és asimptomàtica (197,198) i, degut a aquesta absència de símptomes clínics la forma d'estimar la prevalença de la infecció a la població és mitjançant la presència en sèrum d'anticossos específics contra el virus o mitjançant la detecció d'ADN en diferents fluids corporals.

El diagnòstic de la infecció primària pel CMV en individus immuno-competents té lloc per mètodes serològics amb la determinació d'anticossos IgM, els quals són un indicador d'infecció recent. La resposta IgM específica, però, també pot incrementar-se després de la reactivació viral i, per tant, per diferenciar entre reactivació i infecció primària, s'utilitza l'avidesa d'IgGs, detectant-se anticossos IgG de baixa avidesa en infecció primària y anticossos IgG d'alta avidesa en episodis de reactivació viral. Així, la mesura d'avidesa d'IgGs anti-CMV s'ha descrit com un marcador serològic acurat d'infecció primària, principalment en dones embarassades o individus immuno-suprimits, de gran importància pel correcte diagnòstic en la infecció pel CMV, (199–205).

La determinació d'una infecció activa es pot mesurar mitjançant la detecció d'ADN viral. Malgrat que aquesta quantificació mitjançant tècniques de PCR resulta senzilla, no sempre és possible. La replicació de CMV està molt compartimentada, la qual cosa significa que en un individu amb infecció activa poden no trobar-se nivells detectables d'ADN viral en tots els seus fluids. La detecció de CMV és freqüent en semen, secrecions vaginals i llet materna, mentre que la detecció en sang, plasma o orina en individus immunocompetents és rara (206–209). Per tant, un individu amb una infecció activa es pot erròniament categoritzat en funció del fluid en el qual es determini la CV

de CMV, amb les conseqüents possibles interpretacions errònies dels resultats que això pot comportar.

3.4. Control immunològic de la infecció pel CMV

La resposta immunològica contra el CMV és altament complexa, i inclou les respostes innata i adaptativa (cel·lular i humoral) que en conjunt limiten la replicació viral i mantenen la latència (210). Els individus sans immunocompetents produeixen IgMs anti-CMV durant la infecció primària, les quals persisteixen durant 3-4 mesos, mentre que les IgGs es produeixen unes setmanes més tard i persisteixen durant tota la vida (188). S'ha descrit que després de la infecció primària asimptomàtica, les cèl·lules T CD4 CMV-específiques apareixen 10 dies després que l'ADN viral sigui detectable, apareixent cèl·lules T CD8 CMV-específiques 14 dies més tard (211). La resposta immunitària, tant cel·lular com humoral, és tan beneficiosa com nociva per l'hoste, ja que és protectora de manera immediata en front a la infecció pel CMV però al mateix temps pot tenir múltiples efectes perjudicials a llarg termini.

a) Resposta cel·lular T (*memory inflation*)

La resposta T contra CMV desencadena la generació incrementada de cèl·lules T de memòria CMV-específiques implicades en la lluita constant per contenir la replicació viral (Revisat a (212)), procés descrit com a *memory inflation* (190,213,214). Aquest increment de diferenciació de limfòcits T augmenta amb l'edat: aproximadament un 10% de les cèl·lules T CD4 i CD8 de memòria circulants són CMV-específiques, podent augmentar fins a un 50% dels $CD8^+$ i un 30% dels $CD4^+$ en gent d'edat avançada (215). Aquesta subpoblació de cèl·lules CMV-específiques que s'expandeix es correspon amb un fenotip de memòria efector, principalment T_{EMRA}, que presenta disminució en l'expressió dels receptors co-estimuladors CD27 i CD28 així com un augment de l'expressió de CD57, un marcador de d'incapacitat proliferativa (216). A més, aquesta modulació de la resposta adaptativa per part de la infecció persistent condueix a una remodelació de la composició global del compartiment T, el qual presentarà una menor freqüència de cèl·lules naïve i acumulació de cèl·lules memòria altament diferenciades i senescents (217). Aquest fenotip es relaciona amb

complicacions en l'hoste, com ara una resposta immunitària disminuïda a vacunes i noves infeccions, desordres autoimmunes, repertori reduït de cèl·lules T o alteracions cardiovasculars (87,218)

b) Resposta humoral

En contrast amb el patró de resposta a altres antígens, la magnitud de la resposta humoral contra el CMV incrementa amb l'edat (207,219,220) i està altament associada a fragilitat i mortalitat (221). Els mecanismes responsables dels canvis dependents d'edat no estan clarament definits, però títols elevats d'IgGs anti-CMV així com ADN viral en orina són més freqüents en individus d'edat avançada, suggerint més reactivacions durant l'envelliment (207). Les reactivacions continues de CMV i la pèrdua de qualitat de la resposta cel·lular resulten en títols més elevats d'anticossos IgG CMV-específics i condueixen a una producció augmentada de citocines pro-inflamatòries com IL-6 i TNF-α o proteïna C reactiva (PCR) (222–224). L'ambient inflamatori crònic generat per la resposta humoral contra CMV està associat a un elevat risc cardiovascular i a una elevada mortalitat (225–228) (Figura 8) així com amb dany neurocognitiu en individus majors de 65 anys (201). Aquest elevat risc cardiovascular s'ha descrit que podria venir donat principalment per tres mecanismes: (i) l'increment dels nivells d'inflamació, (ii) el dany vascular desencadenat durant la replicació activa de CMV en cèl·lules endotelials (190,229), així com en macròfags, fibroblasts i cèl·lules musculars llises que s'acumulen a la capa íntima dels vasos endotelials (230–232) i (iii) una immunosenescència accelerada (Revisat a (213)).

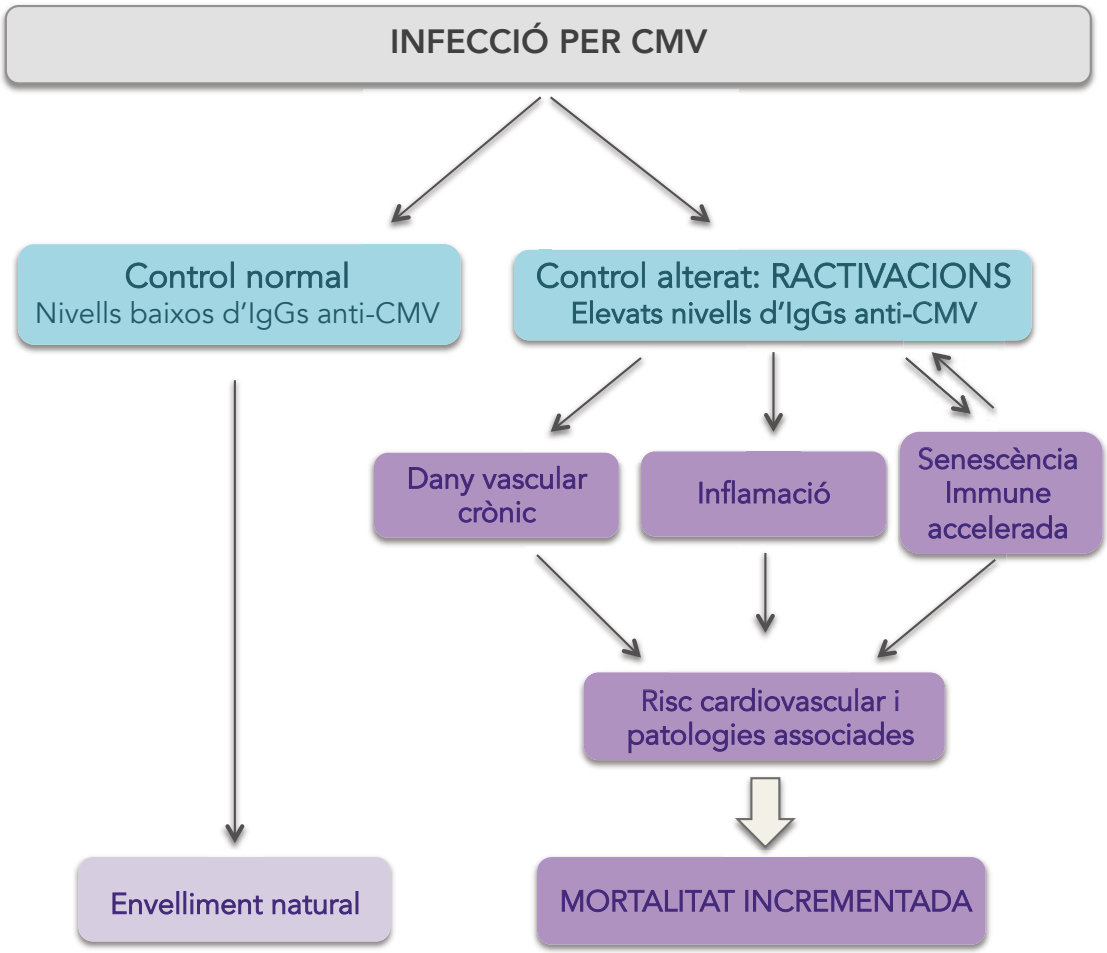

Figura 8. CMV, resposta humoral i patologia. La infecció pel CMV, i especialment quan va acompanyada d'elevats nivells d'IgG CMV-específiques, s'associa amb risc cardiovascular i mortalitat elevada. En molts individus, la infecció pel CMV condueix a un procés natural d'envelliment immunològic, però en determinats individus existeix una pèrdua del control de la infecció, donant-se episodis periòdics de reactivacions virals. Adaptat de Klenerman et al, 2016 (213).

3.5. Coinfecció VIH-CMV

Des dels primers diagnòstics d'infecció pel VIH, la coinfecció amb herpesvirus ha sigut una de les infeccions oportunistes més comuns en aquesta població, i malgrat que en individus infectats pel VIH el tractament TARGA afavoreix la reducció de la replicació del CMV i la malaltia associada (233), són diversos els estudis que han descrit les connexions d'aquesta coinfecció i una aparició accelerada d'immunopatologies i progressió a sida (87,234,235).

Aquests estudis han reportat que la coinfecció amb herpesvirus juga un paper important en la transmissió i adquisició del VIH, independentment del grau

d'immunosupressió, a partir de mecanismes com la disrupció física de la mucosa que afavoreix l'entrada del VIH o la inflamació local i reclutament de limfòcits T CD4. A més, els herpesvirus poden regular directament la replicació del VIH a través de la transactivació de l'ADN pro-viral i indirectament a través de la producció de citocines i quimiocines inflamatòries (Revisat a (236)).

La coinfecció VIH/CMV està associada a un perfil immunològic inflamatori (218) (revisat a (237)), incloent nivells circulants elevats de proteïna induïda per IFN-γ (IP-10) i dímer-D, una marcada expansió de cèl·lules T CD8 i una relació CD4/CD8 reduïda que caracteritza la infecció pel VIH (237,238), processos associats tots ells amb morbiditat i mortalitat elevades (239,240). Com s'ha explicat anteriorment, la infecció pel CMV, a més d'alterar el repertori de cèl·lules naïve i memòria, s'associa a una senescència accelerada i un esgotament cel·lular, fenotips altament associats a una funcionalitat cel·lular reduïda (212,241,242). Per aquest motiu, diversos estudis han associat la infecció per CMV tant amb progressió clínica (243) com immunopatogenesi (160,244) durant la infecció pel VIH, malgrat una supressió virològica completa. De fet, els efectes més negatius de la infecció pel CMV semblen tenir lloc durant TARGA, ja que la resposta contra el CMV s'amplifica en paral·lel amb la recuperació del sistema immunitari (87). Aquesta amplificació té com a resultat que els individus VIH$^+$, particularment durant TARGA, tinguin una resposta T CMV-específica més elevada que la població no infectada pel VIH (245,246).

A més, els nivells persistents d'IgGs anti-CMV que s'estableixen durant la infecció també han estat relacionats amb complicacions cardiovasculars (243), possiblement per una producció elevada d'IFN-γ (247) que participaria en l'engruiximent de les parets arterials (revisat a(248)).

En individus immunodiscordants la infecció pel CMV podria estar jugar un paper important en la resposta immunològica no favorable. De fet, en aquests individus el vincle entre la inflamació sistèmica associada i la coinfecció amb CMV ha sigut examinat en un estudi on s'observa una reducció significativa de l'activació cel·lular i la inflamació amb l'administració de valganciclovir (160). Tot i això, l'administració de valacyclovir en individus VIH$^+$ en TARGA i coinfectats amb altres herpesvirus no ha aconseguit disminuir els nivells d'immunoactivació (249).

Donat que tant la infecció pel CMV com pel VIH comporten un increment d'immunoactivació i inflamació, i que aquests processos estan associats a una pobra recuperació immunològica en individus VIH$^+$ en TARGA, és important entendre el paper que pot tenir la infecció crònica pel CMV en individus immunodiscordants amb l'objectiu de dissenyar noves estratègies terapèutiques.

4. Autofàgia i infecció pel VIH

4.1. Auto-canibalisme regulat

L'homeòstasi cel·lular es troba en una balança entre biosíntesi i degradació de macromolècules. Les principals vies catabòliques són el proteasoma i el lisosoma, sent aquesta última la via responsable de la degradació de macromolècules. Per tant, quan una cèl·lula està privada de nutrients, aquesta inicia una degradació controlada dels seus propis components per tal de mantenir-se viva a través d'un procés conegut com autofàgia, que literalment significa "menjar-se a un mateix". El terme autofàgia engloba la microautofàgia, l'autofàgia mediada per xaperones i la macroautofàgia (250), aquesta última és referida de forma general com autofàgia.

L'autofàgia és un dels mecanismes eucariòtics de supervivència cel·lular i defensa en front patògens més antic i conservat. És essencial que aquesta degradació via lisosoma sigui un procés controlat tant per mantenir la homeòstasi cel·lular a través de l'eliminació de components no funcionals o envellits i el seu reciclatge. El procés d'autofàgia s'indueix de forma reversible per senyals d'estrès com la falta de nutrients o factors de creixement, infeccions o hipòxia, i és executat i altament regulat per un grup de proteïnes relacionades amb autofàgia (ATGs) (251). El procés d'autofàgia consta de les següents tres etapes (252,253) (Figura 9):

a. **Iniciació: inactivació de mTOR** (*mammalian target of Rapamycin*). El complex mTOR és una Ser/Thr-quinasa que actua com a sensor i regulador de l'estat bioenergètic i del creixement cel·lular. En presència de nutrients, mTOR es troba actiu, fosforilat i inhibint la iniciació d'autofàgia. En condicions d'estrès i falta de nutrients, mTOR s'inactiva i permet l'activació d'ATG1 i la inducció d'autofàgia, que s'inicia amb la formació del fagòfor (porcions de reticle endoplasmàtic, aparell de Golgi o membrana plasmàtica), el qual s'expandeix i reconeix la porció citoplasmàtica amb proteïnes o orgànuls danyats.

b. **Expansió: formació i maduració de l'autofagosoma.** El segrest de

la porció citoplasmàtica danyada per part del fagòfor dóna lloc a la formació d'una estructura tancada de doble membrana anomenada autofagosoma. Més de 20 proteïnes ATG estan implicades en aquesta etapa. La incorporació de la proteïna LC3-II (*microtúbul associated protein-1 light chain 3 o MAP1 LC3II*) a l'autofagosoma és necessària per a la seva maduració i transport a lisosoma i és utilitzada com a marcador específic d'autofàgia (254).

c. <u>Degradació i reciclatge de la càrrega:</u> una vegada l'autofagosoma madur fusiona amb el lisosoma, aquest aboca el contingut enzimàtic que digereix les macromolècules contingudes i forma l'autolisosoma. El procés finalitza amb el reciclatge de la càrrega (principalment aminoàcids), que serà retornada al citoplasma mitjançant proteïnes de transport presents a la membrana lisosomal, i amb la re-activació de mTOR.

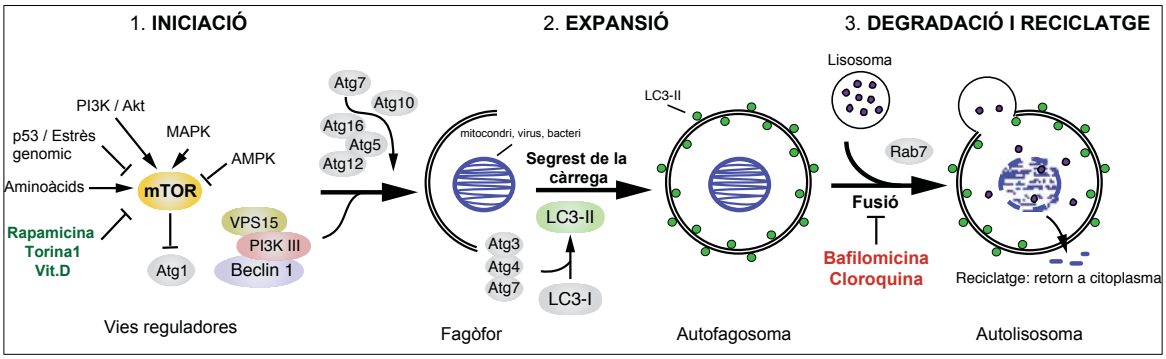

Figura 9. Etapes del procés d'autofàgia: (1) L'autofàgia s'inicia a través de vies que inactiven mTOR. (2) La formació de l'autofagosoma inclou l'assemblatge de LC3-II a la membrana del fagòfor i la formació de vesícules de doble membrana que segresten el material citoplasmàtic. (3) L'etapa final té lloc amb la proteòlisi del contingut: l'autofagosoma madur fusiona amb el lisosoma i el material a reciclar retorna al citoplasma. Adaptat de M.Killian 2012 (255)

4.2. Mesurant autofàgia

Existeixen diversos mètodes de detecció de l'autofàgia (Taula 1), sent la detecció de LC3-II associat a la membrana de l'autofagosoma un dels més comuns (256). Diferents compostos químics són utilitzats per a l'estudi de les diferents etapes de l'autofàgia: rapamicina, torina1 o vitamina D són alguns dels inductors d'autofàgia

(inhibidors de mTOR) més emprats es estudis *in vitro*. Tanmateix, la determinació d'autofagosomes es veu limitada per la seva vida mitja curta. Així doncs, la inhibició de la fusió entre autofagolisosoma i lisosoma (mitjançant bafilomicina A1 o cloroquina) s'utilitza generalment per incrementar la vida mitja dels autofagosomes i per tant millorar la seva detecció. La inhibició de l'ultima etapa de l'autofàgia permet avaluar el que es coneix com a flux autofàgic (256).

Taula 1. Mètodes de mesura d'autofàgia

Component diana d'autofàgia	Procediment
Quantificació d'autofagosomes, identificats com a estructures de doble membrana	Microscòpia electrònica*
Relació LC3-II/LC3-I: mesura de flux autofàgic, que incrementa amb la formació d'autofagosomes	*Western Blot* (WB)**
Localització de LC3-II visible a microscopi com a puntejat intracel·lular	Immunohistoquímica, Citometria de flux, Microscòpia de fluorescència*/**
Quantificació dels nivells l'expressió dels gens *ATG* (BECN1)	PCR quantitativa
Quantificació dels nivells l'expressió de proteïnes ATG (Beclin 1)	WB, ELISA
Manipulació del flux autofàgic	Rapamicina, Bafilomicina A1, 3-MA

* Mètode estàndard per a la quantificació d'autofagosomes
**Mètode estàndard per a la quantificació del flux autofàgic

4.3. Supervivència vs. mort cel·lular

L'autofàgia pot actuar com un mecanisme de pro-supervivència o bé dirigir processos de mort cel·lular en funció del context cel·lular i els estímuls rebuts (Figura 10). En condicions normals o sota una falta controlada de nutrients, l'autofàgia participa en diverses funcions cel·lulars implicades en la supervivència i en el manteniment de l'**homeòstasi cel·lular**: nivells basals d'autofàgia s'observen de forma constant a gairebé tots els tipus cel·lulars, sent un procés fonamental per la provisió de nutrients (catabolisme), generació d'ATP, disminució d'espècies reactives d'oxigen (mitofàgia), eliminació de components apoptòtics i reciclatge de components cel·lulars. El reciclatge de material cel·lular a l'hora està associat amb el procés d'envelliment ja que

comporta una mort cel·lular disminuïda i una major longevitat cel·lular. A més, l'autofàgia participa en altres processos implicats en la supervivència cel·lular com la degradació directa de patògens intracel·lulars, la diferenciació cel·lular o la prevenció d'apoptosi en limfòcits T (257).

Per contra, quan determinades pertorbacions o senyals d'estrès porten a una exacerbació de la resposta autofàgica s'indueix una mort independent de caspases coneguda com a **mort cel·lular autofàgica** o mort cel·lular programada tipus II (PCD-II) (258). La mort autofàgica es caracteritza per ser una mort associada a la formació de vesícules de doble membrana (autofagosomes) i, a diferència de la mort per apoptosi clàssica (mort cel·lular programada tipus I o PCD-I), no presenta condensació de la cromatina ni fragmentació d'ADN o alliberament de cossos apoptòtics. L'elevat contingut d'autofagosomes durant el procés de mort per autofàgia pot arribar a superar el volum de la resta de citosol, i aquest elevat volum de vacuoles i activitat autofàgica condueix a la destrucció de la major part d'orgànuls i finalment a la mort de la cèl·lula (258,259). Tot i això, el vincle entre autofàgia i mort cel·lular és un tema de controvèrsia, i el mecanisme exacte no està clarament definit. Alguns estudis postulen que l'autofàgia podria promoure la mort mitjançant la degradació de proteïnes implicades en la supervivència cel·lular o bé degut a que nivells elevats d'autofàgia resulten en un esgotament energètic de la cèl·lula (Revisat a (258)).

4.4. Autofàgia i resposta immunitària

L'autofàgia ha sigut recentment associada a funcions clau del sistema immunològic, incloent l'eliminació directa de patògens, la regulació d'activació i diferenciació de cèl·lules T, la implicació en la resposta adaptativa a través de la presentació antigènica o el control de processos inflamatoris (260,261).

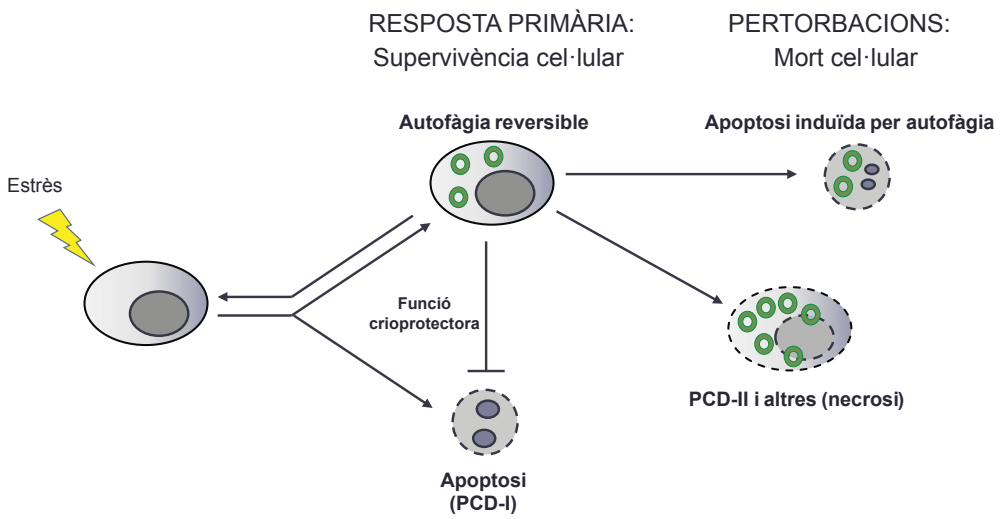

Figura 10. Diferents papers del procés d'autofàgia durant la mort cel·lular programada. L'esquema il·lustra les possibles contribucions de l'autofàgia a la supervivència o mort d'una cèl·lula exposada a senyals d'estrès com depleció de nutrients o de factors de creixement. Resposta primària: la cèl·lula inicia un procés d'autofàgia amb la finalitat de mantenir la seva viabilitat. Pertorbacions: si les senyals d'estrès no desapareixen, la cèl·lula morirà per apoptosi. Si el procés d'autofàgia esdevé excessiu degut a continues senyals d'estrès també s'activarà una resposta de mort cel·lular per apoptosi o per altres mecanismes (necrosi) en cas d'inactivació de caspases. Adaptat de Debnath i Baehrecke 2005 (258)

a. Autofàgia i inflamació

De forma general s'atribueix una funció anti-inflamatòria al procés d'autofàgia, que generalment té lloc a través de la disminució de l'activació de l'inflamasoma i de la senyalització d'IFN. La interacció entre autofàgia i inflamasoma, però, pot ser dual: per una banda el procés autofàgic inactiva l'inflamasoma degut a la continua eliminació de components endògens inflamatoris (ROS i ADN mitocondrial per exemple) (262,263), però d'altra banda l'autofàgia juga un paper positiu a curt termini ajudant en l'alliberament a l'espai extracel·lular de productes de l'inflamasoma, com IL-1β a través de la secreció no convencional via vesícules d'autofàgia (264). Així doncs, mentre que nivells basals d'autofàgia mantenen inhibida l'activació de l'inflamasoma i la conseqüent producció de citocines pro-inflamatòries, una disfunció de l'autofàgia està relacionada amb diverses malalties inflamatòries (Revisat a (261)). Donat que la infecció per VIH condueix a una depleció massiva de limfòcits T CD4 i una extensa inflamació i que són diversos els estudis que han posat de manifest el paper anti-

inflamatori de l'autofàgia, es suggereix un model on la resposta cel·lular T estaria afavorint la maquinària autofàgica per tal de disminuir aquest estat crònic inflamatori associat al VIH (265).

b. Autofàgia i resposta adaptativa

L'autofàgia està implicada en la resposta immunitària adaptativa a través dels seus efectes en la presentació antigènica, la selecció del repertori de cèl·lules T naïve, l'homeòstasi de la població T, la polarització del compartiment CD4 i en l'afavoriment de les funcions efectores i proliferatives dels limfòcits T (266) i Revisat a (261,267). A més, estudis recents han posat de manifest la importància de l'autofàgia durant el desenvolupament de la població de limfòcits T CD4 i sobre les seves funcions metabòliques i efectores (266,268–273), en la generació eficient de cèl·lules T CD8 memòria (274), i en la prevenció d'un envelliment cel·lular prematur (275) (resumit a Figura 11).

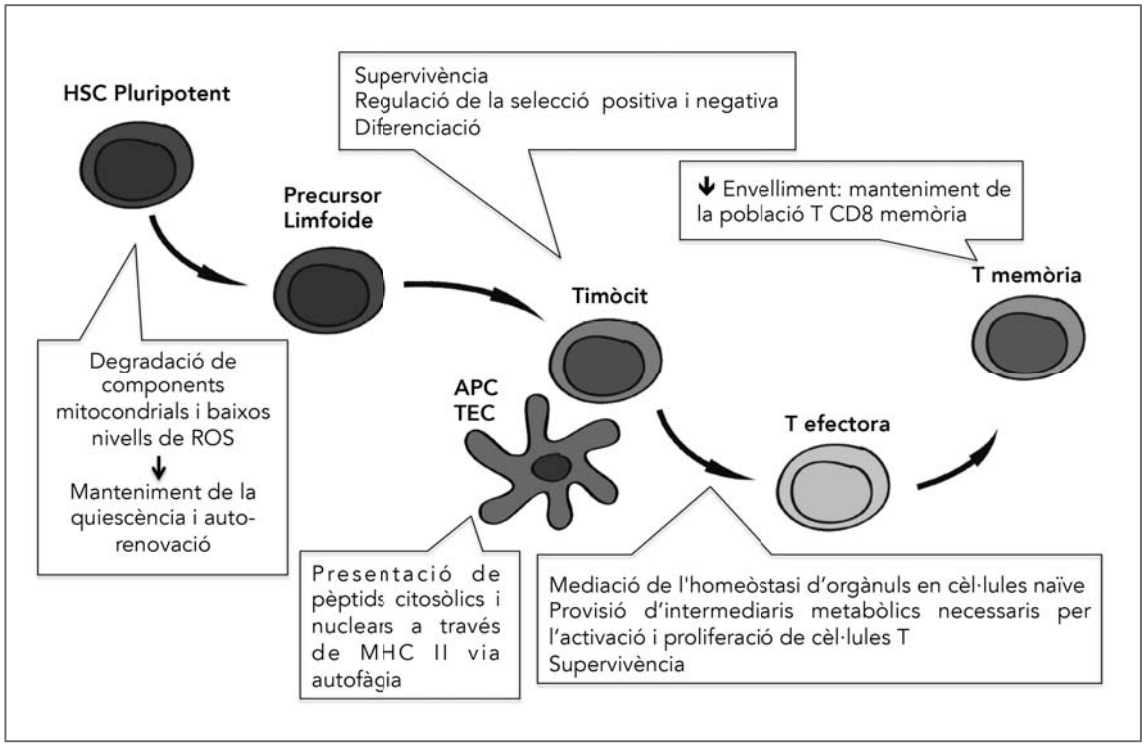

Figura 11. Autofàgia durant el desenvolupament de cèl·lules T. El procés d'autofàgia està altament implicat en les diferents etapes de la diferenciació T, participant en la degradació de components mitocondrials, presentació antigènica, així com supervivència i homeòstasi cel·lular (HSC: cèl·lules mare hematopoètiques, CLP: precursors limfoides comuns, APC: cèl·lules presentadores d'antigen, TEC: cèl·lules tímiques epitelials). Adaptat de Bronietzki et al 2015 (267)

Així doncs, donada l'elevada vinculació amb el sistema immunològic, dianes d'autofàgia estan sent considerades com aproximacions clíniques per la millora de determinades malalties. Una resposta autofàgica activada pot ser beneficiosa en malalties neuro-degeneratives o infeccions, mentre que una inhibició del procés podria ser una estratègia per combatre determinats tumors (257). De la mateixa forma, en el cas de la infecció pel VIH, es postula l'ús farmacològic de potenciadors autofàgics en combinació amb TARGA per tal d'incrementar l'eliminació de virus replicatius i no replicatius via lisosomal i poder contribuir així a l'eradicació del VIH. De fet, el tractament amb vitamina D com inductor autofàgic ha mostrat inhibir tant la replicació del VIH com de *M.tuberculosis* en macròfags humans a través d'un mecanisme dependent d'autofàgia (276,277), de la mateixa forma s'ha reportat l'ús de rapamicina com un immunosupressor implicat en la disminució de l'ADN pro-viral del VIH (278) i com a acompanyant d'agents reactivadors de la latència (279).

c. Autofàgia com a procés anti-viral o pro-viral

Les infeccions virals són senyals d'estrès que poden activar, reduir o fins i tot inactivar la via de mTOR per tal d'afavorir la replicació viral (280). El paper **antiviral** del procés d'autofàgia inclou processos de virofàgia, activació de resposta innata a través de l'exposició de components virals a TLRs (*Toll-like receptors*) endosomals, activació de la resposta adaptativa a través de la presentació d'antígens virals endògens a MHC-II i MHC-I i la regulació de la qualitat mitocondrial i de la producció de radicals lliures ROS (Revisat a (261,280,281)). Tant l'entrada viral, com la replicació i la producció de proteïnes virals fan incrementar els requeriments energètics cel·lulars que, sumant-se a la interacció entre proteïnes de la superfície dels virions i receptors de l'hoste, condueix a una activació de l'autofàgia. Però la pressió selectiva sobre els virus amb el pas dels anys ha conduït a la coevolució de variants que han desenvolupant estratègies per tal de manipular la maquinària de l'autofàgia al seu favor. Així, els virus eviten la seva degradació i afavoreixen la seva propagació i replicació viral a través de l'evasió de la captura autofàgica, la supressió de la iniciació de l'autofàgia o bé impedint la maduració de l'autofagosoma. Per tant, també es pot atribuir un paper **pro-viral** al procés d'autofàgia. Els mecanismes concrets a través dels quals els virus

evadeixen l'activitat antiviral de l'autofàgia i com utilitzen aquesta via cel·lular en el seu favor, no estan clarament definits. La interacció entre autofàgia i replicació viral és molt complexa, i pot variar en funció del tipus cel·lular i la via patogènica del virus en qüestió (Revisat a (261,280,281)). Hi ha diversos virus que poden induir autofàgia independentment de la replicació viral, com per exemple el VIH, on gp41 és suficient per activar-la (282).

4.5. Autofàgia i VIH. Rivals o aliats?

El VIH indueix una sèrie d'alteracions a l'hoste modificant l'entorn intracel·lular per tal d'afavorir la seva supervivència i propagació, entre d'altres, utilitzant la maquinària autofàgica de l'hoste per activar la seva pròpia replicació. Les proteïnes gp120 i gp41 de l'embolcall del VIH (Env) indueixen una autofàgia descontrolada que desencadena en una apoptosi accelerada tant en cèl·lules infectades com no infectades, sent més evident en aquestes últimes (283). En el cas de limfòcits T CD4 productivament infectats, el VIH és capaç de bloquejar l'autofàgia induïda per Env (Figura 12) amb l'objectiu d'abolir l'efecte antiviral (284). Aquesta repressió d'autofàgia en cèl·lules T CD4 infectades ve donada a través de la desregulació de Beclin 1, que condueix al bloqueig de la mort cel·lular i permet la replicació viral: s'observen nivells reduïts de LC3-II en cèl·lules VIH-infectades observades per microscòpia confocal o WB (285). La mort de cèl·lules no infectades associada al VIH es desencadena entre d'altres mecanismes, per la interacció entre CXCR4 present a la superfície de limfòcits T CD4 no infectats i Env present a la superfície de CD4 infectats, amb la fusió dirigida per gp41 (282). La unió d'Env a CXCR4 condueix a l'activació de mTOR i a la conseqüent fosforilació i activació de p53, que regula l'expressió i translocació de Bax al mitocondri, induint-se apoptosi dependent de caspases (286). L'activació inespecífica d'autofàgia per part de VIH podria estar donada per la inducció d'estrès oxidatiu per part de gp41, però no està clar si l'objectiu d'aquesta inducció és protegir de la mort als CD4 o bé induir-la (285).

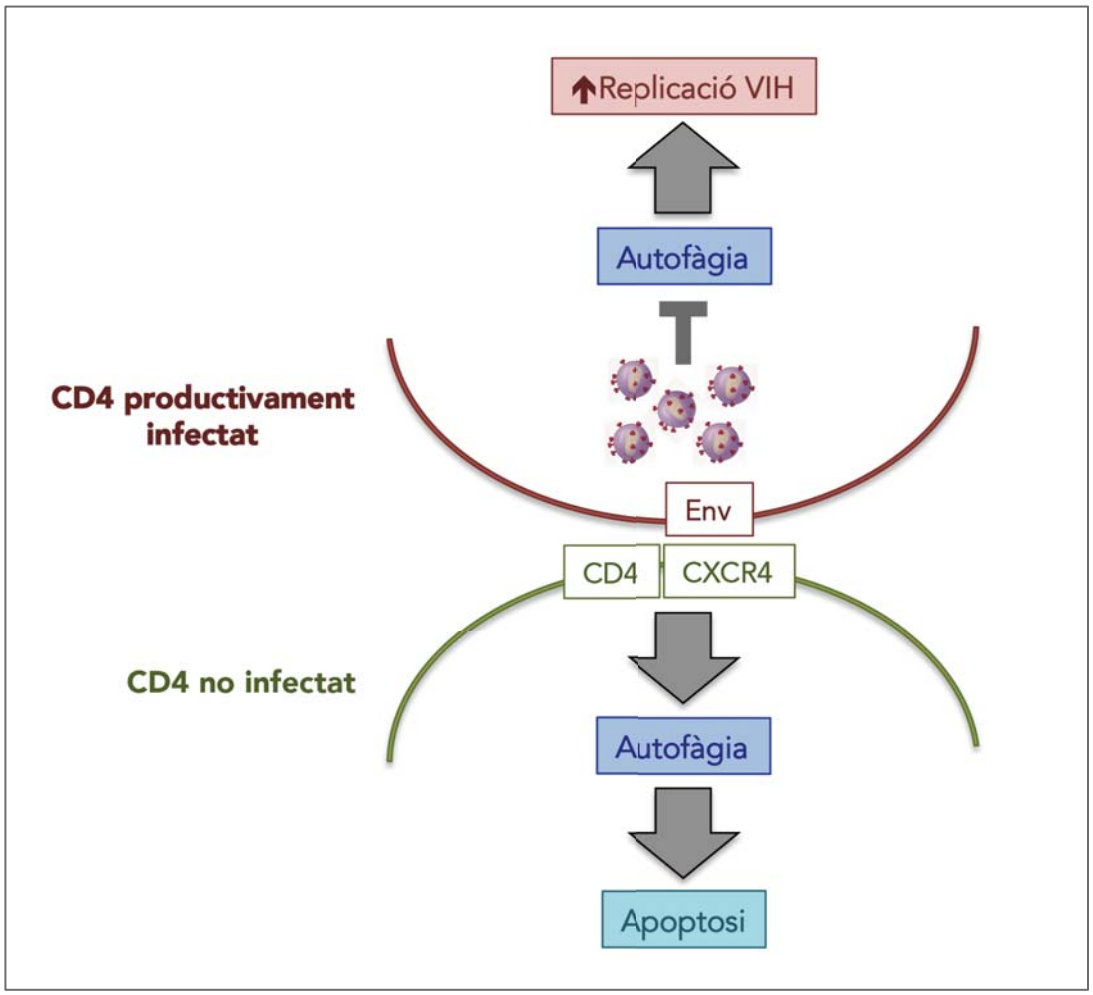

Figura 12. Representació la inducció/inhibició del procés d'autofàgia en cèl·lules T CD4 infectades o no per VIH-1. El procés d'autofàgia en limfòcits productivament infectats es troba bloquejat, afavorint així la replicació viral. En el cas dels limfòcits T CD4 no infectats (*bystander)* la unió de CXCR4 a Env, expressat en cèl·lules properes infectades per VIH, desencadena un procés d'autofàgia descontrolat que condueix a la cèl·lula a una mort apoptòtica, participant així en la immunopatogènesi de VIH. Adaptat de Espert et. Al 2006 (283)

En limfòcits T CD4 no infectats, l'apoptosi induïda per autofàgia pot ser inhibida farmacològicament (282,283). Aquesta inhibició podria ser beneficiosa activant les respostes innata i adaptativa i millorant l'eficàcia de vacunes. S'ha descrit un paper favorable del procés d'autofàgia en individus VIH$^+$ no progressors, en els quals s'ha observat una major activitat autofàgica relacionada directament amb una millor supervivència cel·lular, i podria jugar un paper clau en la limitació de la depleció limfocitària induïda per VIH (265). Per tant, l'apoptosi dependent d'autofàgia en cèl·lules no infectades pot contribuir a la depleció de limfòcits T CD4 i podria estar implicada en la pobra recuperació immunològica observada en individus immunodiscordants.

HIPÒTESIS i OBJECTIUS

En individus immunodiscordants, el tractament TARGA aconsegueix reduir a nivells indetectables la càrrega viral però no aconsegueix incrementar favorablement el nivells de cèl·lules T CD4. Aquests individus presenten un perfil esbiaixat en la maduració dels limfòcits T, alts nivells d'activació, senescència i esgotament immunitari, encara que es desconeix si aquests canvis fenotípics també estan associats a canvis en la funcionalitat cel·lular. Els canvis fenotípics juntament amb una disminució en la funcionalitat del sistema immunitari podrien ser les causes de les taxes de mortalitat i morbiditat elevades observades en individus immunodiscordants.

Diversos paràmetres s´han correlacionat amb la manca de recuperació del recompte de cèl·lules T CD4, entre ells la coinfecció amb CMV. La infecció amb CMV indueix un estat d'activació immunitària persistent provocant importants canvis funcionals i fenotípics al compartiment de limfòcits T. En individus immunodiscordants s'ha descrit que la infecció amb CMV podria estar jugant un paper en l'augment d'activació immunitària , però no s'ha descrit si altres pertorbacions associades a la coinfecció podrien tenir també implicacions en la resposta immunodiscordant. Per tot això ens plantegem el següent objectiu:

OBJECTIU 1. Analitzar la funció cel·lular del compartiment T en individus VIH$^+$ virològicament suprimits immunoconcordants i immunodiscordants així com en individus VIH-negatius.

- Analitzar la funcionalitat de la resposta immunitària global utilitzant una estimulació policlonal.
- Analitzar la funcionalitat de la resposta immunitària especifica contra CMV i VIH.
- Correlacionar la resposta CMV-especifica amb el perfil de maduració de cèl·lules T.

La infecció pel CMV es caracteritza per alternar una infecció latent amb períodes de reactivació que resulten en un increment en la resposta immunològica, tant humoral com cel·lular. Aquesta resposta exacerbada es tan beneficiosa com nociva per l'hoste, ja que és protectora en front a la malaltia desenvolupada pel CMV però al mateix temps té múltiples efectes perjudicials. Així, la resposta immunològica contra el CMV

està associada amb desordres cardiovasculars i mortalitat elevada tant en individus VIH$^+$ com en població no infectada. En individus VIH$^+$, els nivells d'anticossos IgG anti-CMV s'han associat amb malaltia cardiovascular, deteriorament de la funció física, progressió de la infecció pel VIH i activació cel·lular. El paper que la immunitat humoral té en la resposta immunodiscordant al tractament no ha sigut avaluada, per això ens plantegem el següent objectiu:

OBJECTIU 2. Avaluar l'associació entre la resposta humoral anti-CMV i la pobra recuperació immunològica en individus VIH$^+$ immunodiscordants.

- Avaluació de la seroprevalença i associació entre la magnitud de la resposta IgG contra CMV i variables de recuperació immunològica.
- Determinació del grau de reactivacions virals a través de l'estudi de la resposta humoral.

La pobra recuperació immunològica dels individus immunodiscordants ha estat àmpliament estudiada. Entre els diversos factors que s'han associat amb aquesta resposta immunodiscordant al tractament, un increment en l'apoptosi de cèl·lules T CD4 ha estat descrit per diferents autors. El procés d'autofàgia té una elevada implicació en la resposta immunitària contra patògens, jugant un paper clau en la infecció pel VIH inhibint la seva replicació en cèl·lules T CD4 infectades i induint l'apoptosi quan la infecció és abortiva. A més, l'autofàgia està altament associada a processos inflamatoris i de diferenciació i supervivència cel·lular. Per tant, el procés d'autofàgia podria estar jugant un paper important en la resposta immunodiscordant al tractament i per això ens plantegem el següent objectiu:

OBJECTIU 3. Estudiar la implicació del procés d'autofàgia en la pobra recuperació immunològica d'individus VIH$^+$ immnunodiscordants.

- Determinació de la capacitat autofàgica dels limfòcits T CD4 i associació amb paràmetres de recuperació immunològica.

RESULTATS

CAPÍTOL I

Anàlisi de la recuperació de la funció cel·lular policlonal i específica (VIH i CMV) en individus VIH+ en TARGA i suprimits virològicament

Preserved immune functionality and high CMV-specific T-cell responses in HIV-infected individuals with poor CD4+ immune recovery

Elisabet Gómez-Mora[1], Elisabet García[1], Victor Urrea[1], Marta Massanella[1,2], Jordi Puig[3], Eugenia Negredo[3], Bonaventura Clotet[1,3,4], Julià Blanco[1,4] and Cecilia Cabrera[1]

[1] Institut de Recerca de la Sida IrsiCaixa-HIVACAT, Institut d'Investigació en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol, IGTP, UAB, 08916 Badalona, Spain
[2] Université de Montréal, Faculté de Médecine, Department of microbiology, infectiology and immunology, Centre de Recherche du CHUM, Montréal, QC, Canada
[3] Fundació Lluita contra la SIDA, Hospital Germans Trias i Pujol, 08916 Badalona, Spain
[4] Universitat de Vic-UCC, 08500 Vic, Barcelona, Spain

Submitted for publication, Scientific Reports (May 2017).

Abstract

Poor CD4$^+$ T-cell recovery after antiretroviral treatment (ART) has been associated with skewed T-cell maturation, inflammation and immunosenescence, however T-cell functionality in those individuals has not been fully characterized. In the present study, we assessed T-cell responses to polyclonal, CMV and HIV stimuli in a group of CMV-seropositive HIV-infected individuals with different CD4$^+$ T-cell recovery upon virologically suppressive ART. A group of CMV-seropositive HIV-uninfected individuals were also included as controls. Frequency, functional capacity and differentiation profile of CD4$^+$ and CD8$^+$ responding T cells were compared among groups. Following polyclonal stimulation with PMA/ionomycin, T-cell polyfunctionality was preserved in individuals with low CD4$^+$ T-cell recovery (immunodiscordant individuals). The magnitude of total IFN-γ$^+$ CD8$^+$ and IL-2$^+$ CD4$^+$ T cells in response to CMV was higher in immunodiscordant than in immunoconcordant or HIV-seronegative individuals. Increased frequency of CMV-specific responses were observed in several CD4$^+$ T-cell memory subsets and were associated with the distribution of the memory CD4$^+$ T-compartment in a group dependent manner. Interestingly, the differentiation pattern of CMV-specific T cells was strongly dependent of the CMV antigen used and the HIV serostatus but not to the CD4$^+$ T-cell recovery. HIV-specific CD4$^+$ T-cell response was not reduced in immunodiscordant individuals as compared to immunoconcordant individuals. In conclusion, CD4$^+$ and CD8$^+$ T-cell polyfunctionality was not reduced in immunodiscordant individuals, however, heightened CMV-specific immune response may be contributing to the skewed T-cell maturation and the higher risk of clinical progression observed in those individuals.

Introduction

Combination antiretroviral therapy (cART) with effective control of viral replication and subsequent immunologic reconstitution has dramatically improved the health of HIV-infected individuals, resulting in a reduction of HIV-related morbidity and mortality [1]. However, despite persistent virus suppression, about 15-30% of treated HIV-infected individuals fail to achieve optimal $CD4^+$ T-cell reconstitution, referred as immunological non-responders or immunodiscordant individuals [2, 3]. Several factors have been associated with a poor $CD4^+$ T-cell immune recovery (reviewed in [4]), among others altered thymic production [5, 6], low nadir CD4 counts [7], older age [8], high levels of immune activation [5, 7, 9] and increased cell death [5, 7]. Additionally, immunodiscordant individuals show a skewed T-cell maturation profile [10-13], increased expression of markers of replicative senescence ($CD28^+CD57^+$) [6, 13, 14] and high frequencies of programmed cell death protein-1 (PD-1)-expressing $CD4^+$ T cells [5, 15], a phenotype associated with immune exhaustion, and defined by loss of effector functions and proliferative capacity. However, it is unclear how these changes affect the functional diversity (ie, polyfunctionality) of $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells in immunodiscordant individuals.

Cytomegalovirus (CMV) infection in healthy individuals is usually asymptomatic and results in latent infection. CMV co-infection is highly prevalent in the HIV-infected population (between 75 and 100%) [16, 17] and episodes of CMV-reactivation are increased, affecting morbidity and mortality [18]. CMV infection is also associated with significant changes in the composition of the T-cell repertoire, accelerated T-cell immunosenescence and immune exhaustion [19, 21]. In particular, CMV has been described as a major contributor to the increased immune activation and senescence observed in HIV^+ individuals with poor $CD4^+$ T-cell recovery [22]. Furthermore, increased CMV-specific antibodies and/or T cells have been associated with atherosclerosis and impaired $CD4^+$ T-cell reconstitution in HIV-infected individuals on treatment [23-26]. However, CMV-specific T-cell responses in individuals with poor $CD4^+$ T-cell recovery have not been completely characterized.

We hypothesized that skewed $CD4^+$ T-cell maturation and increased exhaustion could be factors contributing to an impaired T-cell polyfunctionality in immunodiscordant

individuals. Therefore, in the present study we analyzed cellular immune response of CMV-seropositive HIV-infected individuals with different $CD4^+$ T-cell recovery upon virologically suppressive cART. The frequency, functional capacity and differentiation profile of $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells after PMA and ionomycin, CMV and HIV stimulation was evaluated. In order to characterize more accurately the $CD4^+$ T-cell functionality, the most impaired population in immunodiscordant individuals, different CMV antigenic preparations optimal for stimulating a robust response especially from $CD4^+$ T cells [27-31] were included.

Methods

Subjects

A total of 43 HIV-infected individuals were recruited for the study. Inclusion criteria for all participants were confirmed diagnosis of HIV infection, continuous cART with sustained undetectable HIV-1 RNA (plasma viral load <50 copies/ml) for at least the past 2 years (minimum of four determinations during this time period) and good antiretroviral treatment (ART) adherence. Individuals were classified as immunoconcordant (favorable virologic and immunologic response) when $CD4^+$ T-cell counts were above 400 cells/µL and as immunodiscordant individuals (favorable virologic response but unsatisfactory immunologic response) if $CD4^+$ T-cell counts were persistently less than 350 cells/µL. For comparative purposes a control group of 21 HIV-uninfected individuals was also analyzed. The institutional review board of the Hospital Germans Trias i Pujol approved the study (EO code: EO-07-024). The methods were carried out in accordance with the Declaration of Helsinki. Written informed consent was obtained from all participants.

Determination of anti-CMV IgG levels

The CMV-specific IgG antibodies were measured using the semi-quantitative chemiluminiscent immunoassay (Synlab Diagnostics, Barcelona, Spain). Samples determined as <12U/ml were considered negative, determinations between 12 and 14U/ml were undetermined, and >14U/ml were considered positive samples.

CMV viral load detection by RT-PCR

CMV viral load was detected by extraction of DNA from urine samples (QIAmp Viral DNA Kit, Qiagen) and analyzed by real time PCR (Realquality RQ-CMV AB Analitica) according to the manufacturer's instructions (AB Analitica). The assay detected CMV DNA in a linear range from 600 copies/mL to 6×10^8 copies/mL.

Analysis of polyfunctionality of T cell responses

Ex vivo expression of IFN-γ, IL-2 and TNF-α by $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells was assessed by multicolor flow cytometry analysis. In brief, freshly isolated PBMCs ($2x10^6$ cells per condition) were stimulated in polypropylene tubes with (i) PMA (6.25ng/mL) plus ionomicyn (0.6μM), (ii) a purified CMV viral lysate (0.5μg/ml, ZeptoMetrix, Buffalo, NY), (iii) a pool of overlapping peptides (15-mer) covering the whole HCMV pp65 protein (30μg/ml, obtained through the NIH AIDS Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH) [31-33] (iv) a recombinant CMV-pp65 protein (7.5 μL per sample, Milteny Biotec, Madrid, Spain), (v) a recombinant HIV p24 capsid protein (5.5 μg/ml, Protein Sciences Corp) or (vi) left unstimulated in the presence of anti-CD49d and anti-CD28 (1μg/ml, Becton Dickinson). After 2 hours of incubation at 37ºC, Brefeldin A and Monensin were added according to the instructions of the manufacturer (both from Becton Dickinson) and cells were incubated for an additional 6h. Cells were then washed and labeled with the Fixable Yellow Dead Cell Stain Kit (Invitrogen) to identify dead cells, washed and stained with the following extracellular antibody combination: V450-CD3, V500-CD8, Alexa700-CD45RA, PE-Cy7-CCR7 and BV605-CD27 (all from Becton Dickinson) and eFluor650-CD4 (e-Biosciences). Subsequently, cells were fixed and permeabilized with Cytofix/Cytoperm (Becton Dickinson) and intracellular staining was carried out with FITC-IFN-γ, APC-IL-2 and PE-TNF-α (all from Becton Dickinson). After intracellular staining, cells were washed and acquired in LSR-Fortessa flow cytometer (Becton Dickinson) in the Cytometry Core Facility at Germans Trias i Pujol Research Institute.

Analysis of flow cytometry data

Flow cytometry data were analysed using FlowJo software (9.8v; TreeStar, Portland, OR, USA). Initial gating was performed on the forward scatter height vs. forward scatter area to remove doublets, and then living T lymphocytes were gated according

morphological parameters and cell viability followed by identification of $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells (Figure S1). Mitogen PMA/ionomycin stimulation leads to a rapid downregulation of membrane expression of $CD4^+$ [34, 35], therefore $CD3^+$ $CD8^-$ T cells were used to analyzed the $CD4^+$ T-cell response in the non-specific analysis. Finally, $CD4^+$ and $CD8^+$ T-cell subpopulations were identified by the expression of CD45RA, CCR7 and CD27 (Figure S1). For the cytokine production analysis, individual gates (set on the basis of the unstimulated control) were made to identify positive responses (Figure S1). FlowJo Boolean gating was performed to create a full array of possible combinations of up to 8 response patterns from the $CD4^+$ and $CD8^+$ T-cell gate. Positive responses were reported after background correction and with at least 40 events. Polyfunctionality was represented visually using Pestle (v1.7) and SPICE (v5.35) software (provided by the National Institutes of Health, Mario Roederer, ImmunoTechnology Section, Vaccine Research Centre, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) [36]. In addition to SPICE analysis, we used the polyfunctional index (PI) defined by Larsen *et al.* [37] (Funky Cells Toolbox; [38]), which numerically evaluates the degree and variation of polyfunctionality and allows comparative statistical tests.

Differentiation profile of IFN^+ and $IL\text{-}2^+$ $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells were created by FlowJo Boolean gating and subsequent SPICE analysis. In addition, functionality of each of the CD45/CCR7/CD27 differentiation subsets was assessed by the determination of $IFN\text{-}\gamma^+$ and $IL\text{-}2^+$ cells within those subsets. In the CMV- and HIV-specific response we do not report on TNF-α production to avoid false-positive results because a low signal-to-background ratio was found in the staining.

Statistical analysis

Statistical analysis and graphical presentation were performed using Prism software (5.0av; GraphPad). To compare pie charts, we used the SPICE permutation (10,000 permutations) analysis. Mann-Whitney U nonparametric test was used for comparing data among specific responses (*$p<0.05$, **$p<0.01$, ***$p<0.001$). Spearman's correlation coefficient was calculated to identify associations between variables.

Results

Participant characteristics

A total of 43 HIV-infected individuals were included: 25 participants were classified as immunoconcordants and 18 as immunodiscordants (Table 1). Both HIV-infected groups were similar in age, gender, prevalence of HCV, time since diagnosis and treatment conditions (Table 1). As per inclusion criteria, significantly lower absolute $CD4^+$ T-cell counts were observed in the immunodiscordant group than in the immunoconcordant group. In addition, also lower nadir $CD4^+$ T-cell counts and $CD8^+$ T-cell counts were observed in the immunodiscordant group. Although not significant, a higher proportion of CMV-seropositive (CMV^+) individuals were found in the HIV-infected group than in the HIV-uninfected control group. None of the participants had detectable CMV viral load in urine samples as assessed using quantitative CMV-PCR.

Impact of CMV on T-cell maturation and polyfunctionality

Previous studies have demonstrated phenotypic and functional changes in T cells induced by CMV infection [19, 39-43]. Accordingly, we observed a significant impact of CMV serostatus in the phenotypic distribution of $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells (p=0.04 and 0.01, respectively). CMV-seropositive HIV-uninfected individuals showed decreased naïve cells and increased $CD27^-$ subsets (late T_{EM} and T_{EMRA} cells) than CMV-seronegative (Figure 1A). Moreover, significant differences in the polyfunctional profile after PMA/Ionomycin stimulation of $CD4^+$ T cells (p=0.05), and a trend in $CD8^+$ T cells, was also observed between CMV-seropositive and CMV-seronegative HIV-uninfected individuals (Figure 1B). Phenotypic and functional changes by CMV infection in the HIV^+ ART-treated population could not be analyzed because the low number of HIV^+CMV^- individuals recruited. However, to avoid the bias induced by the potential immunological impact of CMV infection, only CMV-seropositive individuals were included for the rest of the analyses.

Table 1. Main clinical and immunological characteristics of participants

	Uninfected controls (n=21)	HIV+-Infected ART-Treated (n=43)	*p*-value[1]	HIV+ Subgroups		
				Immuno-concordant (n=25)	Immuno-discordant (n=18)	*p*-value[2]
Gender (male); n (%)	11 (50)	38 (88.4)	***0.0034***	21 (84)	17 (94.4)	*0.38*
Age (years); Median [IQR]	41 [38-51.5]	50 [48-56.5]	***0.0011***	49 [48-54]	50 [48-54.2]	*0.63*
CMV-seropositive individuals; n (%)	13 (62)	36 (83.7)	*0.13*	21 (84)	15 (83)	*1*
Absolute CD4+ T-cell count (cells/µL); Median [IQR]	753.8 [545.1-993.8]	440.6 [248-908.6]	***0.037***	849 [658.3-1214]	254.4 [166.4-306.3]	***<0.0001***
Absolute CD8+ T-cell count (cells/µL); Median [IQR]	344.6 [306.3-375.6]	613.5 [405.4-840.8]	***<0.0001***	733.4 [572.3-1151]	397.7 [298.1-658]	***0.0014***
CD4+ Nadir (cells/µL); Median [IQR]				167 [74-281.5]	61 [14.5-133.8]	***0.0014***
Time since HIV diagnosis (years); Median [IQR]				21 [17-27]	24.25 [17-28]	*0.96*
Time on ART (years); Median [IQR]				17 [15-22]	17.25 [13-20]	*0.37*
HCV co-infection; n (%)				10 (40)	7 (38.9)	*1*

[1]Comparison of HIV-infected ART-Treated and uninfected individuals (Mann-Withney U or Fisher exact test)

[2]Comparison of immunoconcordant and immunodiscrodant HIV-infected ART-Treated individuals (Mann-Withney U or Fisher exact test)

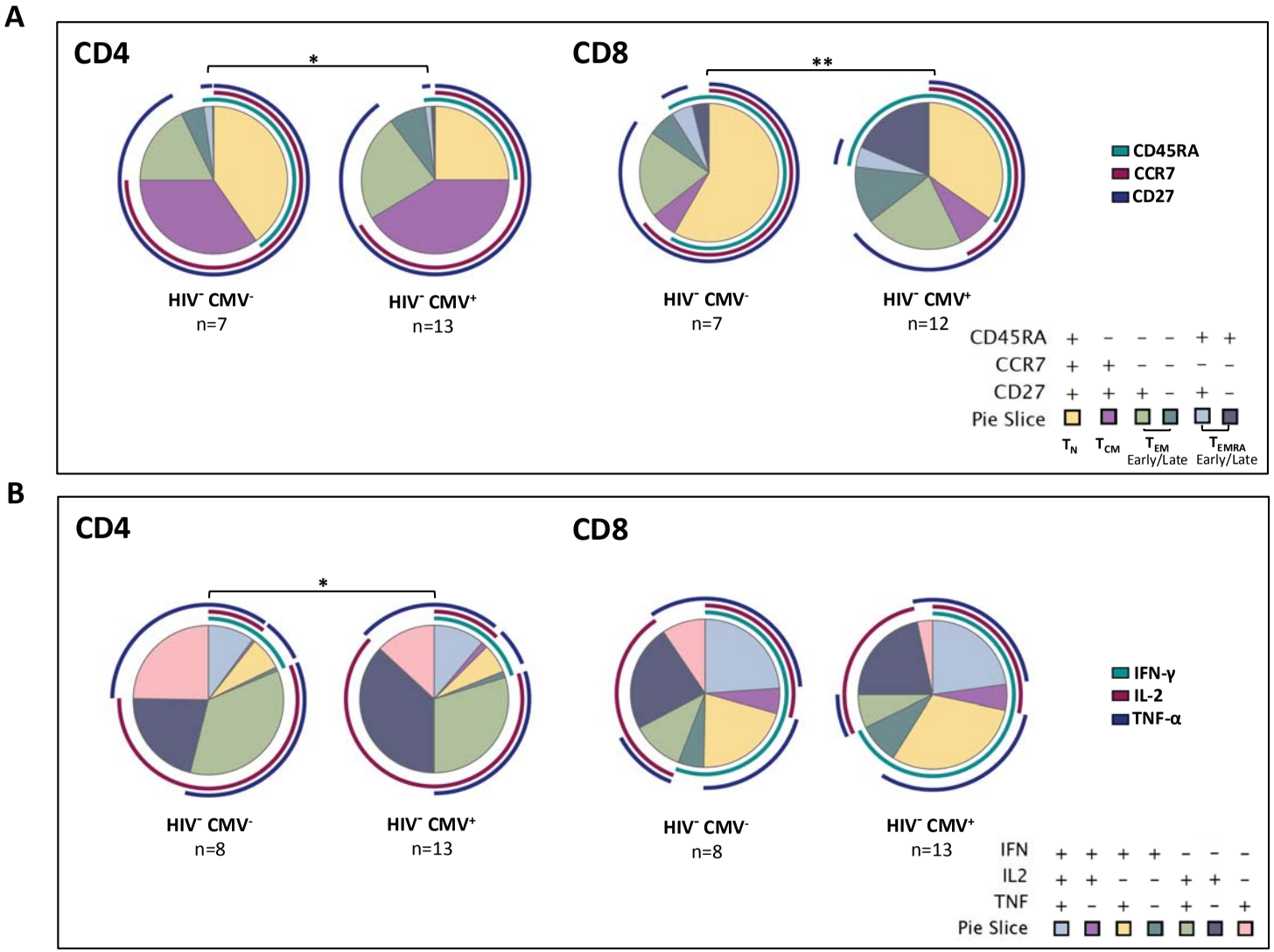

Figure 1. Phenotypic and functional changes induced by CMV infection. A) CD4⁺ and CD8⁺ T-cell differentiation profile in HIV-uninfected CMV-seropositive and -seronegative individuals. The differential expression of CD45RA, CCR7 and CD27 by CD4⁺ and CD8⁺ T cells was analyzed by boolean gating. Pie charts illustrate relative proportions of each of the different subsets in CMV-seropositive and CMV-seronegative. B) CD4⁺ and CD8⁺ T-cell responses to PMA/ionomycin stimulation in HIV-uninfected individuals stratified by CMV serostatus. Polyfunctional profiles of CD4⁺ and CD8⁺ T cells responding to PMA/ionomycin are showed. Detail of the 3-function combinations (IFN-γ, IL-2 and TNF-α) of CD4⁺ and CD8⁺ T cells responding to PMA/ionomycin is depicted on the bottom of the figure. Statistical comparisons of the profiles were performed by partial permutation tests, using Spice software (*$p<0.05$, **$p<0.01$).

Polyfunctional profile of CD4$^+$ and CD8$^+$ T-cell responses according to CD4$^+$ T-cell recovery

To evaluate the T-cell functional diversity in the three analyzed groups (HIV-negative, HIV$^+$ immunoconcordant and HIV$^+$ immunodiscordant), frequencies of CD4$^+$ and CD8$^+$ T cells that expressed IFN-γ, IL-2 and TNF-α following the strong non-specific stimulation with PMA/ionomycin were evaluated (Figure 2). CD4$^+$ T cells from immunodiscordant subjects secreted slightly higher, but not significant total levels of IFN-γ and similar IL-2 and TNF-α levels than HIV-negative and immunoconcordant individuals (Figure 2A, Panel CD4). Consistently, no significant differences between the three groups were observed when the polyfunctional index (Figure 2B, Panel CD4) or the SPICE polyfunctional profile (Figure 2C, Panel CD4) was compared among groups. However, in a more detailed analysis, the immunodiscordant group showed an increase in all the IFN-γ$^+$ subsets, reaching statistical significance in the bifunctional subset displaying IFN-γ and IL-2 and the subset producing IFN-γ alone. Conversely, a lower proportion of the monofunctional IL-2$^+$ subset was found in the immunodiscordant group compared with HIV-uninfected individuals (Figure 2C, Panel CD4).

Likewise, immunodiscordant individuals showed a significant higher proportion of total CD8$^+$ T cells producing IFN-γ in comparison with immunoconcordant individuals ($p=0.05$) with no differences in the polyfunctional index or in the SPICE polyfunctional CD8$^+$ T cell profile between groups (Figure 2, Panel CD8). All these data suggest that, after a global stimulation, the CD4$^+$ and CD8$^+$ T-cell polyfunctionality profile is preserved in immunodiscordant individuals compared with immunoconcordant and HIV-negative individuals, although a skewed response towards high IFN-γ production could be observed in immunodiscordant individuals.

Functional T-cell response mediated by IFN-γ and IL-2 against CMV and HIV

To further investigate the functional properties of the different groups of individuals, CMV-specific immune responses (IFN-γ and IL-2 production) were analyzed. Three different CMV antigens were used: a whole CMV viral lysate, containing a high diversity of T-cell epitopes, a pp65 peptide pool, and the pp65 recombinant protein.

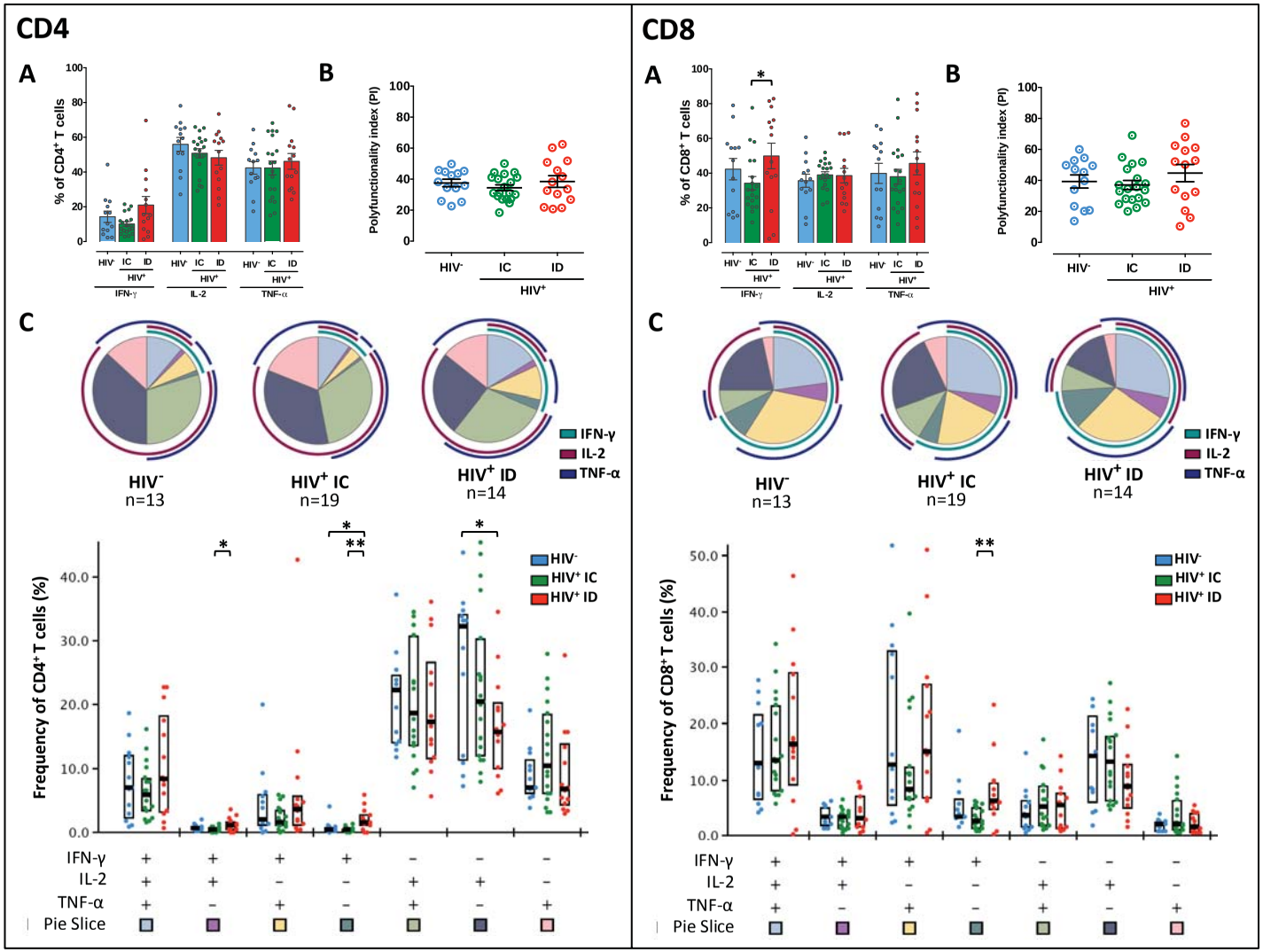

Figure 2. CD4⁺ and CD8⁺ T-cell responses to PMA/ionomycin stimulation (A) The frequency of CD4⁺ and CD8⁺ T cells positive for each cytokine (IFN-γ, IL-2 and TNF-α) is represented as a percentage of CD4⁺ T cells (mean and SEM). (B) Polifunctionality index (PI) of HIV-uninfected individuals, immunoconcordant and immunodiscordant individuals (Mean and SEM are represented). (C) Pie charts representing the polyfunctional profile of CD4⁺ and CD8⁺ T cells from HIV-uninfected individuals, immunoconcordant and immunodiscordant individuals. Arcs depict cytokine makeup within pie slice. Dot graphs indicate percentage of responding cells based on different combinations of cytokine function. The combination of functions studied (pie slice) is indicated in the graph below (Median and IQR are represented). Nonparametric Mann-Whitney U test was used to analyze differences between groups (*p<0.05, **p<0.01). HIV⁻: HIV-uninfected individuals; HIV⁺: HIV-infected ART-treated individuals; IC: immunoconcordant individuals; ID: immunodiscordant individuals.

A similar pattern of total IFN-γ$^+$ and IL-2$^+$ CMV-specific CD4$^+$ and CD8$^+$ T cells was observed in response to all the CMV antigens used, although the magnitude was different between antigens in the two T-cell populations (Figure 3). As expected, the IFN-γ response was higher in CD8$^+$ T cells than in CD4$^+$ T cells after stimulation with all the stimuli and the proportion of IFN-γ$^+$ cells, in both CD4$^+$ and CD8$^+$ T cells, exceeded that of IL-2$^+$ cells. Between groups, a tendency to higher total IFN-γ-secreting cells in the immunodiscordant group was observed, although only in CD8$^+$ T cells stimulated with CMV viral lysate reached significant differences in comparison with the HIV-negative group (p=0.015) (Figure 3). The proportion of total IL-2$^+$ pp65 peptide pool-specific CD4$^+$ T cells was significantly increased in both immunoconcordant and immunodiscordant individuals in comparison with the HIV-negative group (p=0.034 and p=0.008 respectively). IL-2$^+$ CD4$^+$ T cells were also significantly higher in immunodiscordant than in immunoconcordant individuals after CMV viral lysate stimulation (p=0.046). In CD8$^+$ T cells, an increase of IL-2$^+$ cells was observed in immunoconcordant individuals in comparison to both immunodiscordant and the HIV-negative group in presence of CMV pp65 peptide pool (p=0.046 and p=0.042 respectively). Furthermore, an association between cellular and humoral CMV-specific immune responses was found. Higher CMV IgG levels were observed in immunodiscordant individuals with a significant association between IL-2$^+$ CMV-specific CD4$^+$ T-cell response and the anti-CMV IgG titers (Spearman r=0.34; p=0.03) (data not shown. Gomez-Mora et al, Manuscript submitted).

Regarding HIV-specific responses, after stimulation with the HIV-1 p24 recombinant protein, the mean frequency of HIV-specific CD4$^+$ T cells was lower that the CMV-responses and no differences were observed between immunoconcordant and immunodiscordant individuals (Figure 3). The CD8$^+$ T cell response to the HIV p24 recombinant protein appeared to be negligible with a mean frequency of 0.016 of the total CD8$^+$ subset responding to the protein. Thus, the results obtained by the analysis of distinct CMV Ag-specific responses indicated that an increased CMV-specific response could be observed in HIV-positive individuals and the response was highest in immunodiscordant individuals.

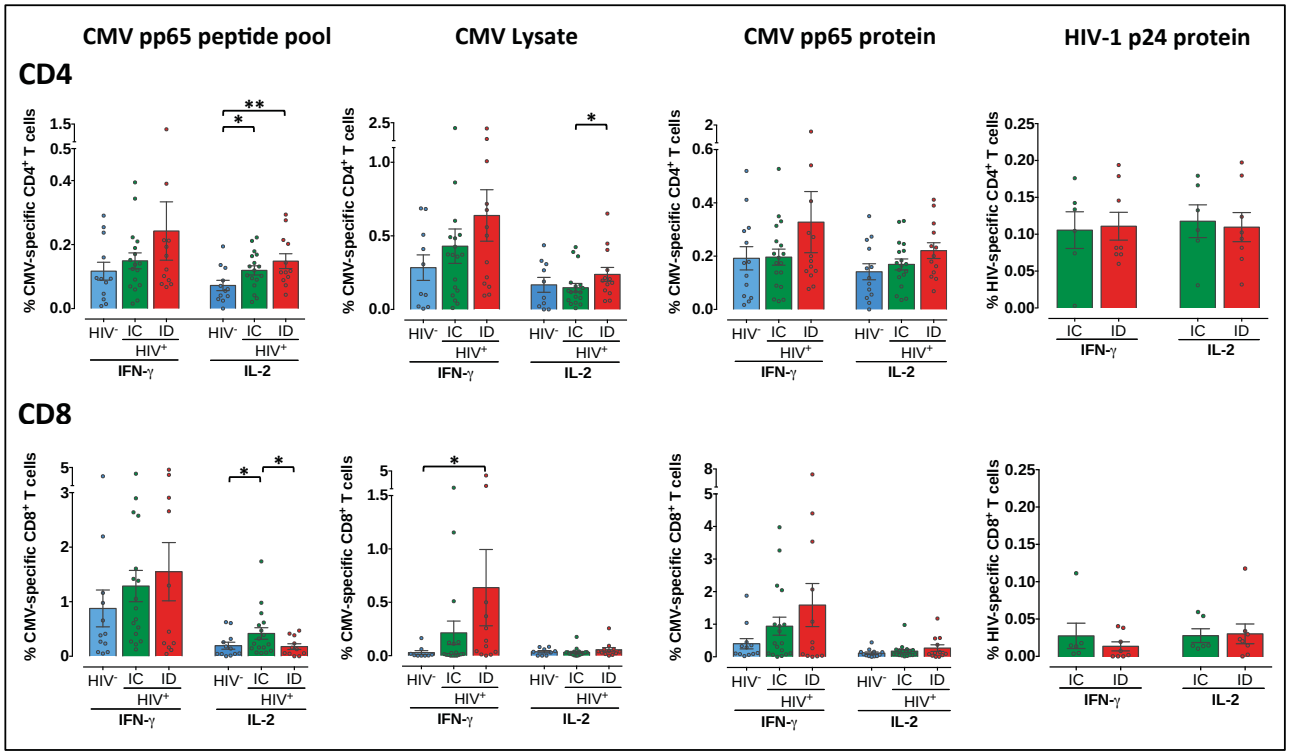

Figure 3. Functional CD4⁺ and CD8⁺ T-cell responses to CMV and HIV antigens. PBMCs were stimulated with different CMV antigenic preparation and the HIV p24 recombinant protein. The specific CD4⁺ and CD8⁺ T-cell responses were measured by flow cytometry in HIV-uninfected individuals (blue bars), immunoconcordant individuals (green bars) and immunodiscordant individuals (red bars). Response magnitudes are reported as the percentages of CD4⁺ and CD8⁺ T cells producing IFN-γ and IL-2 after background subtraction. Bars indicate mean values ±SEM. Individual data of all subjects are represented by dots. Differences were tested using Mann-Whitney U nonparametric test (*p<0.05).

Functional analysis of different memory CD4⁺ and CD8⁺ T-cell subsets

A skewed T-cell maturation has been described in individuals with poor immune recovery [10-13]. In our study, the overall profile of CD4⁺ and CD8⁺ T-cell maturation was significantly different between immunodiscordant and immunoconcordant individuals, with a significant decrease in the percentage of both naïve CD4⁺ and CD8⁺ T cells and an increase in different memory subsets (Figure S2). To determine whether this disturbed maturational profile is also accompanied by changes in functionality, we next evaluated the capacity to produce IFN-γ and IL-2 after CMV or HIV p24 stimulation of different memory CD4⁺ and CD8⁺ T-cell subsets. Remarkably all memory CD4⁺ T-cell subsets of immunodiscordant individuals were functional, able to produce IFN-γ and IL-2 after CMV stimulation. Moreover, increased proportions of IFN-γ⁺ and IL-2⁺ in CD4⁺ T_{CM} (p=0.016 compared to HIV⁻ individuals) and CD4⁺ $T_{EMRA\ early}$ memory CD4⁺ T-cell subsets (p=0.036 and p=0.002 compared to HIV-uninfected and

immunoconcordant individuals respectively) were observed in immunodiscordant individuals. A similar profile was observed for $CD4^+$ T cells with a naive phenotype both in IFN-γ (p=0.034 and p=0.006 compared to HIV-uninfected and immunoconcordant individuals respectively) and IL-2 frequencies (p=0.007 compared to immunoconcordant individuals) (Figure 4). The same differences were found with all the CMV preparations used. No significant changes were observed in the $CD8^+$ T-cell population (data not shown).

Several memory $CD4^+$ T-cell subsets produce IFN-γ and IL-2 after p24 stimulation in both immunoconcordant and immunodiscordant individuals, and again, higher frequency of $CD4^+$ HIV-specific T cells producing IL-2 with a naïve phenotype was observed in immunodiscordant individuals compared with immunoconcordant individuals (Figure 4).

As shown in Figure 1, CMV-seropositivity negatively impacts on the proportion of T naive cells and positively impacts on the frequency of effector memory T cells in HIV-uninfected individuals [44]. Accordingly, in HIV-uninfected individuals we observed a strong negative correlation between the CMV-total response (defined as the mean of the sum of the IFN-γ and IL-2 frequencies from different CMV antigens) and the proportion of $CD4^+$ naïve T cells (Spearman r=-0.9; p<0.0001) and a positive correlation with the proportions of both $CD4^+$ early and late T_{EM} cells (Sperman r=0.87; p<0.0001 and Spearman r=0.78; p=0.002) (Figure 5). In contrast, this clear effect seems to be perturbed in HIV^+ individuals. Indeed, no correlation between the CMV-total response and the proportion of naïve $CD4^+$ T cells in the HIV-infected population was found. The correlation with the proportion of $CD4^+$ $T_{EM\ early}$ cells was also lost in immunoconcordant individuals and was reversed in immunodiscordant individuals showing a significant negative value (Sperman r=-0.61; p=0.03). Analysis of other memory subsets showed a significant positive correlation with the frequency of $CD4^+$ $T_{EM\ late}$ cells (Spearman r=0.61; p=0.02) and a trend with the proportion of $CD4^+$ $T_{EMRA\ late}$ cells (Spearman r=0.55; p=0.05) was observed (Figure 5). No associations were observed between the CMV-response and the composition of the $CD8^+$ T-cell compartment in any of the studied population.

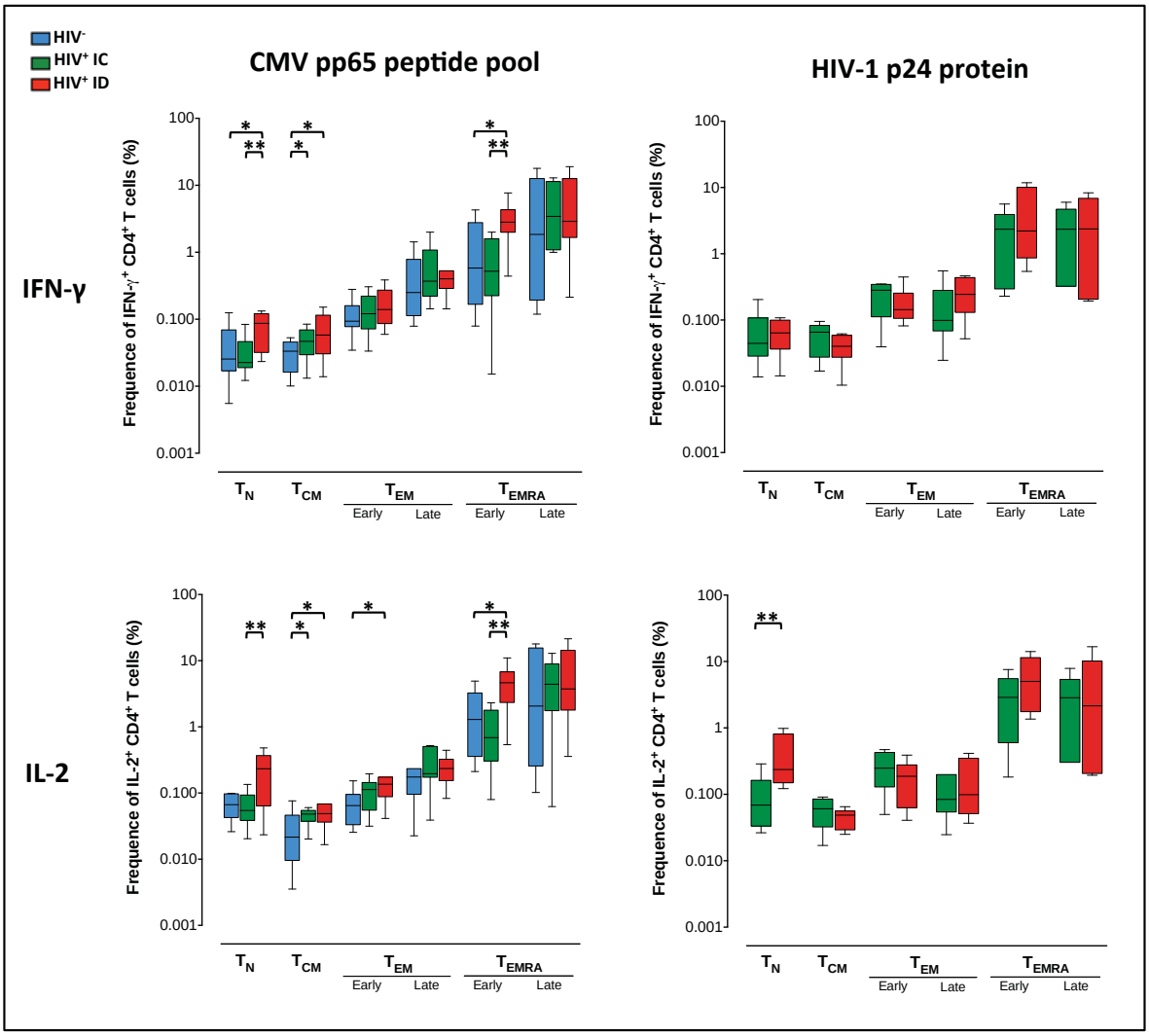

Figure 4. Functionality of CMV and HIV-specific memory CD4+ and CD8+ T-cell subsets. The differential expression of CD45RA, CCR7 and CD27 by CD4+ and CD8+ T cells was analyzed by boolean gating. Based on the expression of these surface markers we were able to discriminate eight different subpopulations expressing each possible combination of markers: naïve (T_N, CD45RA+CCR7+CD27+), central memory (T_{CM}, CD45RA-CCR7+CD27+), early and late effector memory ($T_{EM\ early}$, CD45RA-CCR7-CD27+ and $T_{EM\ late}$, CD45RA-CCR7-CD27-,), and early and late effector memory re-expressing CD45RA T cells ($T_{EMRA\ early}$, CD45RA+CCR7-CD27+ and $T_{EMRA\ late}$, CD45RA+CCR7-CD27-). Other intermediate phenotypes (CD45RA+CCR7+CD27- and CD45RA-CCR7+CD27-), which can not as yet be ascribed to a specific subpopulation or to a functionally unique subset, observed in low percentages are not shown. The frequency of IFN-γ+ and IL-2+ CMV and HIV-specific T cells across distinct subsets are shown. Individual data of all subjects are represented by dots: HIV-uninfected individuals (blue dots), immunoconcordant individuals (green dots) and immunodiscordant individuals (red dots). The mean and tukey ranges are shown for each group. Differences were tested using Mann-Whitney U nonparametric test (*p<0.05, **p<0.01).

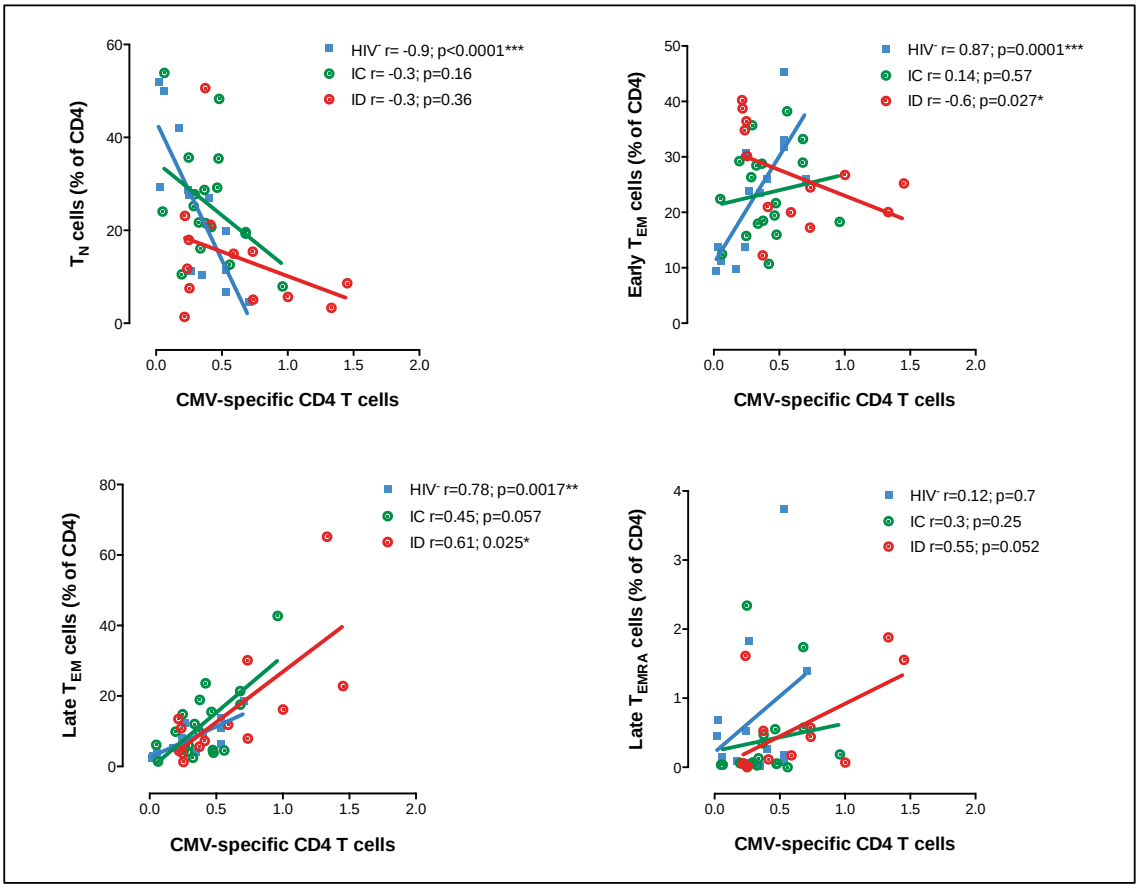

Figure 5. Associations between total CMV-specific CD4⁺ T-cell response and CD4⁺ T-cell subsets. Correlations between total CMV-specific response (Median of total response IFN-γ and IL-2 production of all CMV antigens used) and CD4⁺ T cell subsets are represented. Linear correlation (Spearman) r and p-values are shown.

Characterization of CMV and HIV-specific CD4⁺ and CD8⁺ T-cell differentiation profile

Finally, an analysis of the differentiation profile of CMV-specific CD4⁺ and CD8⁺ T cells and HIV-specific CD4⁺ T cells was performed. No differences between the patterns of response to the pp65 peptide pool and the pp65 protein were observed, therefore only the responses to the pp65 peptide pool, the CMV viral lysate and the HIV-1 p24 recombinant protein are shown (Figure 6 and Figure S3 for IFN-γ and IL-2, respectively). CMV-specific IFN-γ-producing CD4⁺ T cells in HIV-negative individuals showed a similar phenotypic pattern of responses with all the stimuli used, with most of

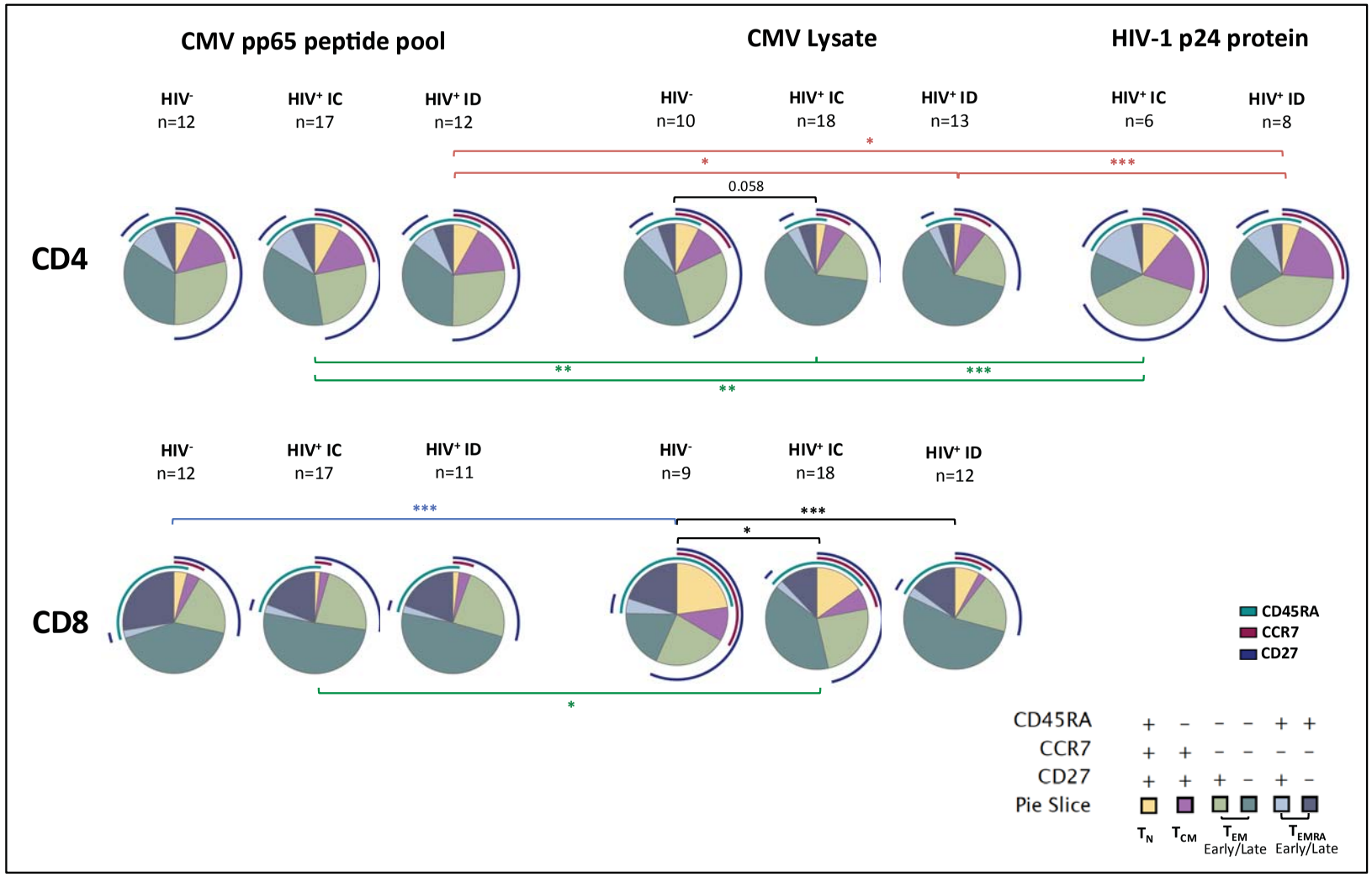

Figure 6. Phenotypic profile of IFN-γ + virus-specific CD4+ and CD8+ T cells. IFN-γ + CMV- and HIV-specific CD4+ and CMV-specific CD8+ T cells were determined after stimulation with different CMV antigens and the HIV p24 recombinant protein. The memory maturation profile of the IFN-γ + specific cells was examined for CD45RA, CCR7 and CD27 expression by using a boolean gated strategy. The distribution of CMV- and HIV-specific IFN-γ + response among different subsets was represented using SPICE software. The phenotypic patterns are color-coded and indicated. Significant differences between antigens are depicted in different colors: blue for HIV- individuals, green for immunoconcordant (IC) and red for immunodiscordant ID). Significant differences between groups (intra-antigen) are also represented (black lines). Statistical testing by permutation performed with SPICE software (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

the cells displaying a T_{EM} phenotype with an equal response of $T_{EM\ early}$ and $T_{EM\ late}$ cells (Figure 6). Conversely, in HIV-infected individuals a different pattern of response was observed with the different CMV antigenic preparations. The viral lysate-specific $CD4^+$ cells, in both immunoconcordant and immunodiscordant HIV^+ individuals, was significantly skewed towards $T_{EM\ late}$ cells compared with the differentiation pattern of pp65 peptide pool-specific IFN-γ^+ cells. Similarly, differences were found in the profile of CMV-specific $CD8^+$ IFN-γ^+ cells (Figure 6) and in $CD4^+$ and $CD8^+$-specific IL-2^+ T cells responding to different CMV stimuli and among groups (Figure S3). However, it is important to note that no significant differences were found between immunodiscordant and immunoconcordant individuals with any of the CMV antigens (Figure 6 and Figure S3). Regarding HIV-specific response, the differentiation profile of both IFN-γ^+ and IL-2^+ HIV-specific $CD4^+$ T cells was significantly different to that of CMV, but no differences were observed between immunoconcordant and immunodiscordant individuals. Therefore, immunodiscordant subjects despite displaying a skewed T-cell maturation profile do not present alterations in the differentiation pattern of either CMV- or p24-specific T cells in comparison with immunoconcordant individuals.

Discussion

This study provides an analysis of T-cell functionality in a group of HIV-infected individuals with different $CD4^+$ T-cell recovery upon virologically suppressive cART. CMV infection, in addition to shape the naïve and memory T-cell repertoire [19, 39-43], appears to be associated with accelerated T-cell immunosenescence and immune exhaustion, both phenotypes associated with reduced T-cell functionality [19-21]. These CMV-induced phenotypic and functional changes were corroborated in our HIV-uninfected population, with higher level of differentiated $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells and differences regarding cytokine production in CMV-seropositive individuals compared with CMV-seronegative individuals. Therefore, CMV-seronegative individuals were excluded to avoid the bias in the analysis of functionality of mixed populations (CMV-seropositive and CMV-seronegative individuals) and should be taken into account in future phenotypic and functional characterizations. Indeed, the phenotypic characterization of immunodiscordant individuals, in accordance with our previous

reports, showed a decrease in the percentages of both naïve $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells and an increased frequencies of in mature T cells in comparison with the immunoconcordant group, although the differences were lower than in our previous studies [7, 13] likely due to the exclusion of the CMV-seronegative individuals in the present study. Differences with the HIV-uninfected group were also found, however we cannot exclude that the difference with this group, mainly the decrease in naïve T cells, could be also associated with the older age of the HIV-infected population.

After the non-specific polyclonal stimulation with PMA/ionomycin, a robust production of IFN-γ, IL-2 and TNF-α was displayed in all individuals. Remarkably, $CD4^+$ and $CD8^+$ T-cell polyfunctionality was not reduced in immunodiscordant individuals compared with immunoconcordant and HIV-negative individuals suggesting that the homeostatic alterations and the increased replicative senescence or exhaustion observed in immunodiscordant individuals per se may not be linked to reduced polyfunctionality. A similar paradox has been reported in healthy older people, who maintain polyfunctionality despite phenotypic alterations, as compared to younger people [45, 46]. Quantitatively, immunodiscordant individuals showed a significant enrichment in IFN-γ-producing $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells and a decrease in monofunctional IL-2-producing T cells as compared with immunoconcordant and HIV-negative individuals. A potential cause could be the disturbed maturational profile displayed by the immunodiscordant individuals; the enrichment in highly-differentiated cells and the low proportions of naïve T cells as IFN-γ is primarily produced by differentiated memory cells and IL-2 by naïve and central memory T cells [47]. Potential consequences of the alteration in IFN-γ production could be associated with its polyfunctional effects on immune activation and pro-inflammatory responses by sustaining the chronic immune activation and the apoptosis sensitivity associated with HIV infection (reviewed in [48]). On the other hand, IL-2 is a central regulator of T-cell proliferation, activation and differentiation [49, 50], thus, slight differences in IL-2 production, also reported by others [12, 51] might be contributing to the poor immune recovery and skewed T-cell maturation observed in immunodiscordant subjects.

CMV-specific T-cell responses are higher in HIV-infected individuals than in HIV-uninfected individuals, particularly those receiving antiretroviral therapy [23, 52]. In our

study, HIV-infected subjects showed a tendency towards higher proportions of CMV-specific IFN-γ and IL-2 secreting $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells than HIV-uninfected individuals. In addition, we also found changes in the differentiation profile of CMV-specific T cells between HIV-infected and -uninfected individuals stimulated with viral lysate. All these data suggest that HIV-infected individuals could have a different pattern of CMV protein expression, maybe relate to recurrent episodes of subclinical viral reactivation and which could result in higher CMV-specific responses and a change of $CD4^+$ T-cell immunodominance. No differences were observed after stimulation with pp65 (peptide pool or protein) in concordance with previous reports showing that the CMV antigen used has a marked influence on the functional phenotype of specific T cell [52-54]. In the HIV-infected population, the highest CMV-specific T-cell responses were found in immunodiscordant individuals in line with previous work reporting that strong anti-CMV responses are associated with lower $CD4^+$ T-cell counts [24]. Moreover, in immunodiscordant individuals the increase in the size of the T-cell response to CMV was associated with an increased proportion of several $CD4^+$ T-cell memory subsets responding to CMV having also an impact in the entire memory $CD4^+$ T-cell subset distribution. Consistent with a previous report [44] a correlation between the degree of T-cell differentiation and the size of the CMV-response was observed in HIV-uninfected individuals. However, in contrast with immunoconcordant individuals in whom CMV infection does not seem to have an important role in the $CD4^+$ T-cell distribution, in immunodiscordant individuals CMV infection could be involved in the observed skewed T-cell maturation.

The heightened T-cell response against CMV observed in immunodiscordant individuals is not necessarily beneficial. In our study, an association between CMV-specific T-cell response and anti-CMV IgG antibodies was observed with higher level of anti-CMV IgG antibodies in immunodiscordant individuals (data not shown. Manuscript submitted). It has been demonstrated that circulating anti-CMV IgG antibodies and CMV-specific T-cell responses are associated with cardiovascular diseases and physical function impairment [23, 25, 26, 55], suggesting that in HIV^+ individuals with poor $CD4^+$ T-cell recovery the high CMV-specific response, probably due to episodes of CMV reactivation, may have an impact in the higher mortality and morbidity

observed in those individuals.

As expected, when compared to CMV, low HIV-1-specific CD4$^+$ T cells were detected in most HIV-infected ART-treated individuals [56-58], with a distinct differentiation profile [59-61]. It has been previously shown that individuals with poor CD4$^+$ recovery have reduced Gag-specific IFN-γ ELISPOT response [11] and poor CD8$^+$ lymphoproliferative responses to Gag [51]. Using a p24 protein, we did not find any difference in the IFN-γ$^+$ HIV-specific immune response between immunoconcordant and immunodiscordant individuals. Surprisingly we found increased frequencies of IL-2$^+$ HIV-specific CD4$^+$ T cells with a naive phenotype in immunodiscordant individuals. It has been reported that higher frequencies of HIV Gag-specific IFN-γ$^+$IL-2$^+$ CD4$^+$ T cells are strongly associated with higher cell-associated HIV DNA levels in HIV controllers [62]. In cART-treated HIV-positive individuals a trend for association between HIV-specific CD4$^+$ T cells expressing IL-2 and the total HIV DNA in resting CD4$^+$ T cells has also been described [63]. Therefore, the higher levels of proviral DNA that have been found in immunodiscordant individuals [64] could be associated with a higher percentage of IL-2$^+$ HIV-specific CD4$^+$ T cells, which are more likely to be infected with HIV [57]. The use of a protein instead of a pool of peptides only allowed us to evaluate the HIV-specific CD4$^+$ T-cell responses, so we can not rule out that there are also differences in the IFN-γ production by CD8$^+$ T cells between immunodiscordant and immunoconcordant individuals.

One limitation of this study is the low number of individuals analyzed, especially for the study of HIV-specific responses. In addition, polyfunctionality (measured by the expression of IFN-γ, IL-2 and TNF-α) was only determined following the non-specific stimulation. A polyfunctional profile, including cytolytic markers as perforin and granzyme B and the degranulation marker (CD107), have not been analyzed and it has been demonstrated that the highly polyfunctional antigen-specific cells are the most potent effectors and that could be correlated with clinical outcome [65-67].

Taken together, our results indicate that HIV-infected ART-suppressed individuals with poor immune recovery displayed a maintained global T cell polyfunctionality despite having severe homeostatic alterations and increased levels of replicative senescence and exhaustion. Furthermore, in immunodiscordant individuals, asymptomatic CMV

infection, that has been previously described as a major contributor to the increased immune activation and senescence resulted in a heightened CMV-specific immune response that may be contributing to the skewed T-cell maturation and the higher risk of clinical progression observed in those individuals. Monitoring CMV-specific responses in immunodiscordant individuals could help to identify individuals at clinical risk, as suggested also for elder HIV seronegative individuals.

Acknowledgments

We are grateful to Anuska Llano for her help with the evaluation of specific response to technical staff of IrsiCaixa for sample processing and the clinical staff of Fundació Lluita contra la SIDA. We thank the IGTP Cytometry Core Facility and Marco Antonio Fernández for his contribution to this publication. The authors would like to thank all the individuals who were participants in the study. IrsiCaixa and IGTP are part of the CERCA Program/Generalitat de Catalunya.

References

1. Palella FJ, Delaney KM, Moorman AC, Loveless MO, Fuhrer J, Satten GA, Aschman DJ, Holmberg SD. 1998. Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators. N Engl J Med 338:853–860.
2. Piketty C, Castiel P, Belec L, Batisse D, Si Mohamed A, Gilquin J, Gonzalez-Canali G, Jayle D, Karmochkine M, Weiss L, Aboulker JP, Kazatchkine MD. 1998. Discrepant responses to triple combination antiretroviral therapy in advanced HIV disease. AIDS 12:745–750.
3. Kelley CF, Kitchen CMR, Hunt PW, Rodriguez B, Hecht FM, Kitahata M, Crane HM, Willig J, Mugavero M, Saag M, Martin JN, Deeks SG. 2009. Incomplete peripheral CD4+ cell count restoration in HIV-infected patients receiving long-term antiretroviral treatment. CLIN INFECT DIS 48:787–794.
4. Massanella M, Negredo E, Clotet B, Blanco J. 2013. Immunodiscordant responses to HAART--mechanisms and consequences. Expert Rev Clin Immunol 9:1135–1149.
5. Massanella M, Negredo E, Pérez-Alvárez N, Puig J, Ruiz-Hernández R, Bofill M, Clotet B, Blanco J. 2010. CD4 T-cell hyperactivation and susceptibility to cell death determine poor CD4 T-cell recovery during suppressive HAART. AIDS 24:959–968.
6. Molina-Pinelo S, Vallejo A, Díaz L, Soriano-Sarabia N, Ferrando-Martínez S, Resino S, Muñoz-Fernández MA, Leal M. 2009. Premature immunosenescence in HIV-infected patients on highly active antiretroviral therapy with low-level CD4 T cell repopulation. J Antimicrob Chemother 64:579–588.
7. Negredo E, Massanella M, Puig J, Pérez-Alvárez N, Gallego Escuredo JM, Villarroya J, Villarroya F, Moltó J, Santos JR, Clotet B, Blanco J. 2010. Nadir CD4 T Cell Count as Predictor and High CD4 T Cell Intrinsic Apoptosis as Final Mechanism of Poor CD4 T Cell Recovery in Virologically Suppressed HIV-Infected Patients: Clinical Implications. CLIN INFECT DIS 50:1300–1308.
8. Viard JP, Mocroft A, Chiesi A, Kirk O, Røge B, Panos G, Vetter N, Bruun JN, Johnson M, Lundgren JD, EuroSIDA Study Group. 2001. Influence of age on CD4 cell recovery in human immunodeficiency virus-infected patients receiving highly active antiretroviral therapy: evidence from the EuroSIDA study. J Infect Dis 183:1290–1294.
9. Marchetti G, Gori A, Casabianca A, Magnani M, Franzetti F, Clerici M, Perno CF, Monforte AD, Galli M, Meroni L. 2006. Comparative analysis of T-cell turnover and homeostatic parameters in HIV-infected patients with discordant immune-virological responses to HAART. AIDS 20:1727–1736.
10. Lederman MM, Calabrese L, Funderburg NT, Clagett B, Medvik K, Bonilla H, Gripshover B, Salata RA, Taege A, Lisgaris M, McComsey GA, Kirchner E, Baum J, Shive C, Asaad R, Kalayjian RC, Sieg SF, Rodriguez B. 2011. Immunologic Failure Despite Suppressive Antiretroviral Therapy Is Related to Activation and Turnover of Memory CD4 Cells. J Infect Dis 204:1217–1226.
11. Marchetti G, Gazzola L, Trabattoni D, Bai F, Ancona G, Ferraris L, Meroni L, Galli M, Clerici M, Gori A, d'Arminio Monforte A. 2010. Skewed T-cell maturation and function in HIV-infected patients failing CD4+ recovery upon long-term virologically suppressive HAART. AIDS 24:1455–1460.
12. Erikstrup C, Kronborg G, Lohse N, Ostrowski SR, Gerstoft J, Ullum H. 2010. T-cell dysfunction in HIV-1-infected patients with impaired recovery of CD4 cells despite suppression of viral replication. J Acquir Immune Defic Syndr 53:303–310.
13. Massanella M, Gomez-Mora E, Carrillo J, Curriu M, Ouchi D, Puig J, Negredo E, Cabrera C, Clotet B, Blanco J. 2015. Increased ex vivo cell death of central memory CD4 T cells in treated HIV infected individuals with unsatisfactory immune recovery. J Transl Med 13:230.
14. Méndez-Lagares G, García-Pergañeda A, del Mar del ozo-Balado M, Genebat M, Ruiz-Mateos E, García García M, Muñoz-Fernández MA, Pacheco YM, Leal M. 2012. Differential alterations of the CD4 and CD8 T cell subsets in HIV-infected patients on highly active antiretroviral therapy with low CD4 T cell restoration. J Antimicrob Chemother 67:1228–1237.
15. Nakanjako D, Ssewanyana I, Mayanja-Kizza H, Kiragga A, Colebunders R, Manabe YC, Nabatanzi R, Kamya MR, Cao H. 2011. High T-cell immune activation and immune exhaustion among individuals with suboptimal CD4 recovery after 4 years of antiretroviral therapy in an African cohort. BMC Infect Dis 11:43.
16. Robain M, Carré N, Dussaix E, Salmon-Ceron D, Meyer L. 1998. Incidence and sexual risk factors of cytomegalovirus seroconversion in HIV-infected subjects. The SEROCO Study Group. Sex Transm Dis 25:476–480.

17. Jackson JB, Erice A, Englund JA, Edson JR, Balfour HH. 1988. Prevalence of cytomegalovirus antibody in hemophiliacs and homosexuals infected with human immunodeficiency virus type 1. Transfusion 28:187–189.
18. Webster A, Lee CA, Cook DG, Grundy JE, Emery VC, Kernoff PB, Griffiths PD. 1989. Cytomegalovirus infection and progression towards AIDS in haemophiliacs with human immunodeficiency virus infection. Lancet 2:63–66.
19. Derhovanessian E, Theeten H, Hähnel K, Van Damme P, Cools N, Pawelec G. 2013. Cytomegalovirus-associated accumulation of late-differentiated CD4 T-cells correlates with poor humoral response to influenza vaccination. Vaccine 31:685–690.
20. Weltevrede M, Eilers R, de Melker HE, van Baarle D. 2016. Cytomegalovirus persistence and T-cell immunosenescence in people aged fifty and older: A systematic review. Exp Gerontol 77:87–95.
21. Huygens A, Lecomte S, Tackoen M, Olislagers V, Delmarcelle Y, Burny W, Van Rysselberge M, Liesnard C, Larsen M, Appay V, Donner C, Marchant A. 2015. Functional Exhaustion Limits CD4+ and CD8+ T-Cell Responses to Congenital Cytomegalovirus Infection. J Infect Dis 212:484–494.
22. Hunt PW, Martin JN, Sinclair E, Epling L, Teague J, Jacobson MA, Tracy RP, Corey L, Deeks SG. 2011. Valganciclovir reduces T cell activation in HIV-infected individuals with incomplete CD4+ T cell recovery on antiretroviral therapy. J Infect Dis 203:1474–1483.
23. Naeger DM, Martin JN, Sinclair E, Hunt PW, Bangsberg DR, Hecht F, Hsue P, McCune JM, Deeks SG. 2010. Cytomegalovirus-specific T cells persist at very high levels during long-term antiretroviral treatment of HIV disease. PLoS ONE 5:e8886.
24. Appay V, Fastenackels S, Katlama C, Ait-Mohand H, Schneider L, Guihot A, Keller M, Grubeck-Loebenstein B, Simon A, Lambotte O, Hunt PW, Deeks SG, Costagliola D, Autran B, Sauce D. 2011. Old age and anti-cytomegalovirus immunity are associated with altered T-cell reconstitution in HIV-1-infected patients. AIDS 25:1813–1822.
25. Hsue PY, Hunt PW, Sinclair E, Bredt B, Franklin A, Killian M, Hoh R, Martin JN, McCune JM, Waters DD, Deeks SG. 2006. Increased carotid intima-media thickness in HIV patients is associated with increased cytomegalovirus-specific T-cell responses. AIDS 20:2275–2283.
26. Parrinello CM, Sinclair E, Landay AL, Lurain N, Sharrett AR, Gange SJ, Xue X, Hunt PW, Deeks SG, Hodis HN, Kaplan RC. 2012. Cytomegalovirus immunoglobulin G antibody is associated with subclinical carotid artery disease among HIV-infected women. J Infect Dis 205:1788–1796.
27. Dunn HS, Haney DJ, Ghanekar SA, Stepick-Biek P, Lewis DB, Maecker HT. 2002. Dynamics of CD4 and CD8 T cell responses to cytomegalovirus in healthy human donors. J Infect Dis 186:15–22.
28. Sylwester AW, Mitchell BL, Edgar JB, Taormina C, Pelte C, Ruchti F, Sleath PR, Grabstein KH, Hosken NA, Kern F, Nelson JA, Picker LJ. 2005. Broadly targeted human cytomegalovirus-specific CD4+ and CD8+ T cells dominate the memory compartments of exposed subjects. J Exp Med 202:673–685.
29. Weinberg A, Spritzler J, Nokta M, Schrier R, Landay A, Brown D, Pollard R, ACTG CMV Task Force. 2008. In vitro cell-mediated immune responses of human immunodeficiency virus-infected and -uninfected individuals to whole cytomegalovirus antigens and their subunits. Clin Vaccine Immunol 15:1398–1409.
30. Sinclair E, Black D, Epling CL, Carvidi A, Josefowicz SZ, Bredt BM, Jacobson MA. 2004. CMV antigen-specific CD4+ and CD8+ T cell IFNgamma expression and proliferation responses in healthy CMV-seropositive individuals. Viral Immunol 17:445–454.
31. Kern F, Bunde T, Faulhaber N, Kiecker F, Khatamzas E, Rudawski I-M, Pruss A, Gratama J-W, Volkmer-Engert R, Ewert R, Reinke P, Volk H-D, Picker LJ. 2002. Cytomegalovirus (CMV) phosphoprotein 65 makes a large contribution to shaping the T cell repertoire in CMV-exposed individuals. J Infect Dis 185:1709–1716.
32. Kern F, Faulhaber N, Frömmel C, Khatamzas E, Prösch S, Schönemann C, Kretzschmar I, Volkmer-Engert R, Volk HD, Reinke P. 2000. Analysis of CD8 T cell reactivity to cytomegalovirus using protein-spanning pools of overlapping pentadecapeptides. Eur J Immunol 30:1676–1682.
33. Maecker HT, Dunn HS, Suni MA, Khatamzas E, Pitcher CJ, Bunde T, Persaud N, Trigona W, Fu TM, Sinclair E, Bredt BM, McCune JM, Maino VC, Kern F, Picker LJ. 2001. Use of overlapping peptide mixtures as antigens for cytokine flow cytometry. Journal of Immunological Methods 255:27–40.
34. Baran J, Kowalczyk D, Ozóg M, Zembala M. 2001. Three-color flow cytometry detection of intracellular cytokines in peripheral blood mononuclear cells: comparative analysis of phorbol myristate acetate-ionomycin and phytohemagglutinin stimulation. Clin Diagn Lab Immunol 8:303–313.
35. Petersen CM, Christensen EI, Andresen BS, Møller BK. 1992. Internalization, lysosomal degradation and new synthesis of surface membrane CD4 in phorbol ester-activated T-lymphocytes and U-937 cells. Exp Cell Res 201:160–173.

36. Roederer M, Nozzi JL, Nason MC. 2011. SPICE: Exploration and analysis of post-cytometric complex multivariate datasets. Cytometry 79A:167–174.
37. Larsen M, Sauce D, Arnaud L, Fastenackels S, Appay V, Gorochov G. 2012. Evaluating cellular polyfunctionality with a novel polyfunctionality index. PLoS ONE 7:e42403.
38. http://www.funkycells.com/main.
39. Chidrawar S, Khan N, Wei W, McLarnon A, Smith N, Nayak L, Moss P. 2009. Cytomegalovirus-seropositivity has a profound influence on the magnitude of major lymphoid subsets within healthy individuals. Clin Exp Immunol 155:423–432.
40. Derhovanessian E, Maier AB, Hähnel K, Beck R, de Craen AJM, Slagboom EP, Westendorp RGJ, Pawelec G. 2011. Infection with cytomegalovirus but not herpes simplex virus induces the accumulation of late-differentiated CD4+ and CD8+ T-cells in humans. J Gen Virol 92:2746–2756.
41. Looney RJ, Falsey A, Campbell D, Torres A, Kolassa J, Brower C, McCann R, Menegus M, McCormick K, Frampton M, Hall W, Abraham GN. 1999. Role of cytomegalovirus in the T cell changes seen in elderly individuals. Clin Immunol 90:213–219.
42. Almanzar G, Schwaiger S, Jenewein B, Keller M, Herndler-Brandstetter D, Würzner R, Schönitzer D, Grubeck-Loebenstein B. 2005. Long-term cytomegalovirus infection leads to significant changes in the composition of the CD8+ T-cell repertoire, which may be the basis for an imbalance in the cytokine production profile in elderly persons. Journal of Virology 79:3675–3683.
43. Moro-García MA, Alonso-Arias R, López-Vázquez A, Suárez-García FM, Solano-Jaurrieta JJ, Baltar J, López-Larrea C. 2012. Relationship between functional ability in older people, immune system status, and intensity of response to CMV. Age (Dordr) 34:479–495.
44. Lachmann R, Bajwa M, Vita S, Smith H, Cheek E, Akbar A, Kern F. 2012. Polyfunctional T cells accumulate in large human cytomegalovirus-specific T cell responses. Journal of Virology 86:1001–1009.
45. Bajwa M, Vita S, Vescovini R, Larsen M, Sansoni P, Terrazzini N, Caserta S, Thomas D, Davies KA, Smith H, Kern F. 2016. Functional Diversity of Cytomegalovirus-Specific T Cells Is Maintained in Older People and Significantly Associated With Protein Specificity and Response Size. J Infect Dis 214:1430–1437.
46. Lelic A, Verschoor CP, Ventresca M, Parsons R, Evelegh C, Bowdish D, Betts MR, Loeb MB, Bramson JL. 2012. The polyfunctionality of human memory CD8+ T cells elicited by acute and chronic virus infections is not influenced by age. PLoS Pathog 8:e1003076.
47. Sallusto F, Lenig D, Förster R, Lipp M, Lanzavecchia A. 1999. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. Nature 401:708–712.
48. Roff SR, Noon-Song EN, Yamamoto JK. 2014. The Significance of Interferon-γ in HIV-1 Pathogenesis, Therapy, and Prophylaxis. Front Immunol 4:498.
49. Leone A, Picker LJ, Sodora DL. 2009. IL-2, IL-7 and IL-15 as immuno-modulators during SIV/HIV vaccination and treatment. Curr HIV Res 7:83–90.
50. Williams MA, Tyznik AJ, Bevan MJ. 2006. Interleukin-2 signals during priming are required for secondary expansion of CD8+ memory T cells. Nature 441:890–893.
51. Sachdeva N, Weinstein JE, Ashman M, Sachdeva M, Brewer TH, Gracia D, Asthana D. 2010. Poor lymphoproliferative responses with low proportion of Gag-specific CD8 TEMRA cells in HIV-1-infected patients showing immunological and virological discordance despite prolonged suppression of plasma viremia. Viral Immunol 23:49–61.
52. Stone SF, Price P, French MA. 2006. Cytomegalovirus (CMV)-specific CD8+ T cells in individuals with HIV infection: correlation with protection from CMV disease. J Antimicrob Chemother 57:585–588.
53. Pachnio A, Ciaurriz M, Begum J, Lal N, Zuo J, Beggs A, Moss P. 2016. Cytomegalovirus Infection Leads to Development of High Frequencies of Cytotoxic Virus-Specific CD4+ T Cells Targeted to Vascular Endothelium. PLoS Pathog 12:e1005832.
54. Pachnio A, Zuo J, Ryan GB, Begum J, Moss PAH. 2015. The Cellular Localization of Human Cytomegalovirus Glycoprotein Expression Greatly Influences the Frequency and Functional Phenotype of Specific CD4+ T Cell Responses. J Immunol 195:3803–3815.
55. Erlandson KM, Allshouse AA, Rapaport E, Palmer BE, Wilson CC, Weinberg A, Mawhinney S, Campbell TB. 2015. Physical function impairment of older, HIV-infected adults is associated with cytomegalovirus immunoglobulin response. AIDS Research and Human Retroviruses 31:905–912.
56. Brenchley JM, Ruff LE, Casazza JP, Koup RA, Price DA, Douek DC. 2006. Preferential infection shortens the life span of human immunodeficiency virus-specific CD4+ T cells in vivo. Journal of Virology 80:6801–6809.

57. Douek DC, Brenchley JM, Betts MR, Ambrozak DR, Hill BJ, Okamoto Y, Casazza JP, Kuruppu J, Kunstman K, Wolinsky S, Grossman Z, Dybul M, Oxenius A, Price DA, Connors M, Koup RA. 2002. HIV preferentially infects HIV-specific CD4+ T cells. Nature 417:95–98.
58. Pitcher CJ, Quittner C, Peterson DM, Connors M, Koup RA, Maino VC, Picker LJ. 1999. HIV-1-specific CD4+ T cells are detectable in most individuals with active HIV-1 infection, but decline with prolonged viral suppression. Nat Med 5:518–525.
59. Champagne P, Ogg GS, King AS, Knabenhans C, Ellefsen K, Nobile M, Appay V, Rizzardi GP, Fleury S, Lipp M, Förster R, Rowland-Jones S, Sékaly RP, McMichael AJ, Pantaleo G. 2001. Skewed maturation of memory HIV-specific CD8 T lymphocytes. Nature 410:106–111.
60. Appay V, Dunbar PR, Callan M, Klenerman P, Gillespie GMA, Papagno L, Ogg GS, King A, Lechner F, Spina CA, Little S, Havlir DV, Richman DD, Gruener N, Pape G, Waters A, Easterbrook P, Salio M, Cerundolo V, McMichael AJ, Rowland-Jones SL. 2002. Memory CD8+ T cells vary in differentiation phenotype in different persistent virus infections. Nat Med 8:379–385.
61. Harari A, Vallelian F, Meylan PR, Pantaleo G. 2005. Functional heterogeneity of memory CD4 T cell responses in different conditions of antigen exposure and persistence. J Immunol 174:1037–1045.
62. Hunt PW, Hatano H, Sinclair E, Lee T-H, Busch MP, Martin JN, McCune JM, Deeks SG. 2011. HIV-specific CD4+ T cells may contribute to viral persistence in HIV controllers. CLIN INFECT DIS 52:681–687.
63. Cockerham LR, Siliciano JD, Sinclair E, O'Doherty U, Palmer S, Yukl SA, Strain MC, Chomont N, Hecht FM, Siliciano RF, Richman DD, Deeks SG. 2014. CD4+ and CD8+ T cell activation are associated with HIV DNA in resting CD4+ T cells. PLoS ONE 9:e110731.
64. Chomont N, El-Far M, Ancuta P, Trautmann L, Procopio FA, Yassine-Diab B, Boucher G, Boulassel M-R, Ghattas G, Brenchley JM, Schacker TW, Hill BJ, Douek DC, Routy J-P, Haddad EK, Sékaly R-P. 2009. HIV reservoir size and persistence are driven by T cell survival and homeostatic proliferation. Nat Med 15:893–900.
65. Riou C, Burgers WA, Mlisana K, Koup RA, Roederer M, Abdool Karim SS, Williamson C, Gray CM. 2014. Differential impact of magnitude, polyfunctional capacity, and specificity of HIV-specific CD8+ T cell responses on HIV set point. Journal of Virology 88:1819–1824.
66. Almeida JR, Price DA, Papagno L, Arkoub ZA, Sauce D, Bornstein E, Asher TE, Samri A, Schnuriger A, Theodorou I, Costagliola D, Rouzioux C, Agut H, Marcelin A-G, Douek D, Autran B, Appay V. 2007. Superior control of HIV-1 replication by CD8+ T cells is reflected by their avidity, polyfunctionality, and clonal turnover. J Exp Med 204:2473–2485.
67. Duvall MG, Precopio ML, Ambrozak DA, Jaye A, McMichael AJ, Whittle HC, Roederer M, Rowland-Jones SL, Koup RA. 2008. Polyfunctional T cell responses are a hallmark of HIV-2 infection. Eur J Immunol 38:350–363.

Supplementary data

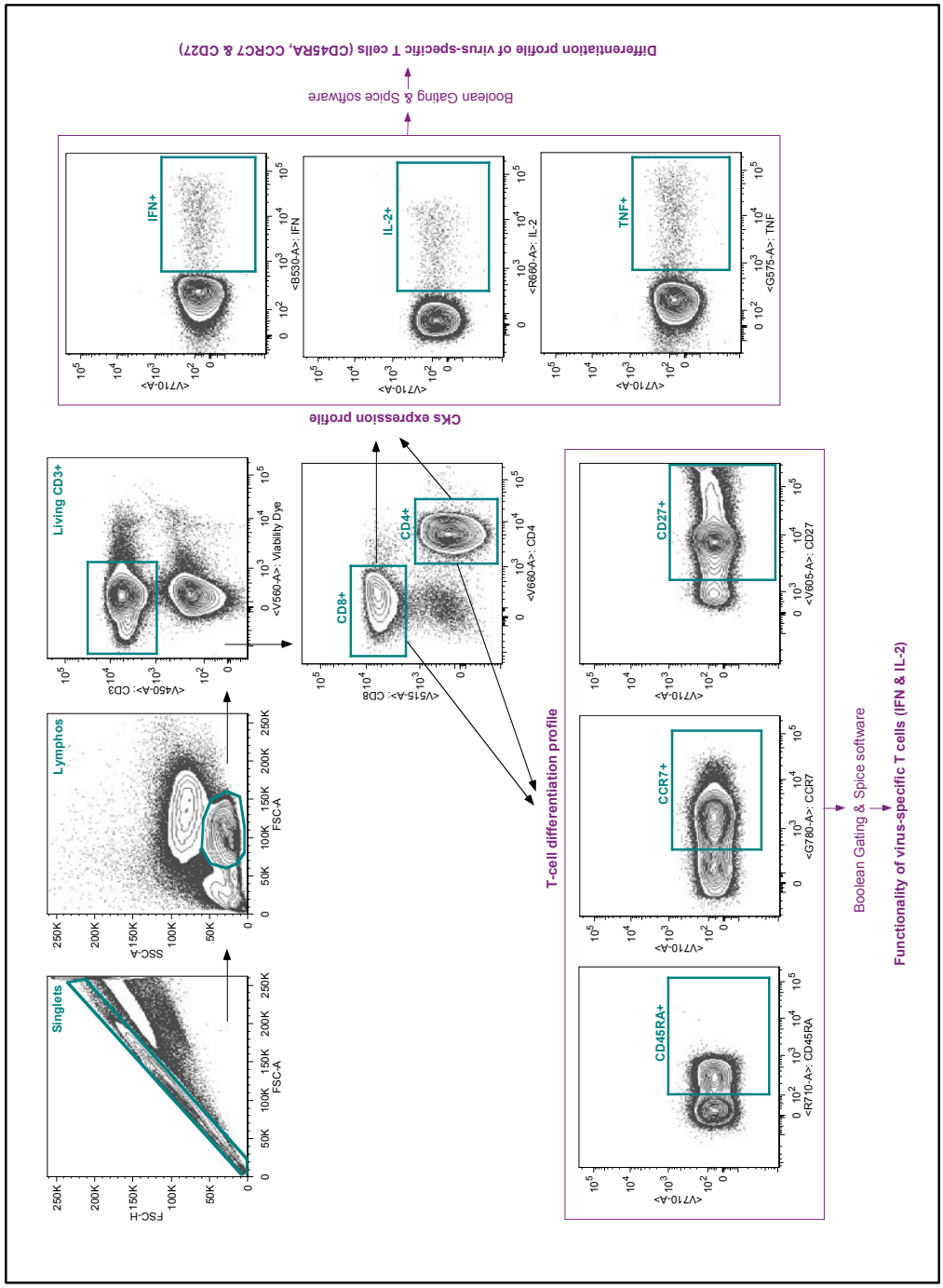

Figure S1. Gating strategy for immune phenotyping and cytokines expression. First, living T lymphocytes were gated according morphological parameters and cell viability. Combinations of CD45RA, CCR7, and CD27 expression were created by boolean gating to determine the distinct CD4⁺ and CD8⁺ T cell subsets (1). Functionality of different CD4⁺ and CD8⁺ T cells subsets was analyzed determining the proportion of IFN-γ ⁺ and IL-2⁺ CMV- and HIV- specific within distinct CD4⁺ and CD8⁺ T cell subsets (2). Expression of IFN-γ, IL-2 and TNF-α and their combinations were also analyzed by boolean gating to determine the specific response within CD4⁺ and CD8⁺ T cells (3). The distribution profile of IFN-γ ⁺ and IL-2⁺ CMV- and HIV- specific CD4⁺ and CD8⁺ T cells was measured using Boolean gating (4). Analysis was carried out using FlowJo and SPICE software (9.2.3v).

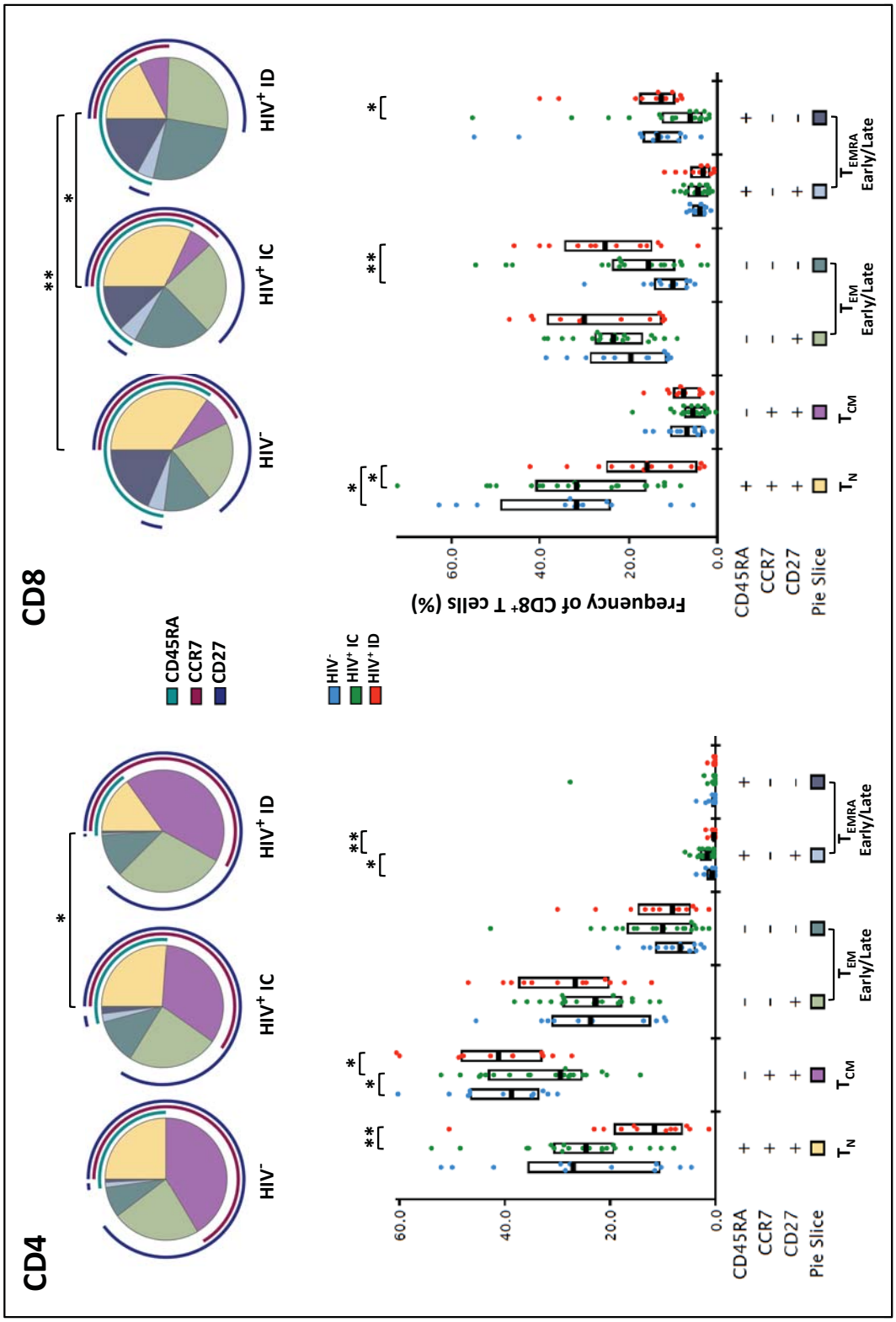

Figure S2. T-cell differentiation profile in HIV-negative, immunoconcordant and immunodiscordant individuals. The differential expression of CD45RA, CCR7 and CD27 by $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells was analysed by boolean gating. Pie charts illustrate relative proportions of each of the combinations of markers in HIV-negative, HIV^+ immunoconcordant (IC) and HIV^+ immunodiscordant (ID) individuals (statistical testing by permutation was performed with SPICE software). Each phenotype (defined by a specific combination of markers) is shown beneath the X-axis (T_N: naïve cells, T_{CM}: central memory, $T_{EM\ early/late}$: effector memory and $T_{EMRA\ early/late}$: effector memory RA cells. Median and IQR are represented. Differences were tested using Mann-Whitney test (*$p<0.05$, **$p<0.01$).

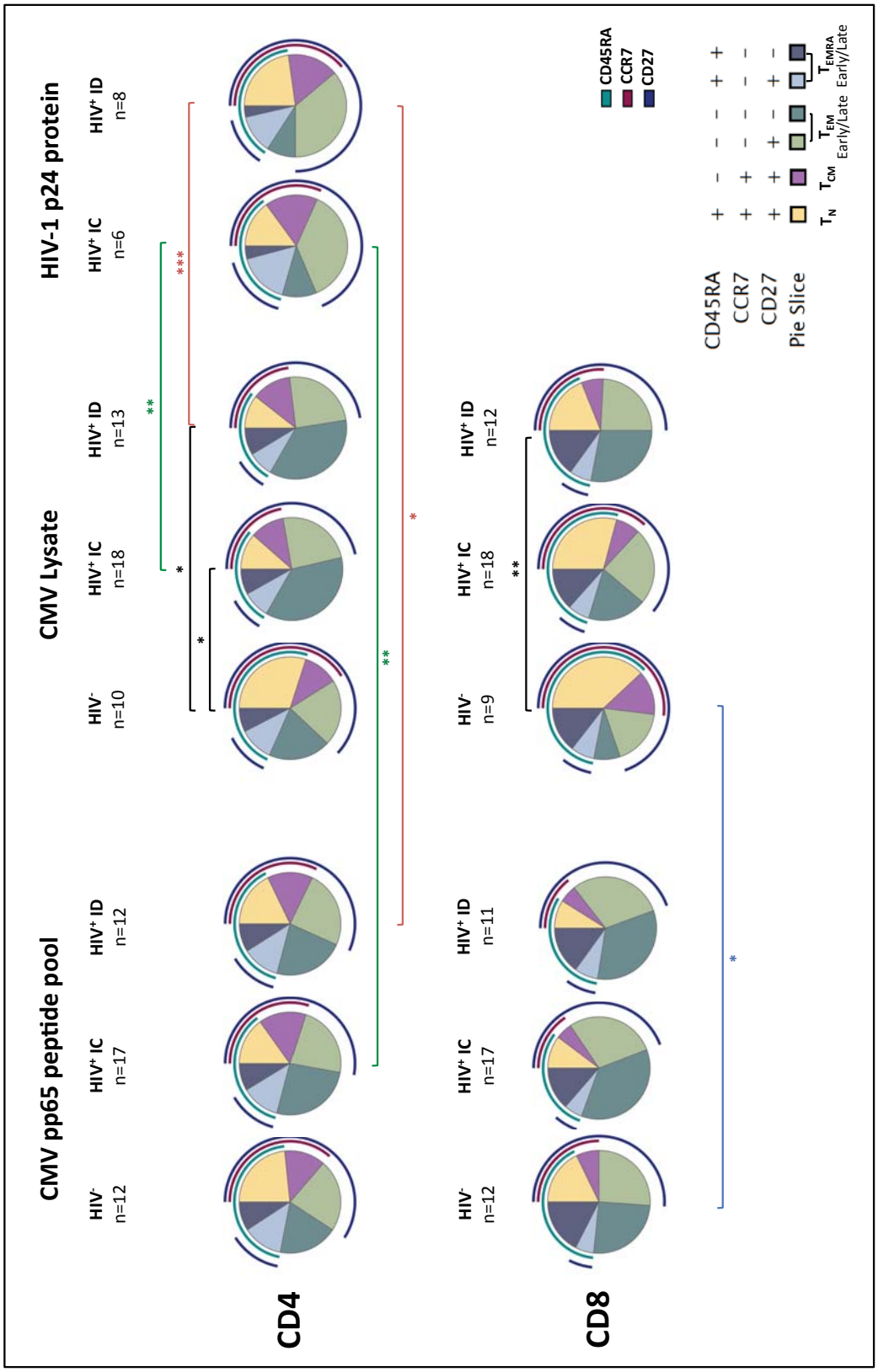

Figure S3. Differentiation profile of IL-2⁺ virus-specific CD4⁺ and CD8⁺ T cells. IL2⁺ CMV and HIV-specific CD4⁺ and CMV-specific CD8⁺ T cells were determined after stimulation with all CMV-derided stimuli and the HIV-p24 protein. The phenotypic profile of the responding T cells was assessed by boolean gating. The phenotypic patterns are color-coded and indicated. Significant differences between antigens are depicted in different colors: blue for HIV⁻ individuals, green for immunoconcordant (IC) and red for immunodiscordant ID). Significant differences between groups (intra-antigen) are also represented (black lines). Statistical testing by permutation was performed with SPICE software.

CAPÍTOL II

Estudi de la resposta humoral contra CMV en individus VIH+ en TARGA i suprimits virològicament

Elevated Humoral Response to Cytomegalovirus in HIV-infected Individuals with Poor CD4+ Immune Recovery

Elisabet Gómez-Mora[1], Marta Massanella[1,2], Elisabet García[1], David Giles[3], Marta Bernadó[3], Victor Urrea[1], Dan Ouchi[1], Jordi Puig[4], Eugenia Negredo[4,5], Bonaventura Clotet[1,4, 5], Julià Blanco[1,5] and Cecilia Cabrera[1*]

[1]Institut de Recerca de la Sida IrsiCaixa-HIVACAT, Institut d'Investigació en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol, Universitat Autònoma de Barcelona, 08916 Badalona, Spain
[2]Université de Montréal, Faculté de Médecine, Department of Microbiology, Infectiology and Immunology, Centre de Recherche du CHUM, Montréal, QC, Canada.
[3]Biokit, Lliçà d'Amunt, Barcelona, Spain
[4]Fundació Lluita contra la SIDA, Institut d'Investigació en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol, 08916 Badalona, Spain
[5]Universitat de Vic-Central de Catalunya, UVIC-UCC, 08500 Vic, Spain

Submitted for publication: PlosOne, May 2017.

Abstract

Some HIV-infected c-ART-suppressed individuals show incomplete $CD4^+$ T-cell recovery, abnormal T-cell activation and higher mortality. One potential source of immune activation could be coinfection with cytomegalovirus (CMV). Humoral response to CMV (IgG and IgM levels), immune activation, inflammation and T-cell death in c-ART-suppressed individuals with $CD4^+$ T-cell counts >350cells/μL (immunoconcordant, n=133) or <350 cells/μL (immunodiscordant, n=95) was analyzed to evaluate the impact of CMV humoral response on immune recovery. 27 HIV-uninfected individuals were included as controls. In addition, the presence of CMV IgM antibodies was analyzed in 58 immunoconcordant and 66 immunodiscordant individuals retrospectively. Higher CMV IgG levels were observed in individuals with poor immune reconstitution (p=0.0002). CMV IgG responses were inversely associated with nadir $CD4^+$ T-cell count values (p<0.0001) and with the percentage and absolute $CD4^+$ counts (p<0.0001 and <0.0001, respectively); conversely, CMV IgG responses were positively correlated with activation and death markers in $CD4^+$ T-cells ($CD4^+HLA\text{-}DR^+$ p=0.01; death p=0.0007), activated memory $CD8^+$ T-cells ($CD45RA^-CD38^+$, p=0.006) and plasma sCD14 levels (p=0.02). Longitudinal analysis revealed a higher frequency of IgM^+ samples in individuals with poor CD4 cell recovery, with an association between the presence of IgM and the level of IgG (p<0.0001) and cell death (p=0.04). The magnitude of the humoral immune response to CMV is associated with the nadir CD4 T-cell count, inflammation, immune activation and $CD4^+$ T-cell death, suggesting that CMV infection could be a relevant driving force in the increased morbidity/mortality observed in HIV^+ individuals with poor $CD4^+$ T-cell recovery.

Key words: CMV, anti-CMV IgG, anti-CMV IgM, CMV reactivation, HIV-treated, immunodiscordant individuals, immunological recovery

Introduction

Combination antiretroviral therapy (c-ART) has dramatically improved the health of HIV-infected individuals. However, even for those HIV-infected individuals who are successfully treated, life expectancy remains reduced, particularly for individuals who fail to recover $CD4^+$ T-cell counts [1]. These individuals, called immunodiscordants or immune non-responders, show higher levels of immune activation, inflammation, and immunosenescence, and they have a higher risk of AIDS-related and non-AIDS-related mortality and morbidity than immunoconcordant individuals, i.e., those who successfully recover normal $CD4^+$ T-cell counts. The reason for this suboptimal immune reconstitution is not completely understood, and among other factors, persistent coinfections with other pathogens, including cytomegalovirus (CMV), are likely contributing factors (reviewed in [2]).

CMV is a highly prevalent beta herpesvirus that after infection establishes lifelong latency within the host and periodically reactivates when the cellular immune system is compromised in response to inflammation, infection or stress [3,4].

In HIV-uninfected individuals, CMV seropositivity has been clearly associated with immunosenescence and the development of cardiovascular diseases, cancer and all-cause mortality [5,6]. In HIV-infected individuals, coinfection has been implicated in immune activation, senescence, cardiovascular complications and accelerated progression to AIDS and death [7,9]. The humoral immune response to CMV, as measured by circulating anti-CMV IgG antibodies, has been associated with disease progression [10-12], risk of non-AIDS related events [8] cardiovascular disease [13], impaired neurocognitive function [14] and physical function impairment [15]. Similarly, in HIV-uninfected individuals, different studies have also shown that CMV-specific humoral immune responses were associated with cardiovascular disease and all-cause mortality [5,16-18]. These observations suggest that the magnitude of the humoral immune response may be a relevant marker of the deleterious effects of CMV infection.

Therefore, in this study we aimed to investigate the association between humoral response, CMV IgG and IgM levels and CD4 immune recovery, immune activation and cell death in long-term cART-suppressed HIV-infected individuals with favorable and unfavorable immunologic responses.

Methods

Study population

Individuals on long-term c-ART (median 10 years) with viral load <50 copies/mL (n=228) were classified according to their $CD4^+$ T-cell counts as previously described [19,20]: individuals with adequate immune recovery, referred as immunoconcordant, with absolute $CD4^+$ T-cell counts >350 cells/μL (n=133), or individuals with poor immune reconstitution, referred as immunodiscordant, with absolute $CD4^+$ T-cell counts <350 cells/μL (n=95). In addition, a group of HIV-uninfected individuals (HIV^-) were selected as the control group (Table 1). The institutional review board of our center approved the study (EO code: EO-07-024). The methods were carried out in accordance with the Declaration of Helsinki. Written informed consent was obtained from all participants.

Anti-CMV IgG and IgM antibody levels and IgG avidity

The CMV-specific IgG and IgM antibodies were measured using semi-quantitative BIO-FLASH® CMV IgG and the qualitative BIO-FLASH® CMV IgM chemiluminescent immunoassays, respectively (Biokit, Barcelona, Spain). IgG avidity was determined by LABCO using a commercially available CMV IgG avidity kit based on an enzyme immunoassay method (ELISA) that employs urea (anti-CMV IgG Avidity ELISA, DRG, New Jersey, USA). CMV IgG antibodies with avidities of >40% were considered high-avidity antibodies.

Detection of CMV DNA by quantitative TaqMan PCR

DNA extraction was performed on 200 μl of plasma using a QIAamp DNA blood kit (Qiagen, Spain). The real-time polymerase chain reaction amplification for CMV detection (REALQUALITY RQ-CMV, AB Analitica, Italy) was used according to the manufacturer's instructions.

Immune activation, T-cell destruction and sCD14

The expression of $CD4^+$ and $CD8^+$ T-cell subsets and immune activation markers was analyzed in blood samples by flow cytometry using the following antibodies: CD3-APC-Cy7, CD4-APC, CD8-PE-Cy7, CD45RA-FITC, CD38-PerCP, HLA-DR-PerCP and CD95-

FITC as previously reported [19]. sCD14 levels were quantified by a commercially available ELISA (Diaclone). Cell death was measured after 1 day of *ex vivo* culture in the presence or absence of the pancaspase inhibitor Z-VAD-fmk (R&D Systems) in fresh PBMCs by simultaneous staining of CD3, CD4, CD8 antigens; mitochondrial membrane potential ($DIOC_6$); and plasma membrane permeability (propidium iodide, PI) was measured as previously described [19].

Statistical analysis

Continuous variables were expressed as the median with interquartile ranges and compared using nonparametric tests (two-tailed Mann–Whitney *U*-test) because the parameters were not normally distributed. Discrete variables were described as percentages and analyzed using the chi-square or Fisher's exact test. Spearman's correlation coefficient was calculated to identify associations between variables. For comparison of reactivation rates between HIV subgroups, a Poisson regression was fitted that was restricted to individuals with reactivations and adjusted by the number of tested samples for each individual. All analyses and graphical representations were completed in GraphPad Prism v5.0a (GraphPad Software, Inc) or R 3.3.1 (R Core Team) [21].

Results

Participant characteristics

Table 1 summarizes the main characteristics of individuals enrolled in this study. A total of 228 HIV^+ individuals were included: 133 were defined as immunoconcordants (individuals with favorable immunologic response) and 95 as immunodiscordants (unfavorable immunologic response). A minimal but significant difference was observed in the age, with immunodiscordant individuals being slightly older (median age, 46) than immunoconcordants (median age, 44). As previously reported, significantly lower $CD4^+$ T-cell counts (absolute, percentage and nadir) were observed in immunodiscordant subjects compared with immunoconcordant subjects [19]. The prevalence of HCV and HBV did not significantly differ among immunodiscordants and immunoconcordants. Twenty-seven HIV-uninfected individuals were also included as a control group. This HIV^- group was younger and contained a lower proportion of males than the HIV^+ group.

CMV serostatus

In HIV-uninfected individuals, seropositivity was 63%, and although the number of individuals was low, seropositivity rose with age (Table 2). In HIV$^+$ individuals, seropositivity was significantly higher (93%; $p<0.0001$) and did not vary with age. No differences in the seropositivity percentage were found between HIV$^+$ subgroups (Table 2).

Association between CMV IgG antibody levels and HIV status.

The plasma CMV IgG antibody levels ranged from <10 to 9,850 AU/ml, including 25 participants (10 HIV$^-$ and 15 HIV$^+$) with concentrations below the manufacturer's cutoff for positive results (10 AU/ml). These IgG$^-$ individuals were excluded from the subsequent analysis. CMV IgG level was not associated with age in HIV-uninfected or in HIV$^+$ individuals ($p=0.45$ and $p=0.28$, respectively. Table S1). Compared with HIV-uninfected controls, HIV-infected subjects had significantly higher plasma CMV IgG levels ($p<0.0001$) with a significantly higher level in all comparable age groups (Fig 1 and Table 2). Among HIV-infected individuals, significantly higher CMV IgG levels were detected in immunodiscordant subjects compared with immunoconcordant subjects (Fig 1), with significantly higher levels in all age groups analyzed (Table 2). No significant differences in the IgG levels were found between men and women in any of subgroups evaluated (data not shown).

Table 1. Participant characteristics.

	HIV⁻ (n=27)	All HIV⁺ (n=228)	P value[a]	Immunoconcordant (n=133)	Immunodiscordant (n=95)	P value[b]
Age (years); median (IQR)	38 (33-50)	45 (41-50)	**0.0147**	44 (40-50)	46 (43-50)	**0.0464**
Gender (males); no. (%)	11 (40.7)	176 (77.2)	**0.0002**[c]	99 (74.4)	77 (81)	0.2655[c]
Time since HIV diagnosis (years); median (IQR)		12.87 (8.2-17.36)		12.82 (9.2-16.35)	13.71 (7-19.87)	0.4957
Time on ART (years); median (IQR)		10.62 (6.7-13.42)		11.08 (7.84-13.30)	9.27 (4.38-14.35)	0.1058
Nadir CD4 T-cell counts (cells/µL); median (IQR)		142.5 (63.25-263)		234 (129.5-318)	71 (28-135)	**< 0.0001**
Absolute CD4 T-cell count (cells/µL); median (IQR)		443 (285-674)		632 (480.5-797)	250.5 (201.5-315.5)	**< 0.0001**
CD4 T-cell (% of lymphocytes); median (IQR)		26 (19-33)		30 (26-36)	18 (14-21)	**< 0.0001**
HCV coinfection, no. (%)				43 (32.3)	43 (45.3)	0.0531[c]
HBV coinfection, no. (%)				6 (4.5)	4 (4.2)	1.0[c]

[a]Comparison of HIV- and HIV+ individuals. [b]Comparison of immunoconcordant and immunodiscordant individuals. (Mann Whitney U test or [c]Fisher's exact test).

Table 2.CMV seropositivity and IgG levels (Values expressed in arbitrary units (AU)/mL).

	HIV⁻		All HIV⁺			HIV⁺ subgroups				
						Immunoconcordant		Immunodiscordant		
Age (yr)	**% positive (no.)**	**CMV IgG levels**	**% positive (no.)**	**CMV IgG levels**	**P[a] value**	**% positive (no.)**	**CMV IgG levels**	**% positive (no.)**	**CMV IgG levels**	**P[b] value**
25-39	47 (7)	63 (47-200)	95 (40)	480 (148-792)	**0.0043**	97 (30)	382 (122-644)	91 (10)	977 (523-1491)	**0.01**
40-59	80 (8)	42 (29-292)	92 (160)	605 (272-1434)	**0.0002**	91 (85)	490 (208-1187)	94 (75)	795 (383-1667)	**0.02**
60-79	100 (2)	173 (44-303)	100 (13)	607 (242-1555)		100 (9)	451 (121-609)	100 (4)	1558 (949-2733)	**0.01**
Total	**63 (17)**	**47 (37-252)**	**93 (213)**	**576 (225-1251)**	**<0.0001**	**93 (124)**	**469 (182-955)**	**94 (89)**	**812 (393-1906)**	**0.0002**

[a]Comparison of HIV⁻ and All HIV⁺ individuals (Mann Whitney U test). [b]Comparison of immunoconcordant and immunodiscordant individuals. (Mann Whitney U test)

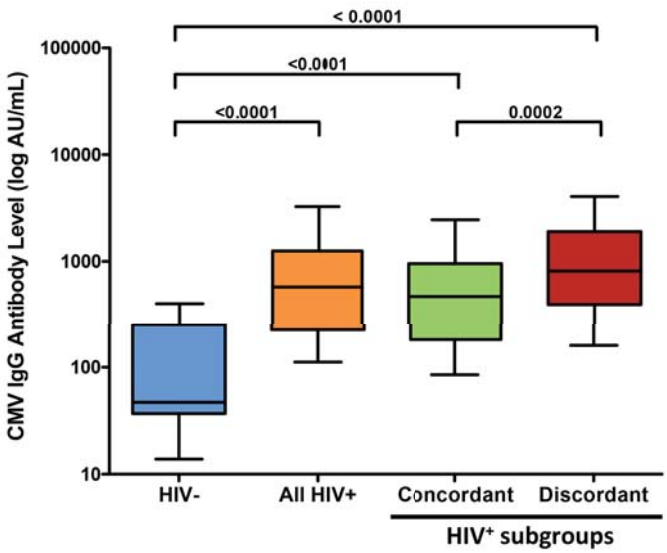

Figure 1. CMV IgG levels in the study participants. The IgG level was determined in plasma samples from healthy HIV-uninfected individuals (blue box), HIV-positive individuals (orange box), immunoconcordant individuals (green box) and immunodiscordant individuals (red box). The boxes represent the median and interquartile range of the values. The median values were compared using a non-parametric Mann-Whitney *U*-test.

Association between CMV IgG antibody levels, immunological variables and cell death.

In HIV-infected individuals, no significant correlation was observed between CMV IgG levels and time since HIV diagnosis or time receiving antiretroviral treatment (Table S1). CMV IgG antibody levels were inversely correlated with nadir, percentage and absolute $CD4^+$ T-cell counts (r=-0.29, p< 0.0001; r=-0.28, < 0.0001; r=-0.29, < 0.0001, respectively) (Fig 2A and Table S1) and positively correlated with the percentage of $CD8^+$ T-cells (r=0.31, p<0.0001, Table S1). No significant correlation was observed between CMV IgG levels and the percentage of naïve CD4+ T-cells (CD45RA+CD4+), while a significant negative association was observed with naïve CD8+ CD45RA+ T-cells (r=-0.16, p=0.0230) (Table S1).

CMV IgG levels were positively correlated with plasma sCD14 levels (r=0.1539, p=0.02). Regarding activation markers, CMV IgG levels were positively correlated with the expression of HLA-DR in CD4 T-cells (r=0.17, p=0.01, Fig 2A) and a trend towards association with activation of memory CD4 T-cells (Fig 2A, Table S1). In $CD8^+$ T-cells, no significant correlation was observed between CMV IgG levels and CD38 or HLA-DR in the total population (Fig 2B), but a significant positive correlation with the frequency of

activated memory (%CD38$^+$CD45RA$^-$) CD8$^+$ T-cells (r=0.19; p=0.006) was observed (Fig 2B and Table S1).

The CMV IgG antibody levels were not associated with T-cell production (CD31$^+$ CD4$^+$ or CD8$^+$ cells), but they were highly correlated with the destruction of T-cells (Fig 2A and Table S1). In both CD4$^+$ and CD8$^+$ T-cells, CMV IgG levels were positively associated with the pro-apoptotic marker CD95 (r=0.24, p=0.0003; r=0.16, p= 0.017, respectively) (Fig 2A and B). Concordantly, a positive correlation was also observed with total cell death, necrosis and apoptosis of CD4$^+$ T-cells evaluated in *ex vivo* culture of PBMCs (r=0.24, p=0.0007; r=0.23, p=0.0011; r=0.21, p=0.0030, respectively) (Figure 2A). Conversely, CMV IgG levels were not associated with *ex vivo* CD8$^+$ T-cell death or apoptosis (Fig2B and Table S1).

CMV IgM/ IgG avidity test.

Plasma CMV IgM antibodies were measured in all study samples. Only 7 samples were positive, and all of them corresponded to HIV$^+$ individuals, with an overall CMV IgM seropositivity of 3.1%. A higher presence, although not significant, was observed in the immunodiscordant group compared to the immunoconcordant group (4 of 95 samples and 3 of 133 samples, respectively). An IgG avidity assay was performed to determine whether the presence of IgM was due to a primary infection. IgM$^+$ and low-avidity IgG are accurate indicators of primary infection within the preceding 3 to 4 months, whereas IgM$^+$ and high-avidity IgG has been associated with persistent infection, re-infection or reactivation [22,23]. In our cohort, all IgM$^+$ samples exhibited high-avidity IgG (mean, 87.57%; SD±6.9), indicating it was not primary infection and suggesting a reactivation process although a re-infection process cannot be excluded.

To further explore the increased IgM presence in immunodiscordant individuals, a subgroup of subjects was selected from the total HIV$^+$ group for whom we had three or more longitudinal plasma samples available over the course of HIV infection. A total of 812 samples were obtained from 58 immunoconcordant and 66 immunodiscordant subjects, and the presence of IgM was determined. The median number of samples by individual and the follow-up were higher in the immunoconcordant than in the mmunodiscordant group (6 samples with 11.5 years of follow-up and 5 samples in 7.5 years, respectively) (Table 3). Among all the samples, 32 were IgM$^+$, and all but one had

high-avidity IgG antibodies (mean, 71.13%; SD±15.85). Remarkably, the distribution of the IgM+ samples was not homogeneous between the two HIV+ subgroups. Twenty-five of the IgM+/high-avidity IgG samples were from the immunodiscordant group in comparison with the 6 positive samples from immunoconcordant individuals (p=0.0002) (Table 3). This difference remained significant even when the weighted mean was calculated to take into account the different number of tested samples for each individual (Table3).

Table 3. Presence of anti-CMV IgM antibodies. Primary CMV infection and CMV reactivation over the course of HIV infection.

	Immunoconcordant	Immunodiscordant	P value
Individuals, n tested	58	66	
Samples, n tested	422	390	
Samples/ Individuals, median (IQR)	6 (4-10)	5 (4-7)	**0.02**[a]
Follow-up, years median (IQR)	11.5 (7-14)	8 (4-12)	**0.0003**[a]
IgM positive samples, n (%)	7 (1.65)	25 (6.4)	
Reactivation samples, n	6	25	**0.0002**[b]
Individuals with reactivations, n (%)	5 (8.6)	9 (13.6)	0.41[b]
Reactivation samples Rate, estimated	0.16	0.45	**0.0222**[c]

[a](Mann Whitney U test). [b](Fisher's exact test). [c](Wald test from Poisson regression)

A more detailed analysis of subjects in whom the presence of IgM+/high-avidity IgG antibodies were detected showed that the pattern was different between immunoconcordant and immunodiscordant subjects (Fig 3A and 3B, respectively). The immunodiscordant group had a surprisingly high number of IgM+/high-avidity IgG samples during their follow-up, with some of them having IgM antibodies present at most of the tested time points with a coverage of more that 9 years in one individual (Fig 3B). Conversely, in immunoconcordant individuals, all but one presented antibodies in only one of the tested samples (Fig 3A). The presence of IgM (high-avidity IgG) antibodies in immunoconcordant subjects was detected primarily in older samples and was associated with peaks of HIV viremia and low CD4+ T-cell counts in the absence of HAART or during virological failure episodes. However, in immunodiscordant individuals, presence of IgM antibodies was not associated with HIV viral load, CD4+ T-cell count or lack of antiretroviral treatment (Fig 2B). In addition to IgM levels, the presence of CMV DNA in all plasma samples used in this study was analyzed using real-time PCR. All tested samples were negative.

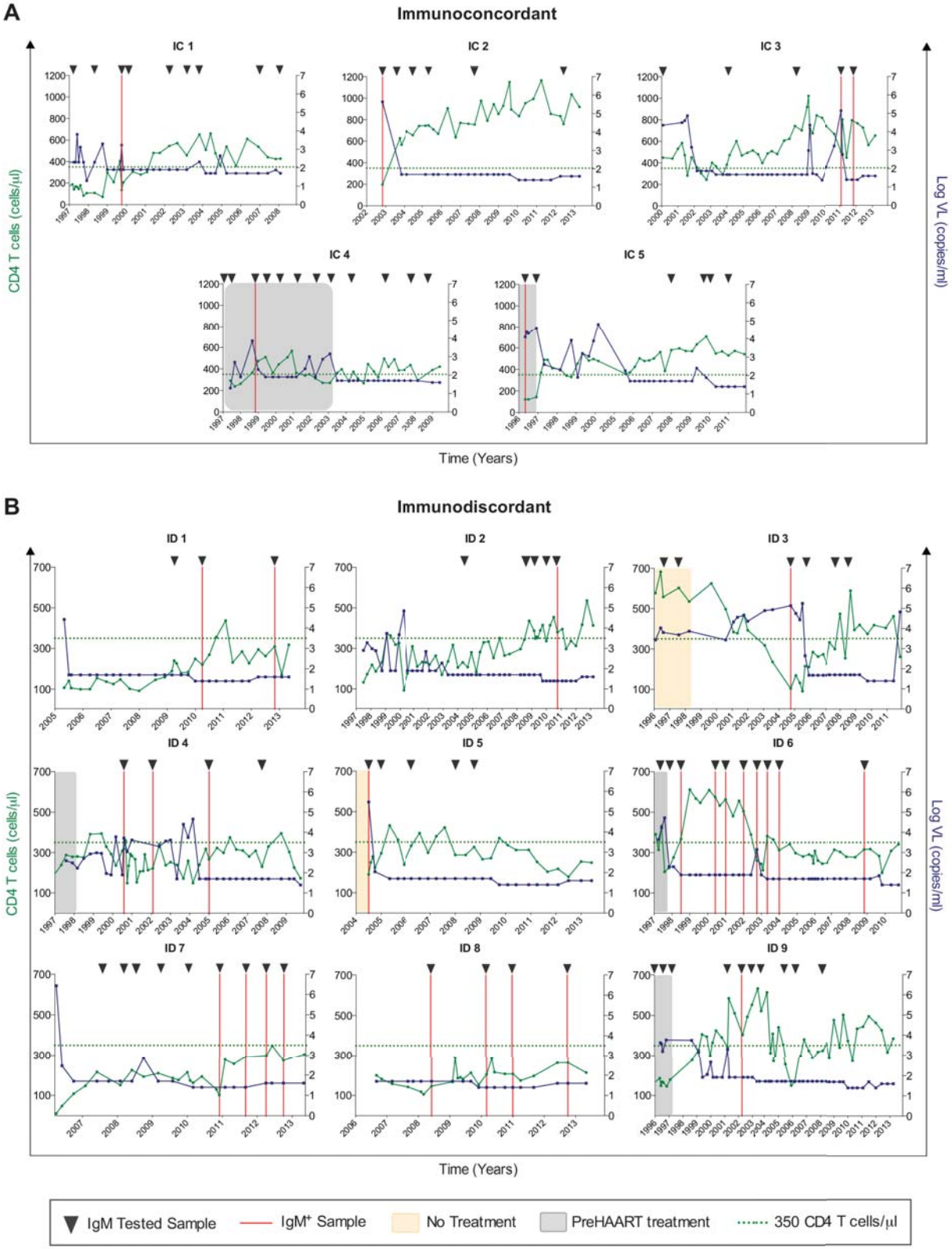

Figure 2. Pattern of CMV reactivation (IgM+/high-avidity IgG) in HIV-infected individuals. Evolution of viral load (VL, blue lines) and CD4 T-cell counts (green lines) during HIV infection in immunoconcordant (A) and immunodiscordant (B) subjects is presented. Samples in which IgM antibodies were measured are indicated (closed arrowheads). Solid red lines represent IgM-positive/high-avidity IgG samples. Periods of no highly active antiretroviral therapy (pre-HAART period, grey areas) or without treatment (orange areas) are also depicted. Areas without color indicate that individuals were under HAART.

Association between CMV IgM or IgG antibody levels and CD4 T-cell destruction

The relationship between CMV the presence of IgM (with high-avidity IgG) antibodies and CMV IgG levels was evaluated in HIV⁺ individuals. Because IgM appears intermittently, participants who had at least one time point with detectable levels of IgM antibodies (n=8, 6.5%, and n=10, 11.2% in immunoconcordants and immunodiscordants, respectively) were compared to subjects with undetectable IgM levels at any time point analyzed during the study. The IgG antibody level showed a clear association with the presence of IgM antibodies, with higher IgG levels in individuals in whom we detected IgM antibodies in all the groups (Fig 4A). Highest IgG levels were detected in immunodiscordant individuals with IgM antibodies. Total CD4⁺ T-cell death was associated with the presence of IgM antibodies in the total HIV⁺ population and in immunoconcordant individuals (Fig 4B). The presence of IgM antibodies was not associated with CD8⁺ T-cell death (data not shown).

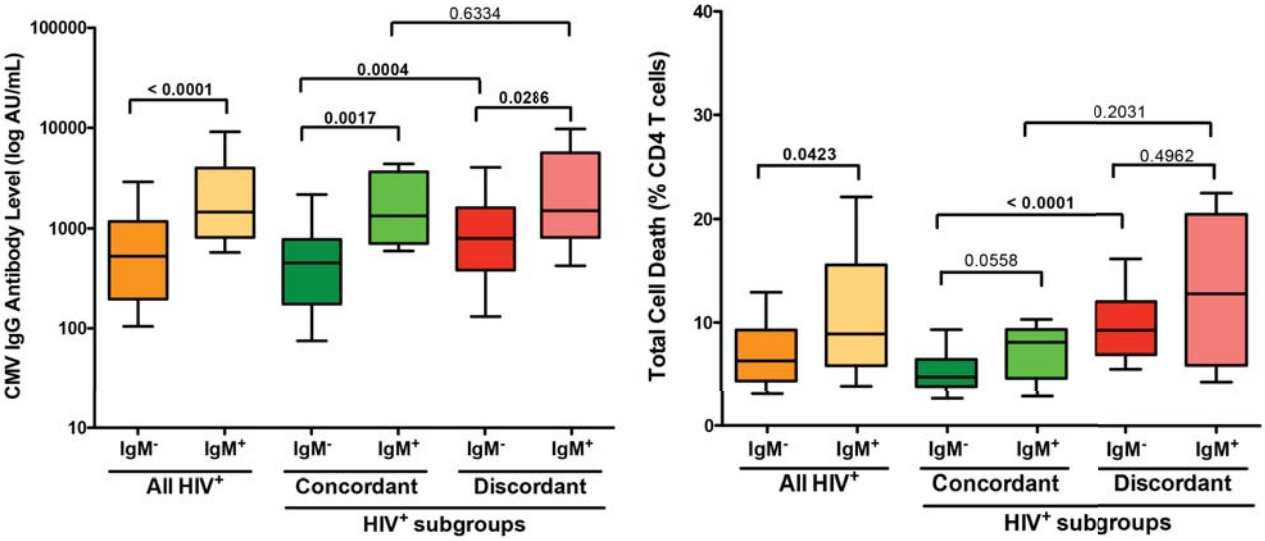

Figure 3. Association between CMV reactivation and CMV IgG antibody levels and T-cell death. Plasma CMV IgM antibody and IgG avidity was determined. Subjects with at least one IgM-positive/high-avidity IgG sample were classified as IgM-positive (IgM⁺) individuals (individuals with reactivations). Subjects in whom IgM was not detected are shown as IgM-negative (IgM⁻) individuals. The relationship between CMV reactivation and IgG levels (A) and total cell death (B) is shown. All HIV⁺ individuals (orange boxes) and immunoconcordant (green boxes) and immunodiscordant (red boxes) subgroups are represented. The boxes represent the median and interquartile range of the values. The median values were compared using a non-parametric Mann-Whitney *U*-test.

Discussion

CMV IgG titers, but not CMV serostatus, were associated with CD4 immune recovery, with the highest values found in individuals with poor immune reconstitution. CMV IgG levels were also negatively associated with the percentage and the absolute $CD4^+$ T-cell counts and with the nadir $CD4^+$ T-cell count. This association, although in agreement with previous studies [13-15,24], has not been observed by other authors [25,26]. One possible explanation for such discrepancies could reside in the different population studied: our population included individuals with a more compromised immunity, with lower nadir and $CD4^+$ T-cells, treated for longer time and some of them treated in the pre-HAART era.

In addition, higher anti-CMV IgG levels were associated with a reduction of naïve $CD8^+$ T-cells, increased frequency of activated memory $CD8^+$ T-cells ($CD45RA^-CD38^+$) and activated $CD4^+$ T-cell populations ($HLA\text{-}DR^+$) and the inflammation marker sCD14. Although the association was modest, these data were consistent with phenotypic changes previously described in CMV infection and its role in persistent immune activation in both HIV^+ and HIV-uninfected populations [12,27,28].

It has been postulated that higher CMV IgG antibody levels represent more frequent or intense subclinical CMV reactivation from latency. In our study, CMV reactivation was evaluated by measuring DNAemia in plasma (the only available sample), and as might be expected by the low frequency of CMV in blood [25,29-31], none of the samples was positive. The IgM/IgG avidity test has been shown to be a reliable serologic indicator to distinguish primary infection from episodes of reactivation or re-infection [22,23]. Long-term IgM persistence following primary infection in some individuals has been described. Twenty-five percent of patients with primary CMV infection still have detectable IgM 4 months after infection, with IgM sometimes persisting for over a year [32-34]. However, the presence of IgM in our population is unlikely to be due to long-term IgM persistence, because in some analyzed individuals IgM were detected in all the tested samples, meaning a persistence of more than 9 years, never reported until now. Using this test, IgM^+/high-avidity IgG antibodies were found in 3.1% of the individuals in the cross-sectional study. Among the 124 subjects with longitudinal samples, 14 (11%) presented

IgM antibodies. This prevalence was lower than that previously described by CMV DNA detection in other body fluids, which is in accordance with the compartmentalized replication of CMV primarily in the genital tract [30,35]. Interestingly, the number of IgM$^+$/high-avidity IgG samples, likely episodes of reactivation although a re-infection process cannot be excluded, was not evenly distributed between HIV subgroups, and a different pattern was clearly observed, suggesting that the IgM presence could be triggered by different causes in those groups. In immunoconcordant individuals, IgM antibodies were found in isolated samples during the study period and was associated with high HIV viremia and/or low levels of CD4$^+$ T-cells, which are both risk factors previously described for CMV reactivation [36]. In the immunodiscordant group, most individuals had more than one positive sample, and some of them had IgM$^+$ samples at almost all the tested time points despite HIV suppression and CD4$^+$ T-cell counts above 100 cells/µL, which is the cutoff level at which CMV reactivations are more frequent in HIV-infected individuals [36]. However, as CMV reactivation is induced by immunosuppression, the presence of IgM observed could be the result of the profound alterations in the memory CD4$^+$ T-cell compartment described in immunodiscordant individuals [37]. Furthermore, the high rate of IgM$^+$ samples may also be due to the persistently high levels of immune activation and inflammation displayed by those individuals [20]. Consistently, the initiation of CMV replication appears to be linked to the activation of the immune system, and high prevalence of CMV reactivation has been observed in conditions associated with increased levels of pro-inflammatory molecules [38]. Our study design does not allow us to establish the direction of causation in the relationship between CMV reactivation and inflammation; therefore, CMV reactivation could be the cause rather than the consequence of the immune activation and inflammation displayed by the immunodiscordant group.

The role of CMV infection in persistent immune activation and its contribution to poorer health have been extensively studied among HIV$^+$ and HIV-uninfected populations [16,31,39,40], and the effect of CMV infection has been demonstrated by the significant reduction of activated CD8$^+$ T-cells in blood after valganciclovir therapy [39]. We only found a trend in the increase of CD4$^+$ and CD8$^+$ T-cell activation likely due to the low number of samples in which we found reactivation (IgM antibodies). Cellular activation

caused by CMV also contributes to HIV pathogenesis by depletion of T-cells via apoptosis-induced cell death [41]. According to these data, a correlation between IgG antibody levels and the frequencies of apoptosis-prone $CD4^+$ and $CD8^+$ T-cells and increased total cell death, apoptosis and necrosis in $CD4^+$ T-cells from CMV IgM^+ individuals was observed, suggesting that CMV infection may play an important role in $CD4^+$ T-cell depletion in our HIV^+ population.

The increased CMV humoral responses, which were correlated with increased CMV-specific cellular responses (data not shown. Manuscript submitted) observed in individuals with poor immune recovery, along with the previously established association between CMV immune response level and mortality [5,13,15-18], indicate that regardless of the cause the this high immune response to CMV, it will have significant negative consequences in this population with increased risk of morbidity and mortality.

Our study had several limitations. Unfortunately, the time of primary CMV infection was not available; thus, we cannot rule out the possibility that the higher level of CMV IgG in the immunodiscordant population could be due to a longer duration of CMV infection or a aberrant B-cell activation. Longer duration of CMV infection acquired before HIV infection may alter the balance between mature and naïve T-cells [27], skew the T-cell repertoire [42] and have an impact in immune recovery. We were also constrained by the small number of individuals with IgM^+ samples in our cohort. However, the association between IgM seropositivity and the magnitude of IgG levels observed and previously reported [43] indicate that the IgM positivity is related to reactivation and has an impact on the systemic immune response. Conversely, a negative association between CMV seminal shedding and CMV IgG levels has been reported, although this association was found in a viremic-ART-naïve population with a high CD4 T-cell count [25]. However, the biological significance and the systemic impact of detectable CMV DNA in different compartments, the occurrence of CMV shedding, the frequency and the factors associated with the shedding in different body fluids are poorly understood [30,35,44,45].

Despite its limitations, the present study provides some important insights regarding the connection between CMV infection, the intensity of the CMV humoral immune response and immune recovery. Specifically, this study shows a higher CMV humoral response in long-term treated HIV-infected individuals with poor immune recovery. This increase in

the humoral response, along with its association with the nadir $CD4^+$ T-cell count, $CD4^+$ T-cell activation, sCD14 and cell death, suggest that CMV infection with likely persistent periods of subclinical reactivation could be a relevant driving force in inflammation and immune activation, and therefore, may impact the mortality observed in HIV^+ individuals with poor CD4 T-cell recovery. Further studies are needed to determine whether the persistent CMV replication could be targeted/prevented as a strategy to reduce the immune response intensity, persistent immune activation and mortality in those individuals at risk.

Funding

This work was supported by the EC11-045 project (Ministerio de Sanidad y Política Social) and the Spanish AIDS network 'Red Temática Cooperativa de Investigación en SIDA' (RD12/0017/0002). Grant RD12/0017/0002 is co-funded by the Spanish Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) and the European Fund for Regional Development (FEDER). C.C. and J.B. are supported by the ISCIII and the Health Department of the Catalan Government (Generalitat de Catalunya).

Conflict of interest

EGM, MM, EG, VU, DO, JP, JB and CC . report no disclosures. B.C. have served as a consultant to and/or have received research grant support from Gilead, Janssen, MSD, ViiV, BMS.

Acknowledgments

We are grateful to Pau Bruguera, Mercè Badia and Joaquim Ortiz from Biokit for their help with the CMV IgG and IgM evaluation, to technical staff of IrsiCaixa for sample processing and the clinical staff of Fundació Lluita. The authors would like to thank all the individuals who were participants in the study.

References

1. Lewden C, May T, Rosenthal E, Burty C, Bonnet F, Costagliola D, et al. Changes in causes of death among adults infected by HIV between 2000 and 2005: The “Mortalité 2000 and 2005” surveys (ANRS EN19 and Mortavic). J Acquir Immune Defic Syndr. 2008 Aug 15;48(5):590–8.
2. Massanella M, Negredo E, Clotet B, Blanco J. Immunodiscordant responses to HAART--mechanisms and consequences. Expert Rev Clin Immunol. 2013 Nov;9(11):1135–49.
3. Cannon MJ, Schmid DS, Hyde TB. Review of cytomegalovirus seroprevalence and demographic characteristics associated with infection. Rev Med Virol. 2010 Jul;20(4):202–13.
4. Hummel M, Abecassis MM. A model for reactivation of CMV from latency. J Clin Virol. 2002 Aug;25 Suppl 2:S123–36.
5. Simanek AM, Dowd JB, Pawelec G, Melzer D, Dutta A, Aiello AE. Seropositivity to Cytomegalovirus, Inflammation, All-Cause and Cardiovascular Disease-Related Mortality in the United States. Hernandez A, editor. PLoS ONE. 2011 Feb 17;6(2):e16103.
6. Sorlie PD, Nieto FJ, Adam E, Folsom AR, Shahar E, Massing M. A prospective study of cytomegalovirus, herpes simplex virus 1, and coronary heart disease: the atherosclerosis risk in communities (ARIC) study. Arch Intern Med. 2000 Jul 10;160(13):2027–32.
7. Hsue PY, Hunt PW, Sinclair E, Bredt B, Franklin A, Killian M, et al. Increased carotid intima-media thickness in HIV patients is associated with increased cytomegalovirus-specific T-cell responses. AIDS. 2006 Nov 28;20(18):2275–83.
8. Lichtner M, Cicconi P, Vita S, Cozzi-Lepri A, Galli M, Caputo Lo S, et al. Cytomegalovirus coinfection is associated with an increased risk of severe non-AIDS-defining events in a large cohort of HIV-infected patients. J Infect Dis. 2015 Jan 15;211(2):178–86.
9. Freeman ML, Mudd JC, Shive CL, Younes S-A, Panigrahi S, Sieg SF, et al. CD8 T-Cell Expansion and Inflammation Linked to CMV Coinfection in ART-treated HIV Infection. CLIN INFECT DIS. 2015 Sep 23.
10. Polk BF, Fox R, Brookmeyer R, Kanchanaraksa S, Kaslow R, Visscher B, et al. Predictors of the acquired immunodeficiency syndrome developing in a cohort of seropositive homosexual men. N Engl J Med. 1987 Jan 8;316(2):61–6.
11. Detels R, Visscher BR, Fahey JL, Sever JL, Gravell M, Madden DL, et al. Predictors of clinical AIDS in young homosexual men in a high-risk area. Int J Epidemiol. 1987 Jun;16(2):271–6.
12. Patel EU, Gianella S, Newell K, Tobian AAR, Kirkpatrick AR, Nalugoda F, et al. Elevated cytomegalovirus IgG antibody levels are associated with HIV-1 disease progression and immune activation. AIDS. 2017 Mar 27;31(6):807–13.
13. Parrinello CM, Sinclair E, Landay AL, Lurain N, Sharrett AR, Gange SJ, et al. Cytomegalovirus immunoglobulin G antibody is associated with subclinical carotid artery disease among HIV-infected women. J Infect Dis. 2012 Jun 15;205(12):1788–96.
14. Brunt SJ, Cysique LA, Lee S, Burrows S, Brew BJ, Price P. Short Communication: Do Cytomegalovirus Antibody Levels Associate with Age-Related Syndromes in HIV Patients Stable on Antiretroviral Therapy? AIDS Research and Human Retroviruses. 2016 Jun;32(6):567–72.
15. Erlandson KM, Allshouse AA, Rapaport E, Palmer BE, Wilson CC, Weinberg A, et al. Physical function impairment of older, HIV-infected adults is associated with cytomegalovirus immunoglobulin response. AIDS Research and Human Retroviruses. 2015 Sep;31(9):905–12.
16. Roberts ET, Haan MN, Dowd JB, Aiello AE. Cytomegalovirus Antibody Levels, Inflammation, and Mortality Among Elderly Latinos Over 9 Years of Follow-up. American Journal of Epidemiology. 2010 Aug 10;172(4):363–71.
17. Gkrania-Klotsas E, Langenberg C, Sharp SJ, Luben R, Khaw K-T, Wareham NJ. Seropositivity and higher immunoglobulin g antibody levels against cytomegalovirus are associated with mortality in the population-based European prospective investigation of Cancer-Norfolk cohort. CLIN INFECT DIS. 2013 May;56(10):1421–7.
18. Gkrania-Klotsas E, Langenberg C, Sharp SJ, Luben R, Khaw K-T, Wareham NJ. Higher immunoglobulin G antibody levels against cytomegalovirus are associated with incident ischemic heart disease in the population-based EPIC-Norfolk cohort. J Infect Dis. 2012 Dec 15;206(12):1897–903.
19. Negredo E, Massanella M, Puig J, Pérez-Alvárez N, Gallego Escuredo JM, Villarroya J, et al. Nadir CD4 T Cell Count as Predictor and High CD4 T Cell Intrinsic Apoptosis as Final Mechanism of Poor

CD4 T Cell Recovery in Virologically Suppressed HIV-Infected Patients: Clinical Implications. CLIN INFECT DIS. 2010 May;50(9):1300–8.
20. Massanella M, Negredo E, Pérez-Alvárez N, Puig J, Ruiz-Hernández R, Bofill M, et al. CD4 T-cell hyperactivation and susceptibility to cell death determine poor CD4 T-cell recovery during suppressive HAART. AIDS. 2010 Apr;24(7):959–68.
21. 2016 RCT. A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing [Internet]. Vienna, Austria. Available from: https://www.R-project.org/.
22. Dollard SC, Staras SAS, Amin MM, Schmid DS, Cannon MJ. National prevalence estimates for cytomegalovirus IgM and IgG avidity and association between high IgM antibody titer and low IgG avidity. Clin Vaccine Immunol. 2011 Nov;18(11):1895–9.
23. Prince HE, Lapé-Nixon M. Role of cytomegalovirus (CMV) IgG avidity testing in diagnosing primary CMV infection during pregnancy. Clin Vaccine Immunol. 2014 Oct;21(10):1377–84.
24. Schaftenaar E, Verjans GMGM, Getu S, McIntyre JA, Struthers HE, Osterhaus ADME, et al. High seroprevalence of human herpesviruses in HIV-infected individuals attending primary healthcare facilities in rural South Africa. PLoS ONE. 2014;9(6):e99243.
25. Gianella S, Morris SR, Tatro E, Vargas MV, Haubrich RH, Daar ES, et al. Virologic correlates of anti-CMV IgG levels in HIV-1-infected men. J Infect Dis. 2014 Feb 1;209(3):452–6.
26. Smith DM, Nakazawa M, Freeman ML, Anderson CM, Oliveira MF, Little SJ, et al. Asymptomatic CMV Replication during Early HIV-infection is Associated with Lower CD4/CD8 Ratio during HIV Treatment. CLIN INFECT DIS. 2016 Sep 6.
27. Alonso Arias R, Moro-Garcia MA, Echeverria A, Solano-Jaurrieta JJ, Suarez-Garcia FM, Lopez-Larrea C. Intensity of the humoral response to cytomegalovirus is associated with the phenotypic and functional status of the immune system. Journal of Virology. 2013 Apr;87(8):4486–95.
28. van der Heiden M, van Zelm MC, Bartol SJW, de Rond LGH, Berbers GAM, Boots AMH, et al. Differential effects of Cytomegalovirus carriage on the immune phenotype of middle-aged males and females. Sci Rep. 2016;6:26892.
29. Kaye S, Miles D, Antoine P, Burny W, Ojuola B, Kaye P, et al. Virological and immunological correlates of mother-to-child transmission of cytomegalovirus in The Gambia. J Infect Dis. 2008 May 1;197(9):1307–14.
30. Gianella S, Anderson CM, Vargas MV, Richman DD, Little SJ, Morris SR, et al. Cytomegalovirus DNA in semen and blood is associated with higher levels of proviral HIV DNA. J Infect Dis. 2013 Mar 15;207(6):898–902.
31. Gianella S, Strain MC, Rought SE, Vargas MV, Little SJ, Richman DD, et al. Associations between virologic and immunologic dynamics in blood and in the male genital tract. Journal of Virology. 2012 Feb;86(3):1307–15.
32. Stagno S, Tinker MK, Elrod C, Fuccillo DA, Cloud G, O'Beirne AJ. Immunoglobulin M antibodies detected by enzyme-linked immunosorbent assay and radioimmunoassay in the diagnosis of cytomegalovirus infections in pregnant women and newborn infants. J Clin Microbiol. 1985 Jun;21(6):930–5.
33. Grazia Revello M, Percivalle E, Zannino M, Rossi V, Gerna G. Development and evaluation of a capture ELISA for IgM antibody to the human cytomegalovirus major DNA binding protein. J Virol Methods. 1991 Dec;35(3):315–29.
34. Daiminger A, Bäder U, Eggers M, Lazzarotto T, Enders G. Evaluation of two novel enzyme immunoassays using recombinant antigens to detect cytomegalovirus-specific immunoglobulin M in sera from pregnant women. J Clin Virol. 1999 Aug;13(3):161–71.
35. Slyker J, Farquhar C, Atkinson C, Ásbjörnsdóttir K, Roxby A, Drake A, et al. Compartmentalized cytomegalovirus replication and transmission in the setting of maternal HIV-1 infection. CLIN INFECT DIS. 2014 Feb;58(4):564–72.
36. Springer KL, Weinberg A. Cytomegalovirus infection in the era of HAART: fewer reactivations and more immunity. J Antimicrob Chemother. 2004 Sep;54(3):582–6.
37. Massanella M, Gomez-Mora E, Carrillo J, Curriu M, Ouchi D, Puig J, et al. Increased ex vivo cell death of central memory CD4 T cells in treated HIV infected individuals with unsatisfactory immune recovery. J Transl Med. 2015;13:230.
38. Varani S, Landini MP. Cytomegalovirus-induced immunopathology and its clinical consequences. Herpesviridae. 2011;2(1):6.

39. Hunt PW, Martin JN, Sinclair E, Epling L, Teague J, Jacobson MA, et al. Valganciclovir reduces T cell activation in HIV-infected individuals with incomplete CD4+ T cell recovery on antiretroviral therapy. J Infect Dis. 2011 May 15;203(10):1474–83.
40. van de Berg PJ, Heutinck KM, Raabe R, Minnee RC, Young SL, van Donselaar-van der Pant KA, et al. Human cytomegalovirus induces systemic immune activation characterized by a type 1 cytokine signature. J Infect Dis. 2010 Sep 1;202(5):690–9.
41. Slyker JA, Rowland-Jones SL, Dong T, Reilly M, Richardson B, Emery VC, et al. Acute cytomegalovirus infection is associated with increased frequencies of activated and apoptosis-vulnerable T cells in HIV-1-infected infants. Journal of Virology. 2012 Oct;86(20):11373–9.
42. Nikolich-Žugich J. Ageing and life-long maintenance of T-cell subsets in the face of latent persistent infections. Nat Rev Immunol. 2008 Jul;8(7):512–22.
43. McVoy MA, Adler SP. Immunologic evidence for frequent age-related cytomegalovirus reactivation in seropositive immunocompetent individuals. J Infect Dis. 1989 Jul;160(1):1–10.
44. Reynolds DW, Stagno S, Hosty TS, Tiller M, Alford CA. Maternal cytomegalovirus excretion and perinatal infection. N Engl J Med. 1973 Jul 5;289(1):1–5.
45. Sheth PM, Danesh A, Sheung A, Rebbapragada A, Shahabi K, Kovacs C, et al. Disproportionately high semen shedding of HIV is associated with compartmentalized cytomegalovirus reactivation. J Infect Dis. 2006 Jan 1;193(1):45–8.

Supplementary data

Table S1. Associations of Cytomegalovirus Immunoglobin G (IgG) with Sociodemografic, Clinical and Immunological variables.

Variable	r	P value
Age (years)	0.0744	0.2797
Time since HIV diagnosis (years)	-0.0145	0.8328
Time on ART (years)	-0.0166	0.8092
Nadir CD4+ T-cell counts (cells/μL)	-0.2888	**< 0.0001**
Absolute CD4+ T-cell count (cells/μL)	-0.2941	**< 0.0001**
% CD4+ T-cells	-0.2836	**< 0.0001**
Absolute CD8 T-cell count (cells/μL)	0.1010	0.1429
% CD8+ T-cells	0.3055	**< 0.0001**
% CD4+CD45RA+	-0.0977	0.1561
% CD8+CD45RA+	-0.1561	**0.0230**
Activation		
CD14 soluble (ng/ml)	0.1539	**0.0251**
CD4+ T cells		
% CD4+CD38+	0.0262	0.7035
% CD4+CD38+ CD45RA+	-0.1034	0.1336
% CD4+CD38+ CD45RA-	0.1224	0.0755
% CD4+HLADR+	0.1725	**0.0121**
CD8+ T cells		
% CD8+CD38+	0.0960	0.1635
% CD8+CD38+ CD45RA+	-0.0660	0.3466
% CD8+CD38+ CD45RA-	0.1890	**0.0058**
% CD8+HLADR+	0.0792	0.2520
T-cell production and destruction		
CD4+ T cells		
% CD4+CD45RA+CD31+	-0.1187	0.0846
% CD4+CD95+	0.2441	**0.0003**
% CD4+HLADR+CD95+	0.2263	**0.0009**
% CD4+CD95+PD1+	0.1965	**0.0042**
% CD4+PD1+	0.1254	0.0692
% CD4+HLADR+PD1+	0.1828	**0.0078**
% CD4+ Total Death	0.2366	**0.0007**
% CD4+ Necrosis	0.2299	**0.0011**
% CD4+ Apoptosis	0.2085	**0.0030**
% CD4+ Intrinsic Apoptosis	0.2260	**0.0013**
% CD4+ Extrinsic Apoptosis	0.1416	**0.0455**
CD8+ T cells		
% CD8+CD45RA+CD31+	-0.0941	0.1718
% CD8+CD95+	0.1640	**0.0171**
% CD8+HLADR+CD95+	0.0937	0.1751
% CD8+ Total Death	0.0399	0.5745
% CD8+ Necrosis	0.1028	0.1474
% CD8+ Apoptosis	-0.0023	0.9732
% CD8+ Intrinsic Apoptosis	0.0366	0.6059

r represent Spearman correlations.

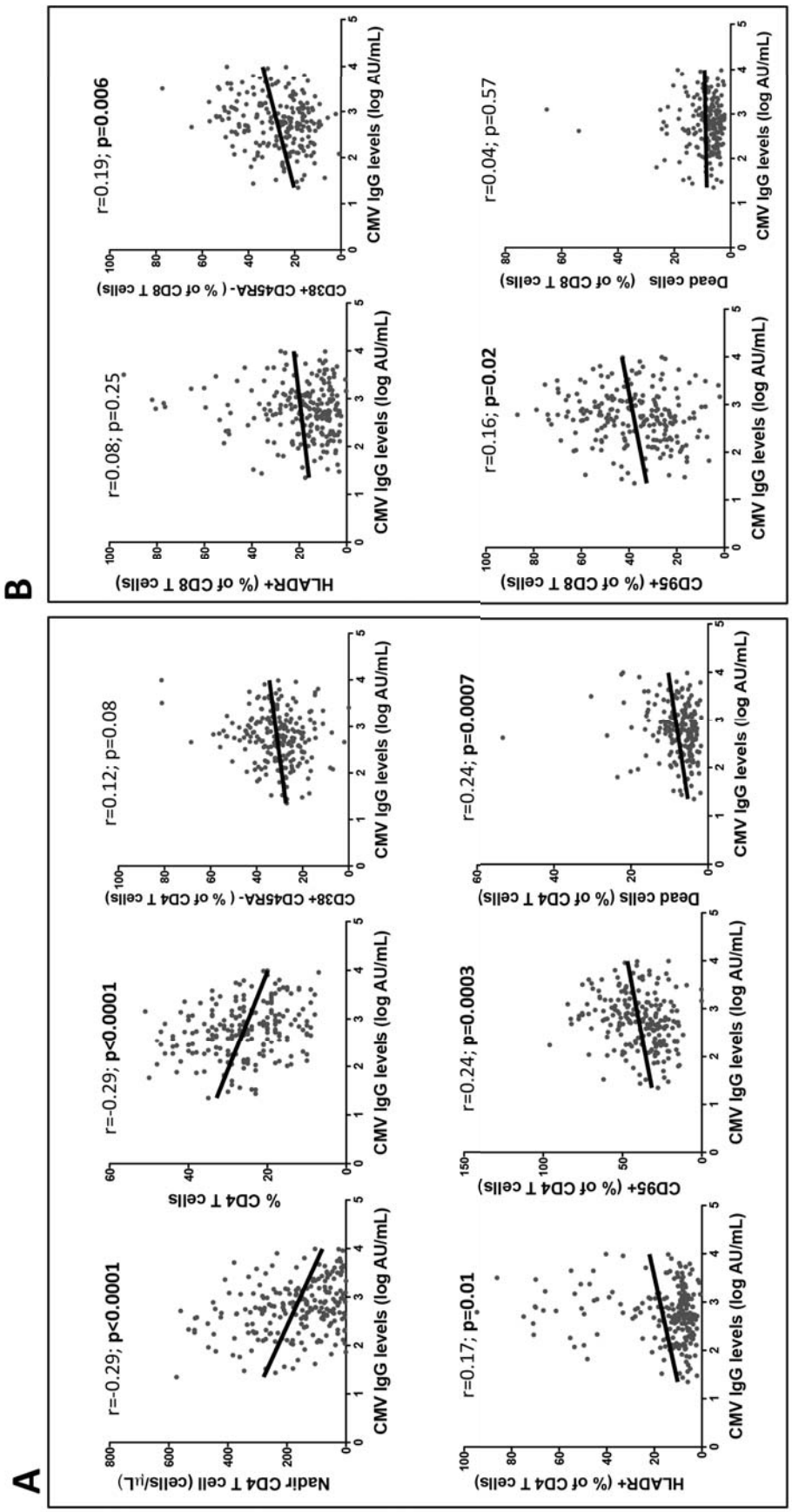

Figure S1. Correlations between CMV IgG antibody levels, immunological variables and T-cell destruction. A) Correlations between IgG levels and nadir activation levels (measured as the percentage of CD45RA$^-$CD38$^+$ and HLA-DR$^+$ cells), the expression of the pro-apoptotic marker CD95 and total cell death in CD4$^+$ T-cel populations are shown. B) Correlations between IgG levels and activation levels (measured as the percentage of CD45RA$^-$CD38$_+$ and HLA-DR$^+$ cells) and the expression o CD95 markers and total cell death in CD8$^+$ T-cell population are shown. Total cell death was evaluated in 24-h *ex vivo* PBMC cultures. Linear correlation (Spearman) r and p values are shown.

CAPÍTOL III

Estudi de la resposta autofàgica en cèl·lules T CD4 d'individus VIH⁺ en TARGA i suprimits virològicament

Impaired CD4 T-Cell Response to Autophagy in Treated HIV-1-Infected Individuals

Elisabet Gómez-Mora, MSc,1,# Véronique Robert-Hebmann, RE, 2,# Elisabet García, RE, 1 Marta Massanella, PhD, 1,3 Bonaventura Clotet, PhD, MD, 1,4,5 Cecilia Cabrera, PhD,1 Julià Blanco, PhD,1,5,# Martine Biard-Piechaczyk, PhD, 2,#,*

1 Institut de Recerca de la Sida IrsiCaixa-HIVACAT, Institut d'Investigació en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol, IGTP, UAB, 08916 Badalona, Spain
2 Centre d'Études d'Agents Pathogènes et Biotechnologies pour la Santé, CPBS, FRE 3689-CNRS-University of Montpellier, 34293 Montpellier, France
3 Université de Montréal, Faculté de Médecine, Department of microbiology, infectiology and immunology, Centre de Recherche du CHUM, Montréal, QC, Canada
4 Fundació Lluita contra la SIDA, Hospital Germans Trias i Pujol, 08916 Badalona, Spain
5 Universitat de Vic-UCC, 08500 Vic, Barcelona, Spain
# These authors contributed equally to this work.

J Acquir Immune Defic Syndr, 2017 Feb1;74(2):201-205.

Abstract

Autophagy restricts infection of CD4 T lymphocytes by HIV-1, but little is known about autophagy in treated HIV-1-infected individuals. We have analyzed the capability of CD4 T cells from aviremic treated individuals to trigger autophagy and correlated this response with parameters known to be important for immunological recovery. Autophagy was significantly decreased in CD4 T cells from HIV-1-treated individuals compared to uninfected controls, and this defective autophagic response was more pronounced in individuals with poor CD4 T cell recovery, suggesting a link between impaired autophagy in CD4 T cells and chronic immunological defects that remain in treated HIV infection.

Key words: autophagy, HIV-treated individuals, CD4 T cells, immunological recovery, immunodiscordant individuals.

Introduction

Autophagy is a degradation process involving autophagy-related (ATG) proteins by which portions of cytosol are sequestered into specific vesicles, called autophagosomes, and delivered into lysosomes for degradation. Microtubule-associated protein 1 light chain 3B (LC3) is an essential ATG protein and a marker for autophagosome formation [1]. Importantly, autophagy governs the immune responses against pathogens and accumulating evidence indicates that autophagy plays an important role during HIV-1 infection. First, autophagy is activated in CD4 T cells during HIV-1 entry and leads to their apoptosis when infection is abortive [2,3]. Autophagy exerts a powerful anti-HIV effect by selectively degrading the viral transactivator of transcription (Tat), required for HIV replication [4], and HIV-1 must thus counteract this mechanism through the action of several viral proteins, including viral infectivity factor (Vif) that inhibits autophagy in CD4 T lymphocytes [5]. Autophagy is also linked to both inflammatory response and cell death pathways [6]. Interestingly, the capability of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) to induce an effective autophagic response is important for the containment of HIV-1 in non-progressor-infected individuals [7].

CD4 T-cell population, which represents from 25 to 60% of PBMCs, is the main target of HIV-1 infection and is progressively depleted in untreated individuals. Combined antiretroviral therapy (cART) induces immune restoration, although around 15% of cART-treated individuals fail to improve their number of CD4 T cells despite viral suppression (immunodiscordant individuals, ID). Understanding of the mechanisms responsible for this inadequate immune recovery is of high importance because these individuals are at increased risk of clinical progression [8]. Several factors have been associated with this paradoxical immune response, including older age, impaired thymic output, low nadir CD4 T-cell count, co-infections, hyperactivation of the immune system, inflammation and increased T-cell death [9-11]. More precisely, CD4 T-cell apoptosis by intrinsic pathway is an important mechanism associated with blunted immune recovery [11].

We demonstrated here that autophagy is altered in HIV-1-infected individuals, even after efficient cART, and that this impaired autophagy response is still increased in ID.

Methods

Subjects

A cross-sectional pilot study was performed to analyze autophagy in CD4 T cells from peripheral blood of cART-treated individuals. The Institutional Review Board of the Hospital Germans Trias i Pujol approved the study (EO code: EO-12-010) and all individuals provided written informed consent. Individuals that participated in the APOP-V+I– study [12] were screened for the current study. All individuals had confirmed diagnosis of HIV infection, continuous cART with plasma viral load (VL) <50 copies/mL for at least the last 2 years and good treatment adherence. Exclusion criteria were: chemotherapy or interferon/ribavirin treatment and history of opportunistic infections during the last 2 years. For comparative purposes, a control group of HIV-uninfected individuals (n=18) was also analyzed. Clinical and demographic data were collected from medical records. PBMCs from all participants were purified from blood samples, assayed for different immunological parameters as described [11,12], and frozen.

Autophagy analysis by fluorescence microscopy

PBMCs were thawed, washed in medium composed of RPMI (Invitrogen) supplemented with 1% penicillin/streptomycin and 10% fetal calf serum (Invitrogen). Autophagy was induced by adding torin1 (2 μM, Sigma Aldrich) for 3 hours, in presence or absence of the autophagic flux blocker chloroquine (50μM, Sigma Aldrich). Basal autophagy was also analyzed in parallel.

Autophagy was detected by endogenous LC3 staining. Cells were fixed in a 1:1 acetone/methanol for 5 min at -20°C. Cells were then incubated with the rabbit anti-LC3 antibody L7543 (1μg/ml, Sigma Aldrich) and the mouse monoclonal anti-CD4 antibody 13B8.2 (2μg/ml, Beckman Coulter) for 1h, washed, and then incubated with secondary antibodies (Alexa Fluor® 488 goat anti-rabbit IgG and Alexa Fluor® 568 goat anti-mouse 2000x diluted, Life Technologies) for 30 min. After washing, nuclei were labeled with Dapi and cells were examined by epifluorescence using a Leica microscope. The number of LC3 dots (green) per CD4 T cell (red) was counted. More than 100 CD4 T cells were analyzed for each culture condition by 2 independent investigators.

Statistical analysis

One way analysis of variance (ANOVA) test was used to compare the autophagy response (number of LC3 dots (autophagosomes) per CD4 T cell) between the different groups in each experimental condition[13]. Differences were considered significant at $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, and $***P < 0.001$. Correlations were analyzed using Spearman's test.

Results

Individual characteristics

As expected, HIV-infected individuals showed lower CD4 T-cell counts and CD4/CD8 T-cell ratio, higher plasma soluble CD14 concentration (sCD14), and higher activation and cell death than uninfected controls (Table 1). HIV-infected individuals were classified according to the recovery of CD4 T cells as immunodiscordant (ID; CD4 T-cell count<350 cells/μL) or immunoconcordant individuals (IC; CD4 T-cell count≥350

cells/µL); ID and IC showed similar age (46 years (44-48) and 45 years (43-48), respectively), gender (87% and 88% of male, respectively) and plasma sCD14. The length of HIV infection from diagnosis and time on treatment showed a trend to be higher in IC compared to ID, although the differences did not reach statistical significance. Overall, ID showed expected lower CD4/CD8 ratio and current or nadir CD4 T-cell counts, lower naïve CD4 T-cell population ($CD45RA^{+}CD31^{+}$ cells) but higher frequency of activated CD4 T cells ($HLA\text{-}DR^{+}CD95^{+}$ cells) and CD4 T-cell death.

Response to autophagy is impaired in CD4 T cells from HIV-1-infected individuals

Basal autophagy, torin1-induced autophagy and autophagic flux were assessed in CD4 T cells from uninfected and HIV infected individuals. Basal autophagy was low and similar in both groups (Figure 1A and B). However, the capability of CD4 T cells to activate autophagy in response to torin1 was significantly impaired in HIV-infected individuals. Indeed, a significant decrease in the number of autophagosomes per CD4 T cell was observed in HIV-infected individuals after torin1 treatment, and this autophagic defect was still more pronounced when the autophagy flux was blocked by chloroquine (Figure 1A and B).

To analyze whether the autophagic response could be associated with immune recovery, we separately analyzed autophagy in CD4 T cells from IC and ID. Although basal autophagy was similar in all groups, torin1-induced autophagy was significantly lower in CD4 T cells from ID, compared to the control group (Figure 1A and C). The autophagic flux (treatment with torin1 plus chloroquine) was significantly impaired in CD4 T cells from IC and ID compared to HIV-negative individuals, and the defect was accentuated in ID (Figure 1C), suggesting that autophagy could play a role in CD4 recovery during cART.

Next, to explore the relationship between immune recovery and the capability of CD4 T cells of HIV-infected individuals to activate the autophagy flux, we correlated the main immunological features of IC and ID with the autophagy data. The capability of CD4 T cells from IC to activate the autophagic flux was positively correlated with the number of circulating CD4 T cells (Figure 1D, left panel) and inversely correlated with the frequency of naïve population (Figure 1D, middle panel), suggesting that the

autophagy response was mainly triggered by memory cells. These correlations were absent in ID, in which the autophagic flux correlated inversely with plasma sCD14 (Figure 1D, right panel), a marker of monocyte activation and inflammation. Surprisingly, no correlation was found between the level of cell death and the autophagy response of the CD4 T cells (data not shown). Finally, the autophagy flux was significantly impaired in HCV-coinfected ID (Figure 1E), suggesting that additional factors might influence the autophagic response during cART.

Table 1. Main clinical and immunological characteristics of HIV uninfected and infected individuals

	HIV⁻ individuals n=18	HIV⁺ individuals n=31	HIV⁻ vs HIV⁺ p-value[1]	ID n=15	IC n=16	IC vs ID p-value[2]
Time since HIV diagnosis (years), Median [IQR]	-	13 [6-17]		8 [4-17]	16 [6-19]	ns
Time on HAART (years), Median [IQR]	-	10 [5-13]		6 [3-12]	12 [6-15]	ns
Current HAART (% PI-based)	-	47		67	31	ns
Plasma VL (copies/mL)	-	<50		<50	<50	ns
HCV coinfection (%)	0	42	**<0.001**	33	38	ns
Ratio CD4/CD8, Median [IQR]	2.1 [1.7-2.5]	0.5 [0.3-0.8]	**<0.001**	0.27 [0.19-0.35]	0.86 [0.55-1.09]	**<0.001**
CD4 T-cell counts (cells/µL), Median [IQR]	881 [672-1232]	438 [297-719]	**0.001**	286 [203-328]	719 [559-946]	**<0.001**
Nadir (CD4 T cells/µL), Median [IQR]	-	116 [65-262]		82 [15-134]	251 [77-356]	**0.013**
CD4 T cells (% of lymph), Median [IQR]	62 [58-64]	26 [19-33]	**<0.001**	15.0 [10.7-20.0]	33 [27-37]	**<0.001**
CD4 T-cell death (%), Median [IQR]	2.5 [1.8-3.4]	6.5 [4.5-10.5]	**<0.001**	10.8 [6.6-13.9]	4.9 [4.3-6.7]	**0.001**
CD45RA⁺CD31⁺ (% of CD4 T cells), Median [IQR]	24 [20-34]	16 [10-25]	**0.04**	13.2 [8.2-27.8]	19.8 [11.9-25.7]	**0.033**
HLA-DR⁺CD95⁺ (% of CD4 T cells), Median [IQR]	2.3 [1.8-2.9]	7.4 [6.0-10.3]	**<0.001**	11.3 [6.8-19.0]	6.0 [4.8-7.6]	**0.005**
Plasma sCD14 (µg/mL), Median [IQR]	4.9 [4.3-5.7]	8.8 [8.0-9.6]	**<0.001**	8.8 [7.9-9.4]	9.0 [8.0-9.7]	ns

[1]Comparison of HIV-infected and uninfected individuals. (Mann-Withney U or Fisher exact test)

[2]Comparison of immumoconcordant and immunodiscordant HIV-infected individuals. (Mann-Withney U or Fisher exact test)

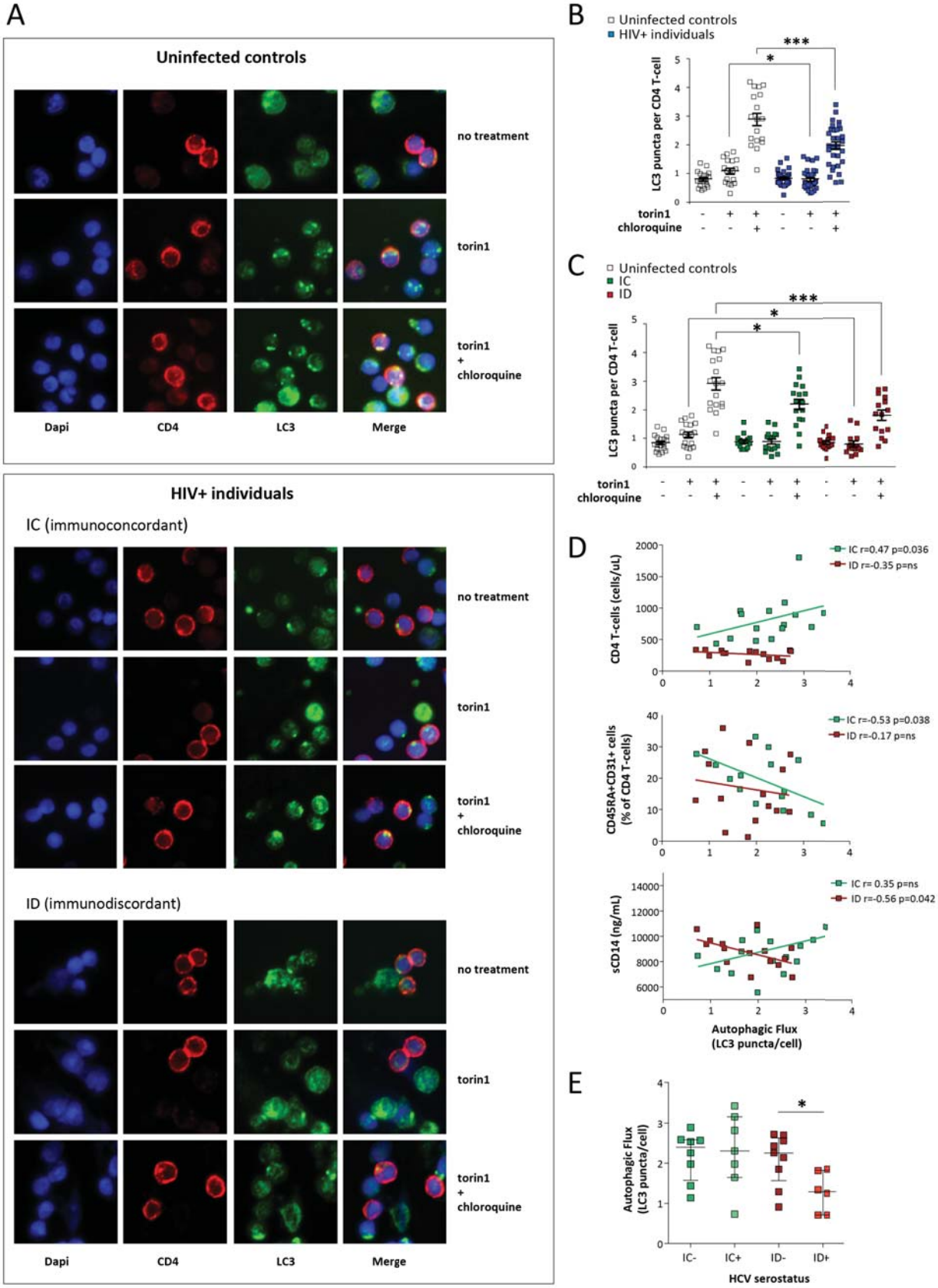

Figure 1. Autophagy response is impaired in CD4 T cells from treated HIV-infected individuals. (A) PBMCs from uninfected control individuals (Left), IC (middle) or ID HIV-infected individuals (right) were cultured in the absence of any stimulus (basal autophagy) or in the presence of torin1 (2 μM) to assess autophagic response, and with torin1 plus chloroquine (50 μM) to assess the autophagic flux. Autophagy was visualized by LC3 staining (green) in CD4 stained cells (red). Nuclei were visualized by DAPI (blue). A representative sample is shown. (cont.)

(cont) (B) The levels of basal, torin1-induced autophagy and autophagic flux were determined in HIV-uninfected and infected individuals by counting the number of LC3 dots per cell. More than 100 CD4 T cells were counted by two investigators. Figure shows mean+/-SD and statistical comparison. (C) The levels of basal, torin1-induced autophagy and autophagic flux were determined in HIV-uninfected individuals and treated HIV-infected individuals subgrouped according to CD4 T-cell recovery as immunoconcordant (IC, CD4≥350 cells/μL) or immunodiscordant (ID, CD4<350 cells/μL). Figure shows mean+/-SD and statistical comparison. (D) Correlation between autophagic flux and several immune markers in IC and ID subgroups (green and red symbols and lines, respectively). Figure shows individual data and linear regression lines. P-values for correlation are shown in color-coded values in the upper right corner of each plot. (E) IC and ID individuals were classified according to HCV serostatus and the autophagic flux was analyzed for each group. Asterisks denote $*P < 0.05$, $**P < 0.01$ and $***P < 0.001$.

Discussion

Despite the importance of autophagy in uncontrolled HIV infection, little is known on its role when the VL is undetectable, i.e. in treated HIV-infected individuals. We hypothesized that in this scenario, proper autophagy responses might impact on immune recovery. Indeed, we observed that autophagy response is compromised in CD4 T cells from HIV-1-infected individuals, despite viral suppression, indicating that either repeated stimulation has led to autophagy exhaustion or HIV-1 has directly triggered a permanent state of resistance against autophagy induction. Strikingly, the capability of CD4 T cells to respond to an autophagy stimulus is mostly impaired in ID.

Our data highlight that autophagy is linked to different immunological characteristics in IC and ID. In IC, the percentage of naïve cells is inversely correlated to autophagy, suggesting that memory cells are major contributors to the autophagy response, as previously reported[14].

In addition, autophagy is positively correlated with CD4 T cell counts in IC, confirming the results obtained on the role of autophagy in PBMCs from non-progressor-infected individuals [7], and suggesting that this autophagy response is associated with higher immune recovery. Conversely, these relationships are broken in ID, which show higher CD4 T-cell activation, a skewed and less functional memory compartment, and increased CD4 T cell death [15] (Table 1). Despite this, we did not observe any correlation between autophagy and apoptosis nor between autophagy and activation of caspase-1 in the CD4 compartment (data not shown). It is worth noting that pyroptosis, cell death linked to activation of the inflammasome, and thus caspase-1 activation, was shown to be involved in the death of lymphoid CD4 T cells [16] but not in blood-derived

CD4 T cells [17] during HIV-1 infection. The interplay between autophagy and the cell death pathways is important but complex [18] and further investigation is needed on this point.

Finally, the autophagic flux is highly impaired in ID co-infected with HCV, whereas no difference was observed in IC co-infected with HCV. Interestingly, higher immune activation was found in individuals infected by these two viruses compared to HIV-mono-infected individuals [19], reinforcing the hypothesis that the defect in autophagy response may be responsible for a higher activation of CD4 T cells and consequent poor immune recovery. Autophagy also appears to have a major role in immunity and inflammation, although the mechanisms are not well understood. ATGs modulate both activation and inactivation of the innate immune signaling, and autophagy is shown to negatively control the inflammation process. Thus, the defect in the autophagic response is consistent with the systemic immune activation and the inflammation status in treated HIV-1-infected individuals. This process could be exacerbated in ID, where autophagy response of CD4 T cells is still more impaired and this may explain why ID present a high activation state [12]. However, further investigation on CD4 T-cell maturation, inflammation, HCV co-infection and the potential role of HAART composition is needed to evaluate the potential link between autophagy and all these parameters.

In conclusion, we demonstrated that autophagy is altered in CD4 T cells from treated HIV-1-infected individuals, and that this defect is more pronounced in ID. However, even in ID, CD4 T cells are still able to respond to an autophagy inducer, such as torin1. Although larger and deeper studies are needed, our data suggest that pharmacologic intervention to increase autophagy in CD4 T cells may benefit HIV-1-infected individuals, as already proposed for many diseases [20,21].

Acknowledgements

We are grateful to all individuals participating in the study. This work was supported by the CNRS (PICS N° 159836), the HIVACAT Program, the Spanish AIDS network 'Red Temática Cooperativa de Investigación en SIDA' (RD12/0017/0002) and the grant PI15/01053, to C.C. Grants RD12/0017/0002 and PI15/01053 are cofunded by the Spanish Instituto de Salud Carlos III and the European Fund for Regional Development

(FEDER). J.B. and C.C. are researchers from Fundació Institut de Recerca en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol supported by the Health Department of the Catalan Government (Generalitat de Catalunya).

References

1. Klionsky DJ, Abdelmohsen K, Abe A, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). Autophagy. 2016;12(1):1-222.
2. Denizot M, Varbanov M, Espert L, et al. HIV-1 gp41 fusogenic function triggers autophagy in uninfected cells. Autophagy. Nov 16 2008;4(8):998-1008.
3. Espert L, Denizot M, Grimaldi M, et al. Autophagy is involved in T cell death after binding of HIV-1 envelope proteins to CXCR4. J Clin Invest. Aug 2006;116(8):2161-2172.
4. Sagnier S, Daussy CF, Borel S, et al. Autophagy restricts HIV-1 infection by selectively degrading Tat in CD4+ T lymphocytes. J Virol. Jan 2015;89(1):615-625.
5. Borel S, Robert-Hebmann V, Alfaisal J, et al. HIV-1 viral infectivity factor interacts with microtubule-associated protein light chain 3 and inhibits autophagy. AIDS. Jan 28 2015;29(3):275-286.
6. Ryter SW, Mizumura K, Choi AM. The impact of autophagy on cell death modalities. International journal of cell biology. 2014;2014:502676.
7. Nardacci R, Amendola A, Ciccosanti F, et al. Autophagy plays an important role in the containment of HIV-1 in nonprogressor-infected patients. Autophagy. Apr 29 2014;10(7).
8. Engsig FN, Zangerle R, Katsarou O, et al. Long-term mortality in HIV-positive individuals virally suppressed for >3 years with incomplete CD4 recovery. Clin Infect Dis. May 2014;58(9):1312-1321.
9. Gaardbo JC, Hartling HJ, Gerstoft J, Nielsen SD. Incomplete immune recovery in HIV infection: mechanisms, relevance for clinical care, and possible solutions. Clinical & developmental immunology. 2012;2012:670957.
10. Massanella M, Negredo E, Clotet B, Blanco J. Immunodiscordant responses to HAART, mechanisms and consequences. Expert review of clinical immunology. Nov 2013;9(11):1135-1149.
11. Negredo E, Massanella M, Puig J, et al. Nadir CD4 T cell count as predictor and high CD4 T cell intrinsic apoptosis as final mechanism of poor CD4 T cell recovery in virologically suppressed HIV-infected patients: clinical implications. Clin Infect Dis. May 1 2010;50(9):1300-1308.
12. Massanella M, Negredo E, Perez-Alvarez N, et al. CD4 T-cell hyperactivation and susceptibility to cell death determine poor CD4 T-cell recovery during suppressive HAART. AIDS. Apr 24 2010;24(7):959-968.
13. Zar JH. Biostatistical analysis. Upper Saddle River, N.J.: Prentice-Hall College Div, 3rd edition; 1996.
14. Li C, Capan E, Zhao Y, et al. Autophagy is induced in CD4+ T cells and important for the growth factor-withdrawal cell death. J Immunol. Oct 15 2006;177(8):5163-5168.
15. Massanella M, Gomez-Mora E, Carrillo J, et al. Increased ex vivo cell death of central memory CD4 T cells in treated HIV infected individuals with unsatisfactory immune recovery. Journal of translational medicine. 2015;13:230.
16. Doitsh G, Galloway NL, Geng X, et al. Cell death by pyroptosis drives CD4 T-cell depletion in HIV-1 infection. Nature. Jan 23 2014;505(7484):509-514.
17. Munoz-Arias I, Doitsh G, Yang Z, Sowinski S, Ruelas D, Greene WC. Blood-Derived CD4 T Cells Naturally Resist Pyroptosis during Abortive HIV-1 Infection. Cell Host Microbe. Oct 14 2015;18(4):463-470.
18. Nikoletopoulou V, Markaki M, Palikaras K, Tavernarakis N. Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. Biochim Biophys Acta. Dec 2013;1833(12):3448-3459.
19. BenMarzouk-Hidalgo OJ, Torres-Cornejo A, Gutierrez-Valencia A, Ruiz-Valderas R, Viciana P, Lopez-Cortes LF. Higher Activation in CD4(+) T Cells But Similar Viral Control Among HIV/Hepatitis C Virus-Coinfected Patients on a Simplification Monotherapy. AIDS Res Hum Retroviruses. Jan 2016;32(1):6-11.
20. Rubinsztein DC, Codogno P, Levine B. Autophagy modulation as a potential therapeutic target for diverse diseases. Nat Rev Drug Discov. Sep 2012;11(9):709-730.
21. Shoji-Kawata S, Sumpter R, Leveno M, et al. Identification of a candidate therapeutic autophagy-inducing peptide. Nature. Jan 30 2013.

DISCUSSIÓ FINAL

La pobra recuperació de limfòcits T CD4 en individus immunodiscordants és probablement conseqüència d'un conjunt d'alteracions immunològiques d'origen multifactorial (Revisat a (129)). Els individus immunodiscordants presenten alteracions homeostàtiques, principalment al compartiment T CD4, amb un perfil de maduració alterat i caracteritzat per un descens de la freqüència de cèl·lules naïve i una acumulació de cèl·lules diferenciades (126,127,146). S'ha descrit, a més, un augment en el recanvi (*turnover*) de cèl·lules T CD4 associat a la resposta immunodiscordant, resultant en un increment de cèl·lules senescents ($CD28^{-}CD57^{+}$) (287–289) i exhaustes ($PD\text{-}1^{+}$) (290), la qual cosa indicaria que els canvis quantitatius associats al compartiment T CD4 anirien acompanyats d'alteracions qualitatives de la funció cel·lular.

La coinfecció pel CMV pot estar contribuint a la resposta immunodiscordant al tractament per la seva implicació en la hiperactivació del sistema immune (160,291). Malgrat això, la infecció pel CMV indueix altres alteracions immunes, tals com la reducció de la relació naïve/memòria de les cèl·lules T (Revisat a (237)) i una acumulació de cèl·lules senescents (87,212,241,242), efectes que podrien tenir també un paper important en la resposta immunodiscordant al tractament.

El procés d'immnnosenescència cel·lular, caracteritzat per la disminució de l'expressió de CD28 junt amb un augment de CD57 i el procés d'esgotament immunitari caracteritzat per l'expressió de PD-1, s'han associat amb una disminució de la longitud de telòmers i una pèrdua de funcionalitat definida per una capacitat proliferativa disminuïda, i una producció d'IL-2 pobra (292–294). D'acord amb això, en individus immunodiscordants s'ha observat una acumulació de cèl·lules T senescents o esgotades acompanyada d'una pobra capacitat proliferativa així com una disminució de la producció d'IL-2 (126,288,295). Però, malgrat que les cèl·lules senescents mostren una capacitat proliferativa reduïda, semblen estar dotades d'una capacitat citotòxica i producció de citocines major que cèl·lules amb un fenotip menys diferenciat (296,297). Per tant, el fet que les cèl·lules T presentin absència o presència de marcadors de superfície associats a senescència o esgotament cel·lular, no té perquè implicar una pèrdua directa de la funcionalitat. De fet, aquests marcadors podrien

representar un interruptor funcional que permetria passar d'un perfil altament proliferatiu/amb baixa capacitat citotòxica cap a un perfil de baixa capacitat proliferativa/altament citotòxic (294,298,299). És ben conegut que el bloqueig de PD-1 amb un anticòs específic pot restaurar la funcionalitat (mesurada com resposta de citocines) de cèl·lules PD-1$^+$, el que suggereix que l'esgotament immune és reversible (300).

Així doncs, per tal d'estudiar les implicacions d' una pobra recuperació immunològica en les taxes elevades de comorbiditats i mortalitat que s'observen en individus immunodiscordants (99,301–303) és important determinar no només les alteracions immunològiques a nivell fenotípic i quantitatiu sinó també aquelles que ens poden informar dels canvis en la diversitat funcional. Per aquest motiu, un dels objectius de la present tesi ha sigut avaluar la funcionalitat cel·lular en front un estímul policlonal així com la resposta virus-específica en un grup d'individus VIH$^+$ immunodiscordants i comparar-la amb aquells que presenten una resposta favorable al tractament (immunoconcordants) i amb un grup d'individus VIH-negatius.

Sorprenentment, després d'una estimulació policlonal amb PMA/ionomicina, en individus immunodiscordants no es va observar una reducció de la resposta polifuncional T CD4 o CD8 en comparació amb individus immunoconcordants o població no infectada pel VIH. Aquesta dada indica que, malgrat tenir un compartiment T CD4 reduït i amb un procés de maduració alterat, les cèl·lules T d'individus immunodiscordants mantenen la capacitat de respondre a un estímul potent i produir citocines (IFN-γ, IL-2 i TNF-α) amb una diversitat funcional conservada. Aquest manteniment de la resposta polifuncional d'individus immunodiscordants es reforça amb les dades obtingudes en l'anàlisi de la resposta VIH-específica, la qual es similar en individus immunoconcordants i immunodiscordants.

En quant a la resposta cel·lular a CMV, les nostres dades demostren diferències en individus immunodiscordants. D'acord amb estudis previs on s'ha descrit una resposta CMV-específica major en individus VIH$^+$ que en població no infectada pel VIH, i particularment en aquells que estan en TARGA (245,246), al present estudi hem observat una magnitud de la resposta a CMV, tant cel·lular com humoral, més elevada

en individus VIH$^+$ i sent encara major en individus immunodiscordants. Una resposta humoral CMV-específica elevada ha estat associada al procés d'envelliment (220), que també va acompanyat d'un descens en el recompte de cèl·lules T CD4 (87) i un augment de la resposta cel·lular T CMV-específica (213). L'expansió de cèl·lules T CMV-específiques és un procés conegut com *memory inflation*, i ha sigut altament descrit en cèl·lules T CD8 però també s'observa en cèl·lules T CD4 (216,304,305). L'increment de la resposta CMV-específica està impulsat per reactivacions repetides de CMV al llarg del temps, que poden expandir les cèl·lules CMV-específiques fins a representar un 20% del total del compartiment T CD8 (306–308). Es suggereix doncs que, de la mateixa forma que a la població d'edat avançada, la resposta CMV-específica incrementada que presenten els individus immunodiscordants seria el resultat d'un augment de la freqüència de reactivacions virals subclíniques. Degut a la gran compartimentació de la replicació de CMV, però, al nostre estudi no es va trobar presència de virus en orina o plasma en cap dels individus estudiats. Malgrat això, sí que es van identificar individus que presentaven simultàniament IgMs i IGs d'alta afinitat contra CMV, la qual cosa és indici de reactivació viral. Probablement aquests individus presentin reactivacions asimptomàtiques detectables en fluids del tracte genital, com s'ha descrit anteriorment (209,244).

La presència de reactivacions de CMV freqüents en individus immunodiscordants és molt rellevant. En primer lloc, s'ha descrit que les reactivacions de CMV promouen l'activació immunitària, la inflamació, l'alliberació de factors de creixement angiogènics i la hipercoagulabilitat (190), factors que podrien estar contribuint a elevar les taxes de morbiditat i mortalitat en aquests individus (309). En individus amb pobra recuperació immunològica, el tractament junt amb TARGA de valganciclovir, un agent amb potent activitat anti-CMV, condueix a una reducció significativa de l'activació del compartiment T CD8 però no té efectes en el recompte de cèl·lules T CD4 (160). Aquest estudi destaca l'associació entre la infecció per CMV amb hiperactivació immunitària però no amb el perfil de maduració de les cèl·lules T CD4 en individus immunodiscordants. Però malgrat això, les nostres dades apunten a a una correlació significativa entre el grau de diferenciació cel·lular i la magnitud de la resposta CD4 CMV-específica, en concordança amb estudis previs en població VIH-negativa (310), i

que aniria també d'acord amb l'associació descrita entre el nivell d'anticossos anti-CMV i el grau de diferenciació del compartiment T (311).
D'altra banda, en diferents cohorts, la magnitud de la resposta cel·lular CMV-específica s'ha associat també amb mortalitat elevada (87,161), així com la magnitud de la resposta humoral (nivells elevats d'IGgs anti-CMV) s'ha vinculat amb alteracions cardiovasculars, deteriorament de la funció física i altres causes de mortalitat (225,248,312–315). En conjunt, totes aquestes dades suggereixen que per tal prevenir els efectes de reactivacions recurrents de CMV en individus immunodiscordants, la intervenció hauria de tenir lloc de forma quasi immediata després de la infecció per CMV per tal d'evitar l'expansió de la resposta CMV-específica i totes les alteracions immunològiques que se'n deriven. Els tractaments actuals contra la infecció per CMV presenten encara una toxicitat elevada i per tant no poden ser administrats durant llargs períodes de temps. Així doncs, un tractament anti-CMV en individus immunodiscordants podria reduir les reactivacions persistents, col·laborant així a normalitzar els nivells d'activació immunitària, però nous estudis són encara necessaris per la recerca d'una teràpia anti-CMV menys tòxica i en combinació amb una intervenció que actuï també en la recuperació del compartiment T CD4.

Ens trobem, per tant, en un escenari on la resposta immunodiscordant pot estar marcada per reactivacions virals freqüents de CMV, que s'observa amb elevats títols d'IgGs, i que contribuiria en una resposta cel·lular CMV-específica incrementada, esbiaixant el procés de diferenciació i maduració del compartiment T cap a un fenotip efector. En aquest punt és important remarcar que l'alteració de la maduració de cèl·lules T no implica una pèrdua de la capacitat de produir IFN-γ, i això pot suggerir que les reactivacions no son conseqüència d'una manca de control immunitari sinó probablement de l'estat inflamatori dels individus immunodiscordants, generant-se així un cercle viciós entre inflamació i CMV. De tota manera, caldria, en estudis posteriors, determinar si la magnitud de la resposta CMV-especifica observada en individus immunodiscordants correlaciona amb una capacitat efectora i protectora real.

Malgrat que molts estudis s'han adreçat a l'estudi de l'apoptosi com a principal via de mort cel·lular implicada en la depleció del compartiment T CD4 en individus VIH-

positius, altres mecanismes de control de la mort cel·lular, com l'autofàgia, han estat poc analitzats. L'autofàgia representa un procés cel·lular altament involucrat en la supervivència i mort cel·lular, així com en la defensa innata i adaptativa contra el VIH. Per aquest motiu, diversos estudis han determinat *in vitro* la importància de l'autofàgia en la resposta immunològica i en la restricció de la infecció pel VIH en limfòcits T CD4 (282,283), però pràcticament no es coneix com actua el procés d'autofàgia quan la replicació viral del VIH està suprimida o com es modula *in vivo* el procés d'autofàgia en infecció pel VIH. L'autofàgia està altament implicada també en processos d'inflamació: mentre que nivells basals d'autofàgia es relacionen amb un paper anti-inflamatori, una disfunció de l'autofàgia s'ha relacionat amb diverses malalties inflamatòries (Revisat a (261)). Donat que la infecció pel VIH condueix a una depleció massiva de limfòcits T CD4 i una extensa inflamació, es suggereix que la resposta cel·lular T estaria afavorint la maquinària autofàgica per tal de disminuir aquest estat crònic inflamatori en individus VIH$^+$ (265). En estudis anteriors, a més, s'ha vinculat una resposta autofàgica incrementada amb nivells elevats d'activació que acceleren la degradació del contingut de l'autofagosoma (266,273).

En el present estudi s'ha demostrat una capacitat autofàgica disminuïda en cèl·lules T CD4 d'individus VIH$^+$ respecte la població VIH$^-$, sent encara menor en individus immunodiscordants. Aquesta disminució de la resposta autofàgica en el grup immunodiscordant va ser relacionada principalment amb elevats nivells d'activació associats a la coinfecció pel virus de l'hepatitis C (VHC). Aquesta observació estaria d'acord amb estudis previs, on la coinfecció amb el VHC ha estat associada amb elevats nivells d'immunoactivació i mort cel·lular (158,316). Per tant, l'activació persistent dels individus immunodiscordants, incrementada en presència de la coinfecció amb el VHC, sembla modular negativament el procés d'autofàgia, la qual cosa podria estar augmentant indirectament també els nivells de mort cel·lular. Un estudi recent ha determinat una resposta autofàgica major en individus controladors VIH$^+$ respecte els progressors estàndards (265), suggerint que en individus amb un bon control de la infecció i una recuperació immunològica favorable, el procés d'autofàgia es trobaria incrementat, disminuint així l'estat crònic inflamatori associat a la infecció per VIH. Per contra, podem hipotetitzar doncs, que una falta de control de la

infecció viral o alteracions en el compartiment T tals com la depleció de cèl·lules T CD4 podrien modular negativament l'autofàgia. Donada la profunda interconnexió entre autofàgia i inflamasoma (Revisat a (317)), en estudis futurs caldria analitzar amb detall el paper de l'autofàgia en processos inflamatoris tan altament vinculats a la resposta immunodiscordant així com l'associació amb la mort cel·lular inflamatòria anomenada piroptosi (318).

El procés d'autofàgia és vital també en el manteniment de les cèl·lules mare hematopoètiques (HSC), de les quals es desenvoluparà el llinatge de limfòcits T, incloent timòcits, cèl·lules naïve i memòria (Revisat a (267)). Així, l'autofàgia disminuïda observada en individus immunodiscordants podria estar reflectint una diferenciació tímica pertorbada que disminuiria la producció tímica, una de les característiques que millor defineixen la pobra recuperació immunològica (Revisat a (129)).

Així doncs, la disminució d'autofàgia en individus VIH-positius immunodiscordants, pot potencialment afavorir la inflamació, l'activació immunitària, disminuir la producció tímica i incrementar la "susceptibilitat" a l'apoptosi (entenent l'autofàgia com a mecanisme de supervivència). Per tant, el tractament amb inductors d'autofàgia podria ser una possible estratègia per disminuir els nivells d'activació immunitària i els processos de mort cel·lular i afavorir la recuperació de cèl·lules T CD4 en individus VIH-positius en TARGA. Aquesta estratègia podria afavorir també l'eliminació de possibles patògens intracel·lulars oportunistes, tals com TBC o toxoplasma que poden estar contribuint en l'estat d'hiperactivació immune. Definir aquestes estratègies requerirà un estudi més profund. De fet, una de les limitacions del nostre estudi és l'anàlisi del compartiment T CD8, ja que anteriorment s'ha descrit un efecte encara major del procés d'autofàgia en cèl·lules T CD8 que no pas CD4 (Revisat a (267)), podent per tant estar incrementant l'estat d'inflamació i activació immune dels individus immunodiscordants.

Resumint i posant en conjunt els resultats observats als tres capítols del present treball, la hiperactivació immunitària i la inflamació que acompanya la resposta immunodiscordant en individus VIH$^+$, junt a la coinfecció pel CMV podria estar

augmentat les reactivacions virals de CMV, i a l'hora, aquestes contribuirien en un augment de la resposta T CMV-específica (IFN- γ i IL-2) tant al compartiment T CD4 com T CD8. La major resposta, tant humoral com cel·lular, CMV-específica estaria implicada en alteracions de l'homeòstasi cel·lular, l'increment de l'estat inflamatori i la diferenciació cel·lular cap a fenotips efectors. Aquest fenotip, però, no presenta una menor funcionalitat en comparació amb individus amb una recuperació favorable del compartiment T CD4. L'elevada hiperactivació pot estar determinant una menor autofàgia i per tant en un increment d'inflamació i mort cel·lular així com en una menor producció tímica, agreujant així la maduració alterada del compartiment T i creant-se un cercle viciós entre activació i replicacions de CMV amb resposta cel·lular T incrementada i activació amb autofàgia (Figura 14).

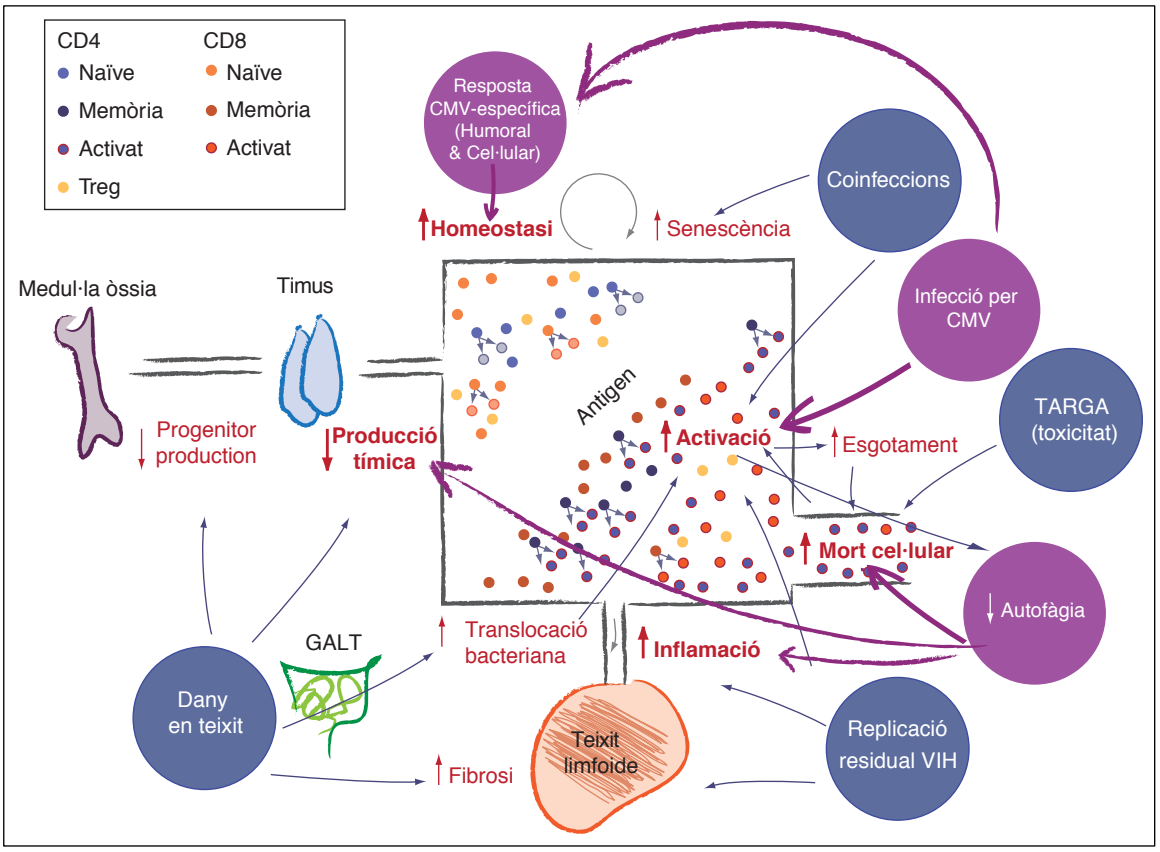

Figura 14. Mecanismes implicats en la resposta immunodiscordant. A les dinàmiques explicades i representades anteriorment (veure Figura 7) cal afegir altres mecanismes implicats: la infecció per CMV en individus immunodiscordants va acompanyada d'una elevada resposta humoral i cel·lular CMV-específica. La resposta humoral anti-CMV incrementada (elevats nivells d'IgGs) contribueix a l'estat d'hiperactivació immune en l'increment de la freqüència de cèl·lules T CMV-específiques. L'augment de cèl·lules T CD4 i CD8 destinades al control de la infecció per CMV comporta una alteració de l'homeòstasi cel·lular i una elevada diferenciació cap a cèl·lules terminalment diferenciades. L'augment de l'activació immune contribueix a més en una disminució autofàgica en individus immunodiscordants. La menor autofàgia observada en individus immunodiscordants participa en l'alteració del procés de maduració del compartiment T a través de la disminució de producció tímica així com en l'increment d'inflamació i mort cel·lular. Les possibles causes d'una resposta immune no favorable estan indicades en blau i lila, i els processos alterats en vermell. El número de cèl·lules representa la quantitat relativa de cada subpoblació de cèl·lules T. Adaptat de Massanella et al, 2013 (129).

CONCLUSIONS

Conclusions de l'objectiu 1. Analitzar la funció cel·lular del compartiment T en individus VIH⁺ virològicament suprimits immunoconcordants i immunodiscordants així com en individus VIH-negatius.

1.1. Després d'una estimulació policlonal, els individus VIH⁺ immunodiscordants presenten una polifuncionalitat de les cèl·lules T CD4 i CD8 no reduïda en comparació amb individus immunoconcordants i individus VIH⁻. Per tant, les alteracions homeostàtiques, la senescència i l'esgotament immunitari observats en aquests individus no estarien associats amb una funcionalitat cel·lular disminuïda.

1.2. Els individus immunodiscordants presenten una resposta CMV-específica (IFN-γ i IL-2) incrementada respecte individus immunoconcordants i població no infectada amb el VIH.

1.3. Els individus VIH⁺ immunodiscordants presenten una resposta VIH-específica comparable als individus immunoconcordants.

1.4. Totes les subpoblacions memòria del compartiment T CD4 d'individus immunodiscordants són funcionals i capaces de produir IFN-γ i IL-2 després d'una estimulació amb CMV, observant-se freqüències més elevades en comparació amb individus immunoconcordants i individus no infectats amb el VIH.

1.5. El grau de diferenciació de les subpoblacions T CD4 dels individus immunodiscordants correlaciona amb la magnitud de la resposta CMV-específica, suggerint que la infecció pel CMV podria participar en el perfil de maduració alterat del compartiment T observat en aquests individus.

Conclusions de l'objectiu 2. Avaluar l'associació entre la resposta humoral anti-CMV i la pobra recuperació immunològica en individus VIH⁺ immunodiscordants.

2.1. Els individus VIH⁺ presenten nivells incrementats d'anticossos IgGs anti-CMV respecte la població VIH⁻, sent encara més elevats en individus immunodiscordants.

2.2. En un estudi longitudinal, la distribució de mostres IgM$^+$ no va ser homogènia entre els diferents grups estudiats. La major presència de mostres IgM$^+$ en individus immunodiscordants suggereix un major nombre de reactivacions de CMV en aquest grup.

2.3. Els nivells d'IgGs CMV-especifiques es correlaciona inversament amb el recompte nadir de CD4 i positivament amb marcadors d'inflamació, activació i mort cel·lular. Per tant, les freqüents reactivacions virals de CMV en individus immunodiscordants podrien estar implicades en la morbiditat i mortalitat incrementada observades en aquests individus amb pobra recuperació immunològica.

Conclusions de l'objectiu 3. Estudiar la implicació del procés d'autofàgia en la pobra recuperació immunològica d'individus VIH$^+$ immnunodiscordants.

3.1. Els individus immunodiscordants presenten una resposta autofàgica de les cèl·lules T CD4 disminuïda en comparació amb individus immnunoconcordants i no infectats pel VIH.

3.2. En individus immunoconcordants, la resposta autofàgica s'associa positivament amb el número de cèl·lules T CD4, però aquesta correlació és absent en individus immunodiscordants.

3.3. En individus immunodiscordants, la resposta autofàgica es correlaciona inversament amb els nivells plasmàtics de CD14 soluble, marcador d'activació i inflamació.

3.4. El flux autofàgic es troba significativament alterat en individus immunodiscordants coinfectats amb el VHC, suggerint que factors addicionals poden alterar el procés d'autofàgia.

PUBLICACIONS

Treballs acceptats i publicats

1. Massanella M, Curriu M, Carrillo J, **Gómez E**, Puig J, Navarro J, Dalmau J, Martínez-Picado J, Crespo M, Cabrera C, Negredo E, Clotet B, Blanco J. *Assessing main death pathways in T lymphocytes from HIV infected individuals.* Cytometry A. 2013 Jul;83(7):648-58.

2. Massanella M, **Gómez-Mora E**, Carrillo J, Curriu M, Ouchi D, Puig J, Negredo E, Cabrera C, Clotet B, Blanco J. *Increased ex vivo cell death of central memory CD4 T cells in treated HIV infected individuals with unsatisfactory immune recovery.* J Transl Med. 2015 Jul 17;13:230.

3. Coll J, Moltó J, Boix J, **Gómez-Mora E**, Else L, García E, Paredes R, Ouchi D, Carrillo A, Escrig R, Back D, Clotet B, Cabrera C. *Single oral dose of maraviroc does not prevent ex-vivo HIV infection of rectal mucosa in HIV-1 negative human volunteers.* AIDS. 2015 Oct 23;29(16):2149-54.

4. Morón-López S, **Gómez-Mora E**, Salgado M, Ouchi D, Puertas MC, Urrea V, Navarro J, Jou A, Pérez M, Tural C, Clotet B, Montaner LJ, Blanco J, Crespo M, Martinez-Picado J. *Short-term Treatment With Interferon Alfa Diminishes Expression of HIV-1 and Reduces CD4+ T-Cell Activation in Patients Coinfected With HIV and Hepatitis C Virus and Receiving Antiretroviral Therapy.* J Infect Dis. 2016 Mar 15;213(6):1008-12.

5. **Gómez-Mora E***, Robert-Hebmann V*, García E, Massanella M, Clotet B, Cabrera C, Blanco J, Biard-Piechaczyk M. *Brief Report: Impaired CD4 T-Cell Response to Autophagy in Treated HIV-1-Infected Individuals.* J Acquir Immune Defic Syndr. 2017 Feb 1;74(2):201-205.

6. Echeverría P*, **Gómez-Mora E***, Roura S*, Bonjoch A, Puig J, Pérez-Alvarez N, Bayés-Genís A, Clotet B, Blanco J, Negredo E. *Variable endothelial cell function restoration after initiation of two antiretroviral regimens in HIV-infected individuals.* J Antimicrob Chemother. 2017 Mar 22.

* Indica que els autors han contribuït igual al treball publicat.

Treballs submisos a ser publicats

1. Bonjoch A, Blanco J, Puig J, Pérez-Álvarez N, **Gómez-Mora E**, Cabrera C, Massanella M, Echeverría P, Clotet B, Negredo E. *Impact of Age and Discordant*

Phenotype on Immune Activation Markers in Antiretroviral-Treated HIV-Infected Subjects. BioMed Research International Sumbitted.

2. **Gómez-Mora E**, Massanella M, García E, Giles D, Bernadó M, Urrea V, Ouchi D, Puig J, Negredo E, Clotet B, Blanco J, Cabrera C. *Elevated Humoral Response to Cytomegalovirus in HIV-infected individuals with Poor CD4 Immune Recovery*. PlosOne Submitted

3. **Gómez-Mora E** , García E, Urrea V, Massanella M, Puig J, Negredo E, Clotet B, Blanco J, Cabrera C. *Preserved immune functionality with high CMV- and HIV-specific T cell responses in HIV-infected individuals with poor CD4 immune recovery*. Scientific Reports Submitted

BIBLIOGRAFIA

1. Murphy K. Janeway's Immunobiology. 8th ed. 2011.
2. Medzhitov R, Janeway C, Medzhitov R, Janeway C. Innate immunity. N Engl J Med. 2000 Aug 3;343(5):338–44.
3. Abul K. Abbas AHHL and SP. Cellular and Molecular Immunology. 8th ed.
4. Pillai S, Cariappa A, Moran ST. Positive selection and lineage commitment during peripheral B-lymphocyte development. Immunol Rev. 2004 Feb;197:206–18.
5. Julius MH, Janeway CA, Herzenberg LA. Isolation of antigen-binding cells from unprimed mice. II. Evidence for monospecificity of antigen-binding cells. Eur J Immunol. 1976 Apr;6(4):288–92.
6. Mahnke YD, Brodie TM, Sallusto F, Roederer M, Lugli E. The who's who of T-cell differentiation: Human memory T-cell subsets. Eur J Immunol. 2013;43(11):2797–809.
7. Sallusto F, Geginat J, Lanzavecchia A. Central memory and effector memory T cell subsets: Function, Generation, and Maintenance. Annu Rev Immunol. 2004;22:745–63.
8. Federica Sallusto, Danielle Lenig, Reinhold Förster ML& AL. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and eff...: EBSCOhost [Internet]. Nature. 1999 [cited 2017 Apr 25]. Available from: http://web.b.ebscohost.com.are.uab.cat/ehost/pdfviewer/pdfviewer?sid=4930b8dd-39b6-481d-b3d9-efcbba244c88%40sessionmgr103&vid=0&hid=124
9. Ellefsen K, Harari A, Champagne P, Bart P-A, S﹀kaly R-P, Pantaleo G. Distribution and functional analysis of memory antiviral CD8 T cell responses in HIV-1 and cytomegalovirus infections. Eur J Immunol. WILEY-VCH Verlag; 2002 Dec;32(12):3756–64.
10. Champagne P, Ogg GS, King AS, Knabenhans C, Ellefsen K, Nobile M, et al. Skewed maturation of memory HIV-speci®c CD8 T lymphocytes. Lett to Nat. 2001;410:106–11.
11. Pircher Heike Unsoeld H, Krautwald S, Voehringer D, Unsoeld H, Kunzendorf U, Pircher H. Cutting Edge: CCR7 ⁄ and CCR7 ⁄ Memory T Cells Do Not Differ in Immediate Effector Cell Function 1. J Immunol. 2002;169:638–41.
12. Stemberger C, Neuenhahn M, Buchholz VR, Busch DH. Origin of CD8+ effector and memory T cell subsets. Cell Mol Immunol. 2007 Dec;4(6):399–405.
13. Berard M, Tough DF. Qualitative differences between naïve and memory T cells. Immunology. 2002 Jun;106(2):127–38.
14. Appay V, van Lier RA, Sallusto F, Roederer M. Phenotype and function of human T lymphocyte subsets: consensus and issues. Cytom A. 2008/09/12. 2008;73(11):975–83.
15. Betts MR, Nason MC, West SM, De Rosa SC, Migueles SA, Abraham J, et al. HIV nonprogressors preferentially maintain highly functional HIV-specific CD8+ T cells. Blood. American Society of Hematology; 2006 Jun 15;107(12):4781–9.
16. Darrah PA, Patel DT, De Luca PM, Lindsay RWB, Davey DF, Flynn BJ, et al. Multifunctional TH1 cells define a correlate of vaccine-mediated protection against Leishmania major. Nat Med. 2007 Jul 10;13(7):843–50.
17. Duvall MG, Precopio ML, Ambrozak DA, Jaye A, McMichael AJ, Whittle HC, et al. Polyfunctional T cell responses are a hallmark of HIV-2 infection. Eur J Immunol. 2008 Feb;38(2):350–63.
18. Almeida JR, Sauce D, Price DA, Papagno L, Shin SY, Moris A, et al. Antigen sensitivity is a major determinant of CD8+ T-cell polyfunctionality and HIV-suppressive activity. Blood. American Society of Hematology; 2009 Jun 18;113(25):6351–60.
19. Gattinoni L, Restifo NP. Moving T memory stem cells to the clinic. Blood. 2013;121(4).
20. Barré-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). Science. 1983 May 20;220(4599):868–71.
21. Popovic M, Sarngadharan MG, Read E, Gallo RC. Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. Science (80-). 1984 May 4;224(4648):497–500.
22. Levy JA, Hoffman AD, Kramer SM, Landis JA, Shimabukuro JM, Oshiro LS. Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San Francisco patients with AIDS. Science (80-). 1984 Aug 24;225(4664):840–2.
23. Kallings LO. The first postmodern pandemic: 25 years of HIV/ AIDS. J Intern Med. 2008 Mar;263(3):218–43.
24. Clavel F, Guétard D, Brun-Vézinet F, Chamaret S, Rey MA, Santos-Ferreira MO, et al. Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. Science. 1986 Jul 18;233(4761):343–6.

25. Sharp PM, Hahn BH. Origins of HIV and the AIDS Pandemic. CSH Perspect. 2011;1.
26. UNAIDS. AIDS Update 2016. 2016.
27. Chertova E, Bess JW, Crise BJ, Sowder II RC, Schaden TM, Hilburn JM, et al. Envelope glycoprotein incorporation, not shedding of surface envelope glycoprotein (gp120/SU), Is the primary determinant of SU content of purified human immunodeficiency virus type 1 and simian immunodeficiency virus. J Virol. 2002 Jun;76(11):5315–25.
28. Zhu P, Liu J, Bess J, Chertova E, Lifson JD, Grisé H, et al. Distribution and three-dimensional structure of AIDS virus envelope spikes. Nature. 2006 Jun 15;441(7095):847–52.
29. Greene WC, Peterlin BM. Charting HIV's remarkable voyage through the cell: Basic science as a passport to future therapy. Nat Med. 2002 Jul;8(7):673–80.
30. Letvin NL, Walker BD. Immunopathogenesis and immunotherapy in AIDS virus infections. Nat Med. 2003 Jul;9(7):861–6.
31. Berger EA, Murphy PM, Farber JM. Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. Annu Rev Immunol. 1999 Apr;17(1):657–700.
32. Blanco J, Jacotot E, Cabrera C, Cardona A, Clotet B, De Clercq E, et al. The implication of the chemokine receptor CXCR4 in HIV-1 envelope protein-induced apoptosis is independent of the G protein-mediated signalling. AIDS. 1999 May 28;13(8):909–17.
33. Levy JA. HIV and the Pathogenesis of AIDS. 3rd Editio. Wiley; 2007.
34. Simon V, Ho DD, Abdool Karim Q. HIV/AIDS epidemiology, pathogenesis, prevention, and treatment. Lancet. 2006;368(9534):489–504.
35. Mehandru S, Poles MA, Tenner-Racz K, Horowitz A, Hurley A, Hogan C, et al. Primary HIV-1 infection is associated with preferential depletion of CD4+ T lymphocytes from effector sites in the gastrointestinal tract. J Exp Med. 2004 Sep 20;200(6):761–70.
36. Brenchley JM, Schacker TW, Ruff LE, Price DA, Taylor JH, Beilman GJ, et al. CD4+ T cell depletion during all stages of HIV disease occurs predominantly in the gastrointestinal tract. J Exp Med. 2004 Sep 20;200(6):749–59.
37. Mattapallil JJ, Douek DC, Hill B, Nishimura Y, Martin M, Roederer M. Massive infection and loss of memory CD4+ T cells in multiple tissues during acute SIV infection. Nature. 2005 Apr 28;434(7037):1093–7.
38. Haase AT. Targeting early infection to prevent HIV-1 mucosal transmission. Nature. 2010 Mar 11;464(7286):217–23.
39. Hladik F, Doncel GF. Preventing mucosal HIV transmission with topical microbicides: challenges and opportunities. Antiviral Res. 2010 Dec;88 Suppl 1:S3-9.
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 May 27;105(21):7552–7.
41. McMichael AJ, Rowland-Jones SL. Cellular immune responses to HIV. Nature. 2001 Apr 19;410(6831):980–7.
42. Mellors JW, Rinaldo CR, Gupta P, White RM, Todd JA, Kingsley LA. Prognosis in HIV-1 infection predicted by the quantity of virus in plasma. Science. 1996 May 24;272(5265):1167–70.
43. Haase AT, Henry K, Zupancic M, Sedgewick G, Faust RA, Melroe H, et al. Quantitative image analysis of HIV-1 infection in lymphoid tissue. Science (80-). 1996 Nov 8;274(5289):985–9.
44. ZVI GROSSMAN, MARTIN MEIER-SCHELLERSHEIM, ANA E. SOUSA, RUI M.M. VICTORINO & WILLIAM E. PAUL. CD4+ T-cell depletion in HIV infection: Are we closer to understanding the cause? Nat Med. 2002;8(4).
45. Grossman Z, Meier-Schellersheim M, Paul WE, Picker LJ. Pathogenesis of HIV infection: what the virus spares is as important as what it destroys. Nat Med. 2006;12(3).
46. Gazzola L, Tincati C, Bellistri GM, Monforte A, Marchetti G. The absence of CD4+ T cell count recovery despite receipt of virologically suppressive highly active antiretroviral therapy: clinical risk, immunological gaps, and therapeutic options. Clin Infect Dis. 2009/01/07. 2009;48(3):328–37.
47. Fauci AS. The human immunodeficiency virus: infectivity and mechanisms of pathogenesis. Science (80-). 1988 Feb 5;239(4840):617–22.
48. Schacker T, Little S, Connick E, Gebhard K, Zhang Z, Krieger J, et al. Productive Infection of T Cells in Lymphoid Tissues during Primary and Early Human Immunodeficiency Virus Infection. J Infect Dis. 2001 Feb 15;183(4):555–62.
49. Pantaleo G, Graziosi C, Fauci AS. Virologic and immunologic events in primary HIV infection. Springer Semin Immunopathol. 1997;18(3):257–66.
50. Blanco J, Barretina J, Ferri KF, Jacotot E, Gutiérrez A, Armand-Ugón M, et al. Cell-surface-

expressed HIV-1 envelope induces the death of CD4 T cells during GP41-mediated hemifusion-like events. Virology. 2003 Jan 20;305(2):318–29.
51. Banda NK, Simon GR, Sipple JD, Terrell KL, Archer P, Shpall EJ, et al. Depletion of CD34+ CD4+ cells in bone marrow from HIV-1-infected individuals. Biol Blood Marrow Transplant. 1999 Jun;5(3):162–72.
52. Kawakami K, Scheidereit C, Roeder RG. Identification and purification of a human immunoglobulin-enhancer-binding protein (NF-kappa B) that activates transcription from a human immunodeficiency virus type 1 promoter in vitro. Proc Natl Acad Sci U S A. 1988 Jul;85(13):4700–4.
53. Alexaki A, Wigdahl B. HIV-1 infection of bone marrow hematopoietic progenitor cells and their role in trafficking and viral dissemination. PLoS Pathog. Public Library of Science; 2008 Dec;4(12):e1000215.
54. Simon V, Ho DD, Karim QA. Seminar HIV / AIDS epidemiology , pathogenesis , prevention , and treatment. Lancet. 2006;368:489–504.
55. Guihot A, Bourgarit A, Carcelain G, Autran B. Immune reconstitution after a decade of combined antiretroviral therapies for human immunodeficiency virus. Trends Immunol. 2010;32:131–7.
56. Dion M-L, Poulin J-F, Bordi R, Sylvestre M, Corsini R, Kettaf N, et al. HIV infection rapidly induces and maintains a substantial suppression of thymocyte proliferation. Immunity. 2004 Dec;21(6):757–68.
57. Haynes, Hale, Weinhold, Patel, Liao, Bressler, et al. Analysis of the adult thymus in reconstitution of T lymphocytes in HIV-1 infection. J Clin Invest. 1999 Mar 15;103(6):921.
58. Beq S, Delfraissy J-F, Theze J. Interleukin-7 (IL-7): immune function, involvement in the pathogenesis of HIV infection and therapeutic potential. Eur Cytokine Netw. 15(4):279–89.
59. Schluns KS, Kieper WC, Jameson SC, Lefrançois L. Interleukin-7 mediates the homeostasis of naïve and memory CD8 T cells in vivo. Nat Immunol. 2000 Nov 1;1(5):426–32.
60. Llano A, Barretina J, Gutiérrez A, Blanco J, Cabrera C, Clotet B, et al. Interleukin-7 in plasma correlates with CD4 T-cell depletion and may be associated with emergence of syncytium-inducing variants in human immunodeficiency virus type 1-positive individuals. J Virol. 2001 Nov 1;75(21):10319–25.
61. Rethi B, Fluur C, Atlas A, Krzyzowska M, Mowafi F, Grützmeier S, et al. Loss of IL-7Ralpha is associated with CD4 T-cell depletion, high interleukin-7 levels and CD28 down-regulation in HIV infected patients. AIDS. 2005 Dec 2;19(18):2077–86.
62. Sasson SC, Zaunders JJ, Zanetti G, King EM, Merlin KM, Smith DE, et al. Increased plasma interleukin-7 level correlates with decreased CD127 and Increased CD132 extracellular expression on T cell subsets in patients with HIV-1 infection. J Infect Dis. 2006 Feb 15;193(4):505–14.
63. Koesters SA, Alimonti JB, Wachihi C, Matu L, Anzala O, Kimani J, et al. IL-7Ralpha expression on CD4+ T lymphocytes decreases with HIV disease progression and inversely correlates with immune activation. Eur J Immunol. 2006 Feb;36(2):336–44.
64. Leone A, Picker LJ SD. IL-2, IL-7 and IL-15 as immuno-modulators during SIV/HIV vaccination and treatment. Curr HIV Res. 2009;7(1):83–90.
65. Sirskyj D, Thèze J, Kumar A, Kryworuchko M. Disruption of the γc cytokine network in T cells during HIV infection. Cytokine. 2008 Jul;43(1):1–14.
66. Fauci AS. Host factors and the pathogenesis of HIV-induced disease. Nature. 1996 Dec 12;384(6609):529–34.
67. Pantaleo G, Fauci AS. Immunopathogenesis of HIV infection. Annu Rev Microbiol. 1996 Oct;50(1):825–54.
68. Schacker TW, Nguyen PL, Beilman GJ, Wolinsky S, Larson M, Reilly C, et al. Collagen deposition in HIV-1 infected lymphatic tissues and T cell homeostasis. J Clin Invest. 2002 Oct 15;110(8):1133–9.
69. Schacker TW, Brenchley JM, Beilman GJ, Reilly C, Pambuccian SE, Taylor J, et al. Lymphatic Tissue Fibrosis Is Associated with Reduced Numbers of Naive CD4+ T Cells in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection. Clin Vaccine Immunol. 2006 May 1;13(5):556–60.
70. Estes JD. Pathobiology of HIV/SIV-associated changes in secondary lymphoid tissues. Immunol Rev. 2013 Jul;254(1):65–77.
71. Blanco J, Barretina J, Clotet B, Esté JA. R5 HIV gp120-mediated cellular contacts induce the death of single CCR5-expressing CD4 T cells by a gp41-dependent mechanism. J Leukoc Biol. 2004 Oct 7;76(4):804–11.
72. McCune JM. The dynamics of CD4+ T-cell depletion in HIV disease. Nature. 2001 Apr

19;410(6831):974–9.
73. Gougeon ML, Lecoeur H, Dulioust A, Enouf MG, Crouvoiser M, Goujard C, et al. Programmed cell death in peripheral lymphocytes from HIV-infected persons: increased susceptibility to apoptosis of CD4 and CD8 T cells correlates with lymphocyte activation and with disease progression. J Immunol. 1996 May 1;156(9):3509–20.
74. Badley AD, Pilon AA, Landay A, Lynch DH. Mechanisms of HIV-associated lymphocyte apoptosis. Blood. 2000 Nov 1;96(9):2951–64.
75. Doitsh G, Cavrois M, Lassen KG, Zepeda O, Yang Z, Santiago ML, et al. Abortive HIV infection mediates CD4 T cell depletion and inflammation in human lymphoid tissue. Cell. 2010 Nov 24;143(5):789–801.
76. Doitsh G, Galloway NLK, Geng X, Yang Z, Monroe KM, Zepeda O, et al. Cell death by pyroptosis drives CD4 T-cell depletion in HIV-1 infection. Nature. 2014 Jan 23;505(7484):509–14.
77. Ascher MS, Sheppard HW. AIDS as immune system activation: a model for pathogenesis. Clin Exp Immunol. 1988 Aug;73(2):165–7.
78. Fan J, Bass HZ, Fahey JL, Fan J, Bass HZ, Fahey2 J 1. Elevated IFN-gamma and decreased IL-2 gene Elevated IFN-y and Decreased 11-2 Gene Expression Are Associated with HIV Infection'. J Immunol J Immunol Univ Auton Barcelona December. 1993;151(9):5031–40.
79. Liu Z, Cumberland WG, Hultin LE, Kaplan AH, Detels R, Giorgi J V. CD8+ T-lymphocyte activation in HIV-1 disease reflects an aspect of pathogenesis distinct from viral burden and immunodeficiency. J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol. 1998 Aug 1;18(4):332–40.
80. Appay V, Sauce D. Immune activation and inflammation in HIV-1 infection: causes and consequences. J Pathol. 2007/12/29. 2008;214(2):231–41.
81. Liu Z, Cumberland WG, Hultin LE, Prince HE, Detels R, Giorgi J V. Elevated CD38 antigen expression on CD8+ T cells is a stronger marker for the risk of chronic HIV disease progression to AIDS and death in the Multicenter AIDS Cohort Study than CD4+ cell count, soluble immune activation markers, or combinations of HLA-DR and CD38 expression. J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol. 1997 Oct 1;16(2):83–92.
82. Giorgi J V, Liu Z, Hultin LE, Cumberland WG, Hennessey K, Detels R. Elevated levels of CD38+ CD8+ T cells in HIV infection add to the prognostic value of low CD4+ T cell levels: results of 6 years of follow-up. The Los Angeles Center, Multicenter AIDS Cohort Study. J Acquir Immune Defic Syndr. 1993 Aug;6(8):904–12.
83. Mocroft A, Bofill M, Lipman M, Medina E, Borthwick N, Timms A, et al. CD8+,CD38+ lymphocyte percent: a useful immunological marker for monitoring HIV-1-infected patients. J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol. 1997 Feb 1;14(2):158–62.
84. Gascon RL, Narváez AB, Zhang R, Kahn JO, Hecht FM, Herndier BG, et al. Increased HLA-DR expression on peripheral blood monocytes in subsets of subjects with primary HIV infection is associated with elevated CD4 T-cell apoptosis and CD4 T-cell depletion. J Acquir Immune Defic Syndr. 2002 Jun 1;30(2):146–53.
85. Estes JD, Gordon SN, Zeng M, Chahroudi AM, Dunham RM, Staprans SI, et al. Early resolution of acute immune activation and induction of PD-1 in SIV-infected sooty mangabeys distinguishes nonpathogenic from pathogenic infection in rhesus macaques. J Immunol. 2008 May 15;180(10):6798–807.
86. Papagno L, Spina CA, Marchant A, Salio M, Rufer N, Little S, et al. Immune activation and CD8+ T-cell differentiation towards senescence in HIV-1 infection. PLoS Biol. 2004/02/18. 2004;2(2):E20.
87. Appay V, Fastenackels S, Katlama C, Ait-Mohand H, Schneider L, Guihot A, et al. Old age and anti-cytomegalovirus immunity are associated with altered T-cell reconstitution in HIV-1-infected patients. AIDS. 2011/03/18. 2011;25(15):1813–22.
88. Pawelec G, Barnett Y, Forsey R, Frasca D, Globerson A, McLeod J, et al. T cells and aging. Front Biosci. 2002 May 1;7:d1056-183.
89. Day CL, Kaufmann DE, Kiepiela P, Brown JA, Moodley ES, Reddy S, et al. PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. Nature. 2006 Sep 21;443(7109):350–4.
90. Goronzy JJ, Weyand CM. Understanding immunosenescence to improve responses to vaccines. Nat Immunol. 2013 May 18;14(5):428–36.
91. Miller RA. The aging immune system: primer and prospectus. Science (80-). 1996 Jul 5;273(5271):70–4.
92. Arts EJ, Hazuda DJ. HIV-1 antiretroviral drug therapy. Cold Spring Harb Perspect Med. 2012 Apr

1;2(4):a007161.
93. Volberding PA, Deeks SG. Antiretroviral therapy and management of HIV infection. Lancet. 2010 Jul 3;376(9734):49–62.
94. Guihot A, Tubiana R, Breton G, Marcelin A-G, Samri A, Assoumou L, et al. Immune and virological benefits of 10 years of permanent viral control with antiretroviral therapy. AIDS. 2010 Feb 20;24(4):614–7.
95. Autran B, Carcelain G, Li TS, Blanc C, Mathez D, Tubiana R, et al. Positive effects of combined antiretroviral therapy on CD4+ T cell homeostasis and function in advanced HIV disease. Science. 1997 Jul 4;277(5322):112–6.
96. Bofill M, Mocroft A, Lipman M, Medina E, Borthwick NJ, Sabin CA, et al. Increased numbers of primed activated CD8+CD38+CD45RO+ T cells predict the decline of CD4+ T cells in HIV-1-infected patients. AIDS. 1996 Jul;10(8):827–34.
97. Mocroft A, Phillips AN, Gatell J, Ledergerber B, Fisher M, Clumeck N, et al. Normalisation of CD4 counts in patients with HIV-1 infection and maximum virological suppression who are taking combination antiretroviral therapy: an observational cohort study. Lancet (London, England). 2007 Aug 4;370(9585):407–13.
98. Piketty C, Castiel P, Belec L, Batisse D, Si Mohamed A, Gilquin J, et al. Discrepant responses to triple combination antiretroviral therapy in advanced HIV disease. AIDS. 1998/06/10. 1998;12(7):745–50.
99. Pacheco YM, Jarrín I, Del Amo J, Moreno S, Iribarren JA, Viciana P, et al. Risk factors, CD4 long-term evolution and mortality of HIV-infected patients who persistently maintain low CD4 counts, despite virological response to HAART. Curr HIV Res. 2009 Nov;7(6):612–9.
100. Nadine G. Pakker, Daan W. Notermans, Rob J. de Boer, Marijke T.L Roos, Frank de Wolf, Andrew Hill, John M. Leonard, Sven A. Danner, Frank Miedema PT. S. Biphasic kinetics of peripheral blood T cells after triple combination therapy in HIV-1 infection: A composite of redistribution and proliferation. Nat Med. 1998;4(2):208–14.
101. Corbeau P, Reynes J. Immune reconstitution under antiretroviral therapy: the new challenge in HIV-1 infection. Blood. 2011;117(21).
102. Miller V, Mocroft A, Reiss P, Katlama C, Papadopoulos AI, Katzenstein T, et al. Relations among CD4 lymphocyte count nadir, antiretroviral therapy, and HIV-1 disease progression: results from the EuroSIDA study. Ann Intern Med. 1999 Apr 6;130(7):570–7.
103. Riou C, Tanko RF, Soares AP, Masson L, Werner L, Garrett NJ, et al. Restoration of CD4+ responses to co-pathogens in HIV-infected individuals on antiretroviral therapy is dependent on T cell memory phenotype HHS Public Access. J Immunol J Immunol. 2015;195(5).
104. Puissant-Lubrano B, Combadière B, Duffy D, Wincker N, Frachette M-J, Ait-Mohand H, et al. Influence of antigen exposure on the loss of long-term memory to childhood vaccines in HIV-infected patients. Vaccine. 2009 Jun 2;27(27):3576–83.
105. Dalod M, Harzic M, Pellegrin I, Dumon B, Hoen B, Sereni D, et al. Evolution of cytotoxic T lymphocyte responses to human immunodeficiency virus type 1 in patients with symptomatic primary infection receiving antiretroviral triple therapy. J Infect Dis. 1998 Jul;178(1):61–9.
106. Kalams SA, Goulder PJ, Shea AK, Jones NG, Trocha AK, Ogg GS, et al. Levels of human immunodeficiency virus type 1-specific cytotoxic T-lymphocyte effector and memory responses decline after suppression of viremia with highly active antiretroviral therapy. J Virol. 1999 Aug;73(8):6721–8.
107. Ogg GS, Jin X, Bonhoeffer S, Moss P, Nowak MA, Monard S, et al. Decay kinetics of human immunodeficiency virus-specific effector cytotoxic T lymphocytes after combination antiretroviral therapy. J Virol. 1999 Jan;73(1):797–800.
108. Morris L, Binley JM, Clas BA, Bonhoeffer S, Astill TP, Kost R, et al. HIV-1 antigen-specific and -nonspecific B cell responses are sensitive to combination antiretroviral therapy. J Exp Med. 1998 Jul 20;188(2):233–45.
109. Rosenberg ES, Altfeld M, Poon SH, Phillips MN, Wilkes BM, Eldridge RL, et al. Immune control of HIV-1 after early treatment of acute infection. Nature. 2000 Sep 28;407(6803):523–6.
110. Lange CG, Xu Z, Patterson BK, Medvik K, Harnisch B, Asaad R, et al. Proliferation responses to HIVp24 during antiretroviral therapy do not reflect improved immune phenotype or function. AIDS. 2004 Mar 5;18(4):605–13.
111. Pontesilli O, Kerkhof-Garde S, Notermans DW, Foudraine NA, Roos MT, Klein MR, et al. Functional T cell reconstitution and human immunodeficiency virus-1-specific cell-mediated immunity during highly active antiretroviral therapy. J Infect Dis. 1999 Jul;180(1):76–86.

112. Rinaldo CR, Liebmann JM, Huang XL, Fan Z, Al-Shboul Q, McMahon DK, et al. Prolonged suppression of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) viremia in persons with advanced disease results in enhancement of CD4 T cell reactivity to microbial antigens but not to HIV-1 antigens. J Infect Dis. 1999 Feb;179(2):329–36.
113. McNeil AC, Shupert WL, Iyasere CA, Hallahan CW, Mican JA, Davey RT, et al. High-level HIV-1 viremia suppresses viral antigen-specific CD4(+) T cell proliferation. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 Nov 20;98(24):13878–83.
114. Blankson JN, Gallant JE, Siliciano RF. Proliferative responses to human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) antigens in HIV-1-infected patients with immune reconstitution. J Infect Dis. 2001 Feb 15;183(4):657–61.
115. Palmer BE, Boritz E, Blyveis N, Wilson CC. Discordance between frequency of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-specific gamma interferon-producing CD4(+) T cells and HIV-1-specific lymphoproliferation in HIV-1-infected subjects with active viral replication. J Virol. 2002 Jun;76(12):5925–36.
116. Iyasere C, Tilton JC, Johnson AJ, Younes S, Yassine-Diab B, Sekaly R-P, et al. Diminished proliferation of human immunodeficiency virus-specific CD4+ T cells is associated with diminished interleukin-2 (IL-2) production and is recovered by exogenous IL-2. J Virol. 2003 Oct;77(20):10900–9.
117. Malhotra U, Bosch RJ, Chan E, Wang R, Fischl MA, Collier AC, et al. Association of T Cell Proliferative Responses and Phenotype with Virus Control in Chronic Progressive HIV-1 Disease. J Infect Dis. 2004 Feb 1;189(3):515–9.
118. Jansen CA, Piriou E, De Cuyper IM, Van Dort K, Lange JM, Miedema F, et al. Long-term highly active antiretroviral therapy in chronic HIV-1 infection: evidence for reconstitution of antiviral immunity. Antivir Ther. 2005;11:105–16.
119. Harari A, Phanie Petitpierre S, Vallelian F, Pantaleo G. Skewed representation of functionally distinct populations of virus-specific CD4 T cells in HIV-1–infected subjects with progressive disease: changes after antiretroviral therapy. Blood. 2004;103:966–72.
120. Palmer BE, Boritz E, Wilson CC. Effects of sustained HIV-1 plasma viremia on HIV-1 Gag-specific CD4+ T cell maturation and function. J Immunol. 2004 Mar 1;172(5):3337–47.
121. Wilson JD, Ogg GS, Allen RL, Goulder PJ, Kelleher A, Sewell AK, et al. Oligoclonal expansions of CD8(+) T cells in chronic HIV infection are antigen specific. J Exp Med. 1998 Aug 17;188(4):785–90.
122. George Makedonas and Michael R. Betts. Makedonas G; Betts MR. Immunol Rev. 2011;239(1):109–24.
123. Lewden C, Chene G, Morlat P, Raffi F, Dupon M, Dellamonica P, et al. HIV-infected adults with a CD4 cell count greater than 500 cells/mm3 on long-term combination antiretroviral therapy reach same mortality rates as the general population. J Acquir Immune Defic Syndr. 2007 Sep 1;46(1):72–7.
124. Kelley CF, Kitchen CMR, Hunt PW, Rodriguez B, Hecht FM, Kitahata M, et al. Incomplete Peripheral CD4 + Cell Count Restoration in HIV-Infected Patients Receiving Long-Term Antiretroviral Treatment. Clin Infect Dis. 2009;48(6):787–94.
125. Marziali M, De Santis W, Carello R, Leti W, Esposito A, Isgrò A, et al. T-cell homeostasis alteration in HIV-1 infected subjects with low CD4 T-cell count despite undetectable virus load during HAART. AIDS. 2006 Oct 24;20(16):2033–41.
126. Erikstrup C, Kronborg G, Lohse N, Ostrowski SR, Gerstoft J, Ullum H. T-cell dysfunction in HIV-1-infected patients with impaired recovery of CD4 cells despite suppression of viral replication. J Acquir Immune Defic Syndr. 2010 Mar;53(3):303–10.
127. Marchetti G, Gazzola L, Trabattoni D, Bai F, Ancona G, Ferraris L, et al. Skewed T-cell maturation and function in HIV-infected patients failing CD4+ recovery upon long-term virologically suppressive HAART. AIDS. 2010;24(10):1455–60.
128. Li T, Wu N, Dai Y, Qiu Z, Han Y, Xie J, et al. Reduced thymic output is a major mechanism of immune reconstitution failure in HIV-infected patients after long-term antiretroviral therapy. Clin Infect Dis. 2011 Nov 1;53(9):944–51.
129. Massanella M, Negredo E, Clotet B, Blanco J. Immunodiscordant responses to HAART – mechanisms and consequences. Expert Rev Clin Immunol. 2013 Nov 10;9(11):1135–49.
130. Gaardbo JC, Hartling HJ, Gerstoft J, Nielsen SD. Incomplete Immune Recovery in HIV Infection: Mechanisms, Relevance for Clinical Care, and Possible Solutions. Clin Dev Immunol. Hindawi Publishing Corporation; 2012;670957.

131. Isgrò A, Aiuti A, Leti W, Gramiccioni C, Esposito A, Mezzaroma I, et al. Immunodysregulation of HIV disease at bone marrow level. Autoimmun Rev. 2005 Nov;4(8):486–90.
132. Grabar S, Le Moing V, Goujard C, Leport C, Kazatchkine MD, Costagliola D, et al. Clinical outcome of patients with HIV-1 infection according to immunologic and virologic response after 6 months of highly active antiretroviral therapy. Ann Intern Med. 2000 Sep 19;133(6):401–10.
133. Florence E, Lundgren J, Dreezen C, Fisher M, Kirk O, Blaxhult A, et al. Factors associated with a reduced CD4 lymphocyte count response to HAART despite full viral suppression in the EuroSIDA study. HIV Med. 2003 Jul;4(3):255–62.
134. Kaufmann GR, Perrin L, Pantaleo G, Opravil M, Furrer H, Telenti A, et al. CD4 T-lymphocyte recovery in individuals with advanced HIV-1 infection receiving potent antiretroviral therapy for 4 years: the Swiss HIV Cohort Study. Arch Intern Med. 2003 Oct 13;163(18):2187–95.
135. Smith KY, Valdez H, Landay A, Spritzler J, Kessler HA, Connick E, et al. Thymic size and lymphocyte restoration in patients with human immunodeficiency virus infection after 48 weeks of zidovudine, lamivudine, and ritonavir therapy. J Infect Dis. 2000 Jan;181(1):141–7.
136. Franco JM, Rubio A, Martínez-Moya M, Leal M, Merchante E, Sánchez-Quijano A, et al. T-cell repopulation and thymic volume in HIV-1-infected adult patients after highly active antiretroviral therapy. Blood. 2002 May 15;99(10):3702–6.
137. Teixeira L, Valdez H, McCune JM, Koup RA, Badley AD, Hellerstein MK, et al. Poor CD4 T cell restoration after suppression of HIV-1 replication may reflect lower thymic function. AIDS. 2001 Sep 28;15(14):1749–56.
138. Tanaskovic S, Fernandez S, French MA, Price RI, Song S, Robins PD, et al. Thymic tissue is not evident on high-resolution computed tomography and [18F]Fluoro-deoxy-glucose positron emission tomography scans of aviraemic HIV patients with poor recovery of CD4+ T cells. AIDS. 2011 Jun 1;25(9):1235–7.
139. Massanella M, Negredo E, Perez-Alvarez N, Puig J, Ruiz-Hernandez R, Bofill M, et al. CD4 T-cell hyperactivation and susceptibility to cell death determine poor CD4 T-cell recovery during suppressive HAART. AIDS. 2010/02/24. 2010;24(7):959–68.
140. Benveniste O, Flahault A, Rollot F, Elbim C, Estaquier J, Pédron B, et al. Mechanisms involved in the low-level regeneration of CD4+ cells in HIV-1-infected patients receiving highly active antiretroviral therapy who have prolonged undetectable plasma viral loads. J Infect Dis. 2005 May 15;191(10):1670–9.
141. Okoye AA, Rohankhedkar M, Abana C, Pattenn A, Reyes M, Pexton C, et al. Naive T cells are dispensable for memory CD4+ T cell homeostasis in progressive simian immunodeficiency virus infection. J Exp Med. 2012 Apr 9;209(4):641–51.
142. Anthony KB, Yoder C, Metcalf JA, DerSimonian R, Orenstein JM, Stevens RA, et al. Incomplete CD4 T cell recovery in HIV-1 infection after 12 months of highly active antiretroviral therapy is associated with ongoing increased CD4 T cell activation and turnover. J Acquir Immune Defic Syndr. 2003 Jun 1;33(2):125–33.
143. Catalfamo M, Wilhelm C, Tcheung L, Proschan M, Friesen T, Park J-H, et al. CD4 and CD8 T cell immune activation during chronic HIV infection: roles of homeostasis, HIV, type I IFN, and IL-7. J Immunol. 2011;186:2106–16.
144. Catalfamo M, Di Mascio M, Hu Z, Srinivasula S, Thaker V, Adelsberger J, et al. HIV infection-associated immune activation occurs by two distinct pathways that differentially affect CD4 and CD8 T cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 Dec 16;105(50):19851–6.
145. Napolitano LA, Schmidt D, Gotway MB, Ameli N, Filbert EL, Ng MM, et al. Growth hormone enhances thymic function in HIV-1–infected adults. J Clin Invest. 2008 Feb 1;118(3):1085–98.
146. Massanella M, Gómez-Mora E, Carrillo J, Curriu M, Ouchi D, Puig J, et al. Increased ex vivo cell death of central memory CD4 T cells in treated HIV infected individuals with unsatisfactory immune recovery. J Transl Med. 2015;
147. Marchetti G, Gori A, Casabianca A, Magnani M, Franzetti F, Clerici M, et al. Comparative analysis of T-cell turnover and homeostatic parameters in HIV-infected patients with discordant immune-virological responses to HAART. AIDS. 2006 Aug 22;20(13):1727–36.
148. Hunt PW, Brenchley J, Sinclair E, McCune JM, Roland M, Page-Shafer K, et al. Relationship between T cell activation and CD4+ T cell count in HIV-seropositive individuals with undetectable plasma HIV RNA levels in the absence of therapy. J Infect Dis. 2008 Jan 1;197(1):126–33.
149. Hunt PW, Martin JN, Sinclair E, Bredt B, Hagos E, Lampiris H, et al. T cell activation is associated with lower CD4+ T cell gains in human immunodeficiency virus-infected patients with sustained viral suppression during antiretroviral therapy. J Infect Dis. 2003 May 15;187(10):1534–43.

150. Negredo E, Massanella M, Puig J, Perez-Alvarez N, Gallego-Escuredo JM, Villarroya J, et al. Nadir CD4 T cell count as predictor and high CD4 T cell intrinsic apoptosis as final mechanism of poor CD4 T cell recovery in virologically suppressed HIV-infected patients: clinical implications. Clin Infect Dis. 2010/04/07. 2010;50(9):1300–8.
151. Méndez-Lagares G, Pozo-Balado MM, del Mar del Pozo Balado M, Genebat M, Genebat González M, García Pergañeda A, et al. Severe immune dysregulation affects $CD4^{+}CD25(hi)FoxP3^{+}$ regulatory T cells in HIV-infected patients with low-level CD4 T-cell repopulation despite suppressive highly active antiretroviral therapy. J Infect Dis. 2012;205:1501–9.
152. Kotler DP. Characterization of Intestinal Disease Associated with Human Immunodeficiency Virus Infection and Response to Antiretroviral Therapy. J Infect Dis. 1999 May;179(s3):S454–6.
153. Marchetti G, Bellistrì GM, Borghi E, Tincati C, Ferramosca S, La Francesca M, et al. Microbial translocation is associated with sustained failure in CD4+ T-cell reconstitution in HIV-infected patients on long-term highly active antiretroviral therapy. AIDS. 2008 Oct 1;22(15):2035–8.
154. Jiang W, Lederman MM, Hunt P, Sieg SF, Haley K, Rodriguez B, et al. Plasma levels of bacterial DNA correlate with immune activation and the magnitude of immune restoration in persons with antiretroviral-treated HIV infection. J Infect Dis. 2009 Apr 15;199(8):1177–85.
155. Palmer S, Maldarelli F, Wiegand A, Bernstein B, Hanna GJ, Brun SC, et al. Low-level viremia persists for at least 7 years in patients on suppressive antiretroviral therapy. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 Mar 11;105(10):3879–84.
156. Mavigner M, Delobel P, Cazabat M, Dubois M, L'faqihi-Olive F-E, Raymond S, et al. HIV-1 residual viremia correlates with persistent T-cell activation in poor immunological responders to combination antiretroviral therapy. Nixon DF, editor. PLoS One. 2009 Oct 30;4(10):e7658.
157. Massanella M, Negredo E, Puig J, Puertas MC, Buzon MJ, Perez-Alvarez N, et al. Raltegravir intensification shows differing effects on CD8 and CD4 T cells in HIV-infected HAART-suppressed individuals with poor CD4 T-cell recovery. AIDS. 2012/09/29. 2012;26(18):2285–93.
158. Núñez M, Soriano V, López M, Ballesteros C, Cascajero A, González-Lahoz J, et al. Coinfection with hepatitis C virus increases lymphocyte apoptosis in HIV-infected patients. Clin Infect Dis. 2006 Nov 1;43(9):1209–12.
159. Körner C, Krämer B, Schulte D, Coenen M, Mauss S, Fätkenheuer G, et al. Effects of HCV co-infection on apoptosis of CD4+ T-cells in HIV-positive patients. Clin Sci. 2009 May 14;116(12):861–70.
160. Hunt PW, Martin JN, Sinclair E, Epling L, Teague J, Jacobson MA, et al. Valganciclovir reduces T cell activation in HIV-infected individuals with incomplete CD4+ T cell recovery on antiretroviral therapy. J Infect Dis. 2011/04/20. 2011;203(10):1474–83.
161. Steininger C, Puchhammer-Stöckl E, Popow-Kraupp T. Cytomegalovirus disease in the era of highly active antiretroviral therapy (HAART). J Clin Virol. 2006 Sep;37(1):1–9.
162. Kaufmann GR, Furrer H, Ledergerber B, Perrin L, Opravil M, Vernazza P, et al. Characteristics, determinants, and clinical relevance of CD4 T cell recovery to. Clin Infect Dis. 2005 Aug 1;41(3):361–72.
163. Badolato R. Immunological nonresponse to highly active antiretroviral therapy in HIV-infected subjects: is the bone marrow impairment causing CD4 lymphopenia? Clin Infect Dis. 2008/05/09. 2008;46(12):1911–2.
164. Ruiz-Mateos E, Rubio A, Vallejo A, De la Rosa R, Sanchez-Quijano A, Lissen E, et al. Thymic volume is associated independently with the magnitude of short- and long-term repopulation of CD4+ T cells in HIV-infected adults after highly active antiretroviral therapy (HAART). Clin Exp Immunol. 2004/05/19. 2004;136(3):501–6.
165. Nies-Kraske E, Schacker TW, Condoluci D, Orenstein J, Brenchley J, Fox C, et al. Evaluation of the pathogenesis of decreasing CD4(+) T cell counts in human immunodeficiency virus type 1-infected patients receiving successfully suppressive antiretroviral therapy. J Infect Dis. 2009/05/13. 2009;199(11):1648–56.
166. Robbins GK, Spritzler JG, Chan ES, Asmuth DM, Gandhi RT, Rodriguez BA, et al. Incomplete Reconstitution of T Cell Subsets on Combination Antiretroviral Therapy in the AIDS Clinical Trials Group Protocol 384. Clin Infect Dis. 2009 Feb 1;48(3):350–61.
167. Hunt PW, Deeks SG, Rodriguez B, Valdez H, Shade SB, Abrams DI, et al. Continued CD4 cell count increases in HIV-infected adults experiencing 4 years of viral suppression on antiretroviral therapy. AIDS. 2003 Sep 5;17(13):1907–15.
168. Negredo E, Moltó J, Burger D, Viciana P, Ribera E, Paredes R, et al. Unexpected CD4 cell count

decline in patients receiving didanosine and tenofovir-based regimens despite undetectable viral load. AIDS. 2004 Feb 20;18(3):459–63.
169. Du DL, Volpe DA, Grieshaber CK, Murphy MJ. In vitro toxicity of 3'-azido-3'-deoxythymidine, carbovir and 2',3'-didehydro-2',3'-dideoxythymidine to human and murine haematopoietic progenitor cells. Br J Haematol. 1992 Apr;80(4):437–45.
170. Karrer U, Ledergerber B, Furrer H, Elzi L, Battegay M, Cavassini M, et al. Dose-dependent influence of didanosine on immune recovery in HIV-infected patients treated with tenofovir. AIDS. 2005 Nov 18;19(17):1987–94.
171. Waters L, Stebbing J, Jones R, Michailidis C, Sawleshwarkar S, Mandalia S, et al. A comparison of the CD4 response to antiretroviral regimens in patients commencing therapy with low CD4 counts. J Antimicrob Chemother. 2004 Aug 1;54(2):503–7.
172. Gandhi RT, Spritzler J, Chan E, Asmuth DM, Rodriguez B, Merigan TC, et al. Effect of baseline- and treatment-related factors on immunologic recovery after initiation of antiretroviral therapy in HIV-1-positive subjects: results from ACTG 384. J Acquir Immune Defic Syndr. 2006 Aug 1;42(4):426–34.
173. Pido-Lopez J, Imami N, Aspinall R. Both age and gender affect thymic output: more recent thymic migrants in females than males as they age. Clin Exp Immunol. 2001 Sep;125(3):409–13.
174. Molloy EJ, O'Neill AJ, Grantham JJ, Sheridan-Pereira M, Fitzpatrick JM, Webb DW, et al. Sex-specific alterations in neutrophil apoptosis: the role of estradiol and progesterone. Blood. 2003 Oct 1;102(7):2653–9.
175. Portales P, Clot J, Corbeau P. Sex differences in HIV-1 viral load due to sex difference in CCR5 expression. Ann Intern Med. 2001 Jan 2;134(1):81–2.
176. Kaufmann GR, Bloch M, Finlayson R, Zaunders J, Smith D, Cooper DA. The extent of HIV-1-related immunodeficiency and age predict the long-term CD4 T lymphocyte response to potent antiretroviral therapy. AIDS. 2002 Feb 15;16(3):359–67.
177. Viard JP, Mocroft A, Chiesi A, Kirk O, Røge B, Panos G, et al. Influence of age on CD4 cell recovery in human immunodeficiency virus-infected patients receiving highly active antiretroviral therapy: evidence from the EuroSIDA study. J Infect Dis. 2001 Apr 15;183(8):1290–4.
178. Nasi M, Pinti M, Bugarini R, Troiano L, Lugli E, Bellodi C, et al. Genetic polymorphisms of Fas (CD95) and Fas ligand (CD178) influence the rise in CD4+ T cell count after antiretroviral therapy in drug-naïve HIV-positive patients. Immunogenetics. 2005 Oct 13;57(9):628–35.
179. Haas DW, Geraghty DE, Andersen J, Mar J, Motsinger AA, D'Aquila RT, et al. Immunogenetics of CD4 Lymphocyte Count Recovery during Antiretroviral Therapy: An AIDS Clinical Trials Group Study. J Infect Dis. 2006 Oct 15;194(8):1098–107.
180. Fernandez S, Rosenow AA, James IR, Roberts SG, Nolan RC, French MA, et al. Recovery of CD4+ T Cells in HIV patients with a stable virologic response to antiretroviral therapy is associated with polymorphisms of interleukin-6 and central major histocompatibility complex genes. J Acquir Immune Defic Syndr. 2006 Jan 1;41(1):1–5.
181. Ahuja SK, Kulkarni H, Catano G, Agan BK, Camargo JF, He W, et al. CCL3L1-CCR5 genotype influences durability of immune recovery during antiretroviral therapy of HIV-1-infected individuals. Nat Med. 2008 Apr 30;14(4):413–20.
182. McGeoch DJ, Rixon FJ, Davison AJ. Topics in herpesvirus genomics and evolution. Virus Res. 2006 Apr;117(1):90–104.
183. Rawlinson WD, Farrell HE, Barrell BG. Analysis of the Complete DNA Sequence of Murine Cytomegalovirus. J Virol. 1996;70(10):8833–49.
184. Boeckh M, Geballe AP. Cytomegalovirus: Pathogen, paradigm, and puzzle. J Clin Invest. 2011;121(5):1673–80.
185. Sinclair J, Sissons P. Latency and reactivation of human cytomegalovirus. J Gen Virol. 2006/06/09. 2006;87(Pt 7):1763–79.
186. Griffiths P, Baraniak I, Reeves M. The pathogenesis of human cytomegalovirus. J Pathol. 2015 Jan;235(2):288–97.
187. Cannon MJ, Schmid DS, Hyde TB. Review of cytomegalovirus seroprevalence and demographic characteristics associated with infection. Rev Med Virol. John Wiley & Sons, Ltd.; 2010 Jun 18;20(4):202–13.
188. Landolfo S, Gariglio M, Gribaudo G, Lembo D. The human cytomegalovirus. Pharmacol Ther. 2003 Jun;98(3):269–97.
189. Pass RF. Epidemiology and transmission of cytomegalovirus. J Infect Dis. 1985 Aug;152(2):243–8.
190. Varani S, Landini MP. Cytomegalovirus-induced immunopathology and its clinical consequences.

Herpesviridae. 2011;2:6.
191. Zanghellini F, Boppana SB, Emery VC, Griffiths PD, Pass RF. Asymptomatic primary cytomegalovirus infection: virologic and immunologic features. J Infect Dis. 1999 Sep;180(3):702–7.
192. Whitley RJ. Congenital cytomegalovirus infection: epidemiology and treatment. Adv Exp Med Biol. 2004;549:155–60.
193. Stagno S, Pass RF, Cloud G, Britt WJ, Henderson RE, Walton PD, et al. Primary cytomegalovirus infection in pregnancy. Incidence, transmission to fetus, and clinical outcome. JAMA. 1986 Oct 10;256(14):1904–8.
194. Rubin RH. The indirect effects of cytomegalovirus infection on the outcome of organ transplantation. JAMA. 1989;261(24):3607–9.
195. Almanzar G, Schwaiger S, Jenewein B, Keller M, Herndler-Brandstetter D, Wurzner R, et al. Long-term cytomegalovirus infection leads to significant changes in the composition of the CD8+ T-cell repertoire, which may be the basis for an imbalance in the cytokine production profile in elderly persons. J Virol. 2005/02/26. 2005;79(6):3675–83.
196. Deayton JR, Prof Sabin CA, Johnson MA, Emery VC, Wilson P, Griffiths PD. Importance of cytomegalovirus viraemia in risk of disease progression and death in HIV-infected patients receiving highly active antiretroviral therapy. Lancet. 2004/06/29. 2004;363(9427):2116–21.
197. Sinzger, Christian, Jahn, Gerhard. Human cytomegalovirus cell tropism and pathogenesis. Intervirology. 1996;39(5):302–19.
198. Sissons JGP, Carmichael AJ. Clinical Aspects and Management of Cytomegalovirus Infection Disease in Normal Subjects. J Infect. 2002;44:78–83.
199. Dussaix E, Chantot S, Harzic M, Grangeot-Keros L. CMV-IGG avidity and CMV-IGM concentration in both immunocompromised and immunocompetent patients. Pathol Biol. 1996/05/01. 1996;44(5):405–10.
200. Grangeot-Keros L, Mayaux MJ, Lebon P, Freymuth F, Eugene G, Stricker R, et al. Value of cytomegalovirus (CMV) IgG avidity index for the diagnosis of primary CMV infection in pregnant women. J Infect Dis. 1997/04/01. 1997;175(4):944–6.
201. Vescovini R, Biasini C, Telera AR, Basaglia M, Stella A, Magalini F, et al. Intense antiextracellular adaptive immune response to human cytomegalovirus in very old subjects with impaired health and cognitive and functional status. J Immunol. 2010/02/23. 2010;184(6):3242–9.
202. Ross SA, Novak Z, Pati S, Boppana SB. Overview of the diagnosis of cytomegalovirus infection. Infect Disord Drug Targets. 2011/08/11. 2011;11(5):466–74.
203. Vauloup-Fellous C, Berth M, Heskia F, Dugua JM, Grangeot-Keros L. Re-evaluation of the VIDAS((R)) cytomegalovirus (CMV) IgG avidity assay: determination of new cut-off values based on the study of kinetics of CMV-IgG maturation. J Clin Virol. 2012/11/28. 2013;56(2):118–23.
204. Dollard SC, Staras SAS, Amin MM, Schmid DS, Cannon MJ. National Prevalence Estimates for Cytomegalovirus IgM and IgG Avidity and Association between High IgM Antibody Titer and Low IgG Avidity. Clin Vaccine Immunol. 2011 Nov 1;18(11):1895–9.
205. Prince HE, Lape-Nixon M, Brenner A, Pitstick N, Couturier MR. Potential Impact of Different Cytomegalovirus (CMV) IgM Assays on an Algorithm Requiring IgM Reactivity as a Criterion for Measuring CMV IgG Avidity. Clin Vaccine Immunol. 2014 Jun 1;21(6):813–6.
206. Khan N, Hislop A, Gudgeon N, Cobbold M, Khanna R, Nayak L, et al. Herpesvirus-specific CD8 T cell immunity in old age: cytomegalovirus impairs the response to a coresident EBV infection. J Immunol. 2004 Dec 15;173(12):7481–9.
207. Stowe R, Kozlova E, Yetman D, Walling D, Goodwin J, Glaser R. Chronic herpesvirus reactivation occurs in aging. Exp Gerontol. 2007 Jun;42(6):563–70.
208. Vescovini R, Telera A, Fagnoni FF, Biasini C, Medici MC, Valcavi P, et al. Different contribution of EBV and CMV infections in very long-term carriers to age-related alterations of CD8+ T cells. Exp Gerontol. 2004 Aug;39(8):1233–43.
209. Gianella S, Anderson CM, Vargas M V., Richman DD, Little SJ, Morris SR, et al. Cytomegalovirus DNA in Semen and Blood Is Associated With Higher Levels of Proviral HIV DNA. J Infect Dis. 2013 Mar 15;207(6):898–902.
210. Jackson SE, Mason GM, Wills MR. Human cytomegalovirus immunity and immune evasion. Virus Res. 2011 May;157(2):151–60.
211. Gamadia LE, Remmerswaal EBM, Weel JF, Bemelman F, Van Lier RAW, Berge IJM Ten. Primary immune responses to human CMV: a critical role for IFN-□–producing CD4 g T cells in protection against CMV disease. Blood. 2003;101:2686–92.

212. Weltevrede M, Eilers R, De Melker HE, Van Baarle D. Cytomegalovirus persistence and T-cell immunosenescence in people aged fifty and older: A systematic review. Exp Gerontol. 2016;77:87–95.
213. Klenerman P, Oxenius A. T cell responses to cytomegalovirus. Nat Rev Immunol. 2016 Jun;16(6):367–77.
214. Moss P, Khan N. CD8+ T-cell immunity to cytomegalovirus. Hum Immunol. 2004 May;65(5):456–64.
215. Sylwester AW, Mitchell BL, Edgar JB, Taormina C, Pelte C, Ruchti F, et al. Broadly targeted human cytomegalovirus-specific CD4+ and CD8+ T cells dominate the memory compartments of exposed subjects. J Exp Med. 2005/09/09. 2005;202(5):673–85.
216. Snyder CM, Cho KS, Morrison EL, Van Dommelen S, Shellam GR, Hill AB. Memory Inflation During Chronic Viral Infection is Maintained by Continuous Production of Short-Lived Functional T Cells. Immunity. 2008;29(4):650–659.
217. Pawelec G, Derhovanessian E, Larbi A, Strindhall J, Wikby A. Cytomegalovirus and human immunosenescence. Rev Med Virol. 2009 Jan;19(1):47–56.
218. Hunt PW. HIV and Inflammation: Mechanisms and Consequences. Curr HIV/AIDS Rep. 2012;9:139–57.
219. Looney RJ, Falsey A, Campbell D, Torres A, Kolassa J, Brower C, et al. Role of Cytomegalovirus in the T Cell Changes Seen in Elderly Individuals. Clin Immunol. 1999;90(2):213–9.
220. McVoy MA, Adler SP. Immunologic evidence for frequent age-related cytomegalovirus reactivation in seropositive immunocompetent individuals. J Infect Dis. 1989/07/01. 1989;160(1):1–10.
221. Wang GC, Kao WHL, Murakami P, Xue QL, Chiou RB, Detrick B, et al. Cytomegalovirus Infection and the Risk of Mortality and Frailty in Older Women: A Prospective Observational Cohort Study. Am J Epidemiol. 2010 May 15;171(10):1144–52.
222. Almeida GD, Porada CD, St Jeor S, Ascensao JL. Human cytomegalovirus alters interleukin-6 production by endothelial cells. Blood. 1994 Jan 15;83(2):370–6.
223. Smith PD, Saini SS, Raffeld M, Manischewitz JF, Wahl SM. Cytomegalovirus induction of tumor necrosis factor-alpha by human monocytes and mucosal macrophages. J Clin Invest. 1992 Nov 1;90(5):1642–8.
224. Zhu J, Quyyumi AA, Norman JE, Csako G, Epstein SE. Cytomegalovirus in the pathogenesis of atherosclerosis: the role of inflammation as reflected by elevated C-reactive protein levels. J Am Coll Cardiol. 1999 Nov 15;34(6):1738–43.
225. Simanek AM, Dowd JB, Pawelec G, Melzer D, Dutta A, Aiello AE. Seropositivity to Cytomegalovirus, Inflammation, All- Cause and Cardiovascular Disease-Related Mortality in the United States. PLoS One. 2011;6.
226. Griffiths PD. CMV as a cofactor enhancing progression of AIDS. J Clin Virol. 2006 Apr;35(4):489–92.
227. Dobbins JG, Stewart JA, Demmler GJ. Surveillance of congenital cytomegalovirus disease, 1990-1991. Collaborating Registry Group. MMWR CDC Surveill Summ. 1992/04/24. 1992;41(2):35–9.
228. Grosse SD, Ross DS, Dollard SC. Congenital cytomegalovirus (CMV) infection as a cause of permanent bilateral hearing loss: a quantitative assessment. J Clin Virol. 2008 Feb;41(2):57–62.
229. van de Berg PJ, Yong SL, Remmerswaal EB, van Lier RA, ten Berge IJ. Cytomegalovirus-induced effector T cells cause endothelial cell damage. Clin Vaccine Immunol. 2012/03/09. 2012;19(5):772–9.
230. Goldmacher VS. Cell death suppression by cytomegaloviruses. Apoptosis. 2005 Mar;10(2):251–65.
231. Zhou YF, Yu ZX, Wanishsawad C, Shou M, Epstein SE. The immediate early gene products of human cytomegalovirus increase vascular smooth muscle cell migration, proliferation, and expression of PDGF beta-receptor. Biochem Biophys Res Commun. 1999 Mar 24;256(3):608–13.
232. Streblow DN, Dumortier J, Moses A V, Orloff SL, Nelson JA. Mechanisms of cytomegalovirus-accelerated vascular disease: induction of paracrine factors that promote angiogenesis and wound healing. Curr Top Microbiol Immunol. 2008;325:397–415.
233. O'Sullivan CE, Drew WL, McMullen DJ, Miner R, Lee JY, Kaslow RA, et al. Decrease of Cytomegalovirus Replication in Human Immunodeficiency Virus Infected–Patients after Treatment with Highly Active Antiretroviral Therapy. J Infect Dis. 1999 Sep;180(3):847–9.
234. Sacre K, Hunt PW, Hsue PY, Maidji E, Martin JN, Deeks SG, et al. A role for CMV-specific CD4 + CX3CR1 + T cells and CMV-induced T cell immunopathology in HIV-associated atherosclerosis. AIDS. 2012;April(26(7)):805–14.

235. Detels R, Leach CT, Hennessey K, Liu Z, Visscher BR, Cherry JD, et al. Persistent cytomegalovirus infection of semen increases risk of AIDS. J Infect Dis. 1994 Apr;169(4):766–8.
236. Gianella S, Massanella M, Wertheim JO, Smith DM. The Sordid Affair Between Human Herpesvirus and HIV. Journal of Infectious Diseases. 2015. p. 845–52.
237. Freeman ML, Lederman MM, Gianella S. Partners in Crime: The Role of CMV in Immune Dysregulation and Clinical Outcome During HIV Infection. Curr HIV/AIDS Rep. 2016;13:10–9.
238. Barrett L, Stapleton SN, Fudge NJ, Grant MD. Immune resilience in HIV-infected individuals seronegative for cytomegalovirus. AIDS. 2014;28(14):2045–9.
239. Serrano-Villar S, Sainz T, Lee SA, Hunt PW, Sinclair E, Shacklett BL, et al. HIV-Infected Individuals with Low CD4/CD8 Ratio despite Effective Antiretroviral Therapy Exhibit Altered T Cell Subsets, Heightened CD8+ T Cell Activation, and Increased Risk of Non-AIDS Morbidity and Mortality. PLOS Pathog. 2014;10(5).
240. Lee SA, Sinclair E, Hatano H, Hsue PY, Epling L, Hecht FM, et al. Impact of HIV on CD8+ T Cell CD57 Expression Is Distinct from That of CMV and Aging. PLoS One. 2014;9(2).
241. Derhovanessian E, Theeten H, Hähnel K, Van Damme P, Cools N, Pawelec G. Cytomegalovirus-associated accumulation of late-differentiated CD4 T-cells correlates with poor humoral response to influenza vaccination. Vaccine. 2013 Jan;31(4):685–90.
242. Huygens A, Lecomte S, Tackoen M, Olislagers V, Delmarcelle Y, Burny W, et al. T-Cell Responses to Congenital Cytomegalovirus Infection. J Infect Dis. 2015;212(3):484–94.
243. Lichtner M, Cicconi P, Vita S, Cozzi-Lepri A, Galli M, Lo Caputo S, et al. Cytomegalovirus Coinfection Is Associated With an Increased Risk of Severe Non–AIDS-Defining Events in a Large Cohort of HIV-Infected Patients. J Infect Dis. 2015 Jan 15;211(2):178–86.
244. Gianella S, Massanella M, Richman DD, Little SJ, Spina CA, Vargas M V, et al. Cytomegalovirus replication in semen is associated with higher levels of proviral HIV DNA and CD4+ T cell activation during antiretroviral treatment. J Virol. 2014 Jul;88(14):7818–27.
245. Naeger DM, Martin JN, Sinclair E, Hunt PW, Bangsberg DR, Hecht F, et al. Cytomegalovirus-specific T cells persist at very high levels during long-term antiretroviral treatment of HIV disease. PLoS One. 2010/02/04. 2010;5(1):e8886.
246. Stone SF, Price P, French MA. Cytomegalovirus (CMV)-specific CD8+ T cells in individuals with HIV infection: correlation with protection from CMV disease. J Antimicrob Chemother. 2006 Apr 1;57(4):585–8.
247. Weinberg A, Wohl D a, MaWhinney S, Barrett RJ, Brown DG, Glomb N, et al. Cytomegalovirus-specific IFN-gamma production is associated with protection against cytomegalovirus reactivation in HIV-infected patients on highly active antiretroviral therapy. AIDS. 2003;17(17):2445–50.
248. Parrinello CM, Sinclair E, Landay AL, Lurain N, Sharrett AR, Gange SJ, et al. Cytomegalovirus immunoglobulin G antibody is associated with subclinical carotid artery disease among HIV-infected women. J Infect Dis. 2012/04/12. 2012;205(12):1788–96.
249. Yi TJ, Walmsley S, Szadkowski L, Raboud J, Rajwans N, Shannon B, et al. A randomized controlled pilot trial of valacyclovir for attenuating inflammation and immune activation in HIV/herpes simplex virus 2-coinfected adults on suppressive antiretroviral therapy. Clin Infect Dis. 2013 Nov;57(9):1331–8.
250. Ravikumar B, Sarkar S, Davies JE, Futter M, Garcia-Arencibia M, Green-Thompson ZW, et al. Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology. Physiol Rev. American Physiological Society; 2010 Oct;90(4):1383–435.
251. Reggiori F, Komatsu M, Finley K, Simonsen A. Autophagy: More Than a Nonselective Pathway. Int J Cell Biol. Hindawi Publishing Corporation; 2012;18.
252. Chen Y, Klionsky DJ. The regulation of autophagy - unanswered questions. J Cell Sci. 2011 Jan 15;124(Pt 2):161–70.
253. Yang Z, Klionsky DJ. Eaten alive: a history of macroautophagy. Nat Cell Biol. 2010;12(9):814–22.
254. Pattingre S, Espert L, Biard-Piechaczyk M, Codogno P. Regulation of macroautophagy by mTOR and Beclin 1 complexes. Biochimie. 2008;90:313–23.
255. Killian MS. Dual role of autophagy in HIV-1 replication and pathogenesis. AIDS Res Ther. 2012;9(16):13.
256. Agholme L, Agnello M, Agostinis P, Aguirre-ghiso J a, Ahn HJ, Ait-mohamed O, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. Autophagy. 2012;(April):1–100.
257. Rubinsztein DC, Codogno P, Levine B. Autophagy modulation as a potential therapeutic target for diverse diseases. Nat Rev Drug Discov. 2012;11(9):709–30.
258. Jayanta Debnath, Eric H.Baehrecke GK. Does Autophagy contribute to Cell Death? [Internet].

Autophagy. 2005 [cited 2015 Feb 9]. Available from: http://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.4161/auto.1.2.1738
259. Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny M V, et al. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. Cell Death Differ. 2012;19(1):107–20.
260. Deretic V. Autophagy – an emerging immunological paradigm. J Immunol. 2012;1(189(1)):15–20.
261. Deretic V, Saitoh T, Akira S. Autophagy in infection, inflammation and immunity. Nat Rev Immunol. 2013 Oct;13(10):722–37.
262. Shi C-S, Shenderov K, Huang N-N, Kabat J, Abu-Asab M, Fitzgerald KA, et al. Activation of autophagy by inflammatory signals limits IL-1β production by targeting ubiquitinated inflammasomes for destruction. Nat Immunol. 2012 Jan 29;13(3):255–63.
263. Nakahira K, Haspel JA, Rathinam VAK, Lee S-J, Dolinay T, Lam HC, et al. Autophagy proteins regulate innate immune responses by inhibiting the release of mitochondrial DNA mediated by the NALP3 inflammasome. Nat Immunol. 2011 Mar;12(3):222–30.
264. Dupont N, Jiang S, Pilli M, Ornatowski W, Bhattacharya D, Deretic V. Autophagy-based unconventional secretory pathway for extracellular delivery of IL-1β. EMBO J. 2011 Nov 30;30(23):4701–11.
265. Nardacci R, Amendola A, Ciccosanti F, Corazzari M, Esposito V, Vlassi C, et al. Autophagy plays an important role in the containment of HIV-1 in nonprogressor-infected patients. Autophagy. 2014;10(7):1167–78.
266. Hubbard VM, Valdor R, Patel B, Singh R, Cuervo AM, Macian F. Macroautophagy regulates energy metabolism during effector T cell activation. J Immunol. 2010;185(12):7349–7357.
267. Bronietzki AW, Schuster M, Schmitz I. Autophagy in T-cell development, activation and differentiation. Immunol Cell Biol. Nature Publishing Group; 2015;93(1):25–34.
268. Salemi S, Yousefi S, Constantinescu MA, Fey MF, Simon H-U. Autophagy is required for self-renewal and differentiation of adult human stem cells. Cell Res. 2012 Feb;22(2):432–5.
269. Kuma A, Hatano M, Matsui M, Yamamoto A, Nakaya H, Yoshimori T, et al. The role of autophagy during the early neonatal starvation period. Nature. 2004 Dec 23;432(7020):1032–6.
270. Aichinger M, Wu C, Nedjic J, Klein L. Macroautophagy substrates are loaded onto MHC class II of medullary thymic epithelial cells for central tolerance. J Exp Med. 2013 Feb 11;210(2):287–300.
271. Dengjel J, Schoor O, Fischer R, Reich M, Kraus M, Müller M, et al. Autophagy promotes MHC class II presentation of peptides from intracellular source proteins. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 May 31;102(22):7922–7.
272. Jia W, He Y-W. Temporal regulation of intracellular organelle homeostasis in T lymphocytes by autophagy. J Immunol. 2011 May 1;186(9):5313–22.
273. Li C, Capan E, Zhao Y, Zhao J, Stolz D, Watkins SC, et al. Autophagy is induced in CD4+ T cells and important for the growth factor-withdrawal cell death. J Immunol. 2006;177(8):5163–8.
274. Xu X, Araki K, Li S, Han J, Ye L, Tan WG, et al. Autophagy is essential for effector CD8 T cell survival and memory formation. Nat Immunol. 2015;15(12):1152–61.
275. Puleston DJ, Zhang H, Powell TJ, Lipina E, Sims S, Panse I, et al. Autophagy is a critical regulator of memory CD8(+) T cell formation. Elife. 2014;3:e03706.
276. Campbell GR, Spector SA. Vitamin D inhibits human immunodeficiency virus type 1 and Mycobacterium tuberculosis infection in macrophages through the induction of autophagy. PLoS Pathog. 2012/05/17. 2012;8(5):e1002689.
277. Campbell GR, Spector SA. Autophagy induction by vitamin D inhibits both Mycobacterium tuberculosis and human immunodeficiency virus type 1. Autophagy. 2012/08/16. 2012;8(10):1523–5.
278. Stock PG. Kidney Infection with HIV-1 Following Kidney Transplantation. J Am Soc Nephrol. 2014 Feb 1;25(2):212–5.
279. Martin AR, Pollack RA, Capoferri A, Ambinder RF, Durand CM, Siliciano RF. Rapamycin-mediated mTOR inhibition uncouples HIV-1 latency reversal from cytokine-associated toxicity. J Clin Invest. 2017 Feb 1;127(2):651–6.
280. Dong X, Levine B. Autophagy and viruses: adversaries or allies? J Innate Immun. 2013 Jan;5(5):480–93.
281. Espert L, Codogno P, Biard-Piechaczyk M. Involvement of autophagy in viral infections: Antiviral function and subversion by viruses. J Mol Med. 2007;85:811–23.
282. Mélanie Denizot, Mihayl Varbanov, Lucile Espert, Véronique Robert-Hebmann, Sophie Sagnier EG, Marta Curriu, Robert Mamoun JB and MB-P. HIV-1 gp41 fusogenic function triggers

autophagy in uninfected cells. Autophagy. 2008;(February 2015):54–5.
283. Espert L, Denizot M, Grimaldi M, Robert-Hebmann V, Gay B, Varbanov M, et al. Autophagy is involved in T cell death after binding of HIV-1 envelope proteins to CXCR4. J Clin Invest. 2006;116(8):2161–72.
284. Lucile Espert, Mélanie Denizot, Marina Grimaldi, Véronique Robert-Hebmann BG, Mihayl Varbanov PC& MB-P. Autophagy and CD4+ T lymphocyte destruction by HIV-1. Autophagy. 2007;(February 2015):1049–52.
285. Zhou D, Spector SA. Human immunodeficiency virus type-1 infection inhibits autophagy NIH Public Access. AIDS. 2008;30(226):695–9.
286. Castedo M, Roumier T, Blanco J, Ferri KF, Barretina J, Tintignac LA, et al. Sequential involvement of Cdk1, mTOR and p53 in apoptosis induced by the HIV-1 envelope. EMBO J. 2002 Aug 1;21(15):4070–80.
287. Fernandez S, Price P, Mckinnon EJ, Nolan RC, French MA. Low CD4+ T-cell counts in HIV patients receiving effective antiretroviral therapy are associated with CD4+ T-cell activation and senescence but not with lower effector memory T-cell function. Clin Immunol. 2006;120(2):163–70.
288. Grabmeier-Pfistershammer K, Steinberger P, Rieger A, Leitner J, Kohrgruber N. Identification of PD-1 as a unique marker for failing immune reconstitution in HIV-1-infected patients on treatment. J Acquir Immune Defic Syndr. 2011 Feb 1;56(2):118–24.
289. Méndez-Lagares G, García-Pergañeda A, del Mar del Pozo-Balado M, Genebat M, Ruiz-Mateos E, García García M, et al. Differential alterations of the CD4 and CD8 T cell subsets in HIV-infected patients on highly active antiretroviral therapy with low CD4 T cell restoration. J Antimicrob Chemother. 2012 May 1;67(5):1228–37.
290. Nakanjako D, Ssewanyana I, Mayanja-Kizza H, Kiragga A, Colebunders R, Manabe YC, et al. High T-cell immune activation and immune exhaustion among individuals with suboptimal CD4 recovery after 4 years of antiretroviral therapy in an African cohort. BMC Infect Dis. 2011 Feb 8;11(1):43.
291. Gianella S, Strain MC, Rought SE, Vargas M V., Little SJ, Richman DD, et al. Associations between Virologic and Immunologic Dynamics in Blood and in the Male Genital Tract. J Virol. 2012 Feb 1;86(3):1307–15.
292. Effros RB, Walford RL. T cell cultures and the Hayflick limit. Hum Immunol. 1984 Jan;9(1):49–65.
293. Bronke C, Palmer NM, Jansen CA, Westerlaken GHA, Polstra AM, Reiss P, et al. Dynamics of Cytomegalovirus (CMV)–Specific T Cells in HIV-1–Infected Individuals Progressing to AIDS with CMV End-Organ Disease. J Infect Dis. 2005;191:873–80.
294. Larbi A, Fulop T. From “truly naïve” to “exhausted senescent” T cells: When markers predict functionality. Cytom Part A. 2014;85(1):25–35.
295. Sachdeva N, Weinstein JE, Ashman M, Sachdeva M, Brewer TH, Gracia D, et al. Poor Lymphoproliferative Responses with Low Proportion of Gag-Specific CD8 TEMRA Cells in HIV-1-Infected Patients Showing Immunological and Virological Discordance Despite Prolonged Suppression of Plasma Viremia. Viral Immunol. 2010 Feb;23(1):49–61.
296. Effros JND and RB. Role of CD8 T Cell Replicative Senescence in Human Aging and in HIV-mediated Immunosenescence. Aging Dis. 2011;Volume 2(Number 5):382–97.
297. Campisi J. Aging, cellular senescence, and cancer. Annu Rev Physiol. 2013 Feb 10;75(1):685–705.
298. Breton G, Chomont N, Takata H, Fromentin R, Ahlers J, Filali-Mouhim A, et al. Programmed death-1 is a marker for abnormal distribution of naive/memory T cell subsets in HIV-1 infection. J Immunol. 2013/08/07. 2013;191(5):2194–204.
299. Hoffmann M, Pantazis N, 1☯ GEM, Hickling S, Hurst J, Meyerowitz J, et al. Exhaustion of Activated CD8 T Cells Predicts Disease Progression in Primary HIV-1 Infection. Plos Pathog. 2016;12(7).
300. Barber DL, Wherry EJ, Masopust D, Zhu B, Allison JP, Sharpe AH, et al. Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. Nature. 2006 Feb 9;439(7077):682–7.
301. Engsig FN, Gerstoft J, Kronborg G, Larsen CS, Pedersen G, Røge B, et al. Long-term mortality in HIV patients virally suppressed for more than three years with incomplete CD4 recovery: A cohort study. BMC Infect Dis. 2010 Dec 2;10(1):318.
302. Engsig FN, Zangerle R, Katsarou O, Dabis F, Reiss P, Gill J, et al. Long-term Mortality in HIV-Positive Individuals Virally Suppressed for >3 Years With Incomplete CD4 Recovery. Clin Infect Dis. 2014 May 1;58(9):1312–21.
303. Pacheco YM, Jarrin I, Rosado I, Campins AA, Berenguer J, Iribarren JA, et al. Increased risk of

non-AIDS-related events in HIV subjects with persistent low CD4 counts despite cART in the CoRIS cohort. Antiviral Res. 2015 May;117:69–74.
304. Karrer U, Sierro S, Wagner M, Oxenius A, Hengel H, Koszinowski UH, et al. Memory inflation: continuous accumulation of antiviral CD8+ T cells over time. J Immunol. 2003 Feb 15;170(4):2022–9.
305. Snyder CM, Loewendorf A, Bonnett EL, Croft M, Benedict CA, Hill AB. CD4+ T Cell Help Has an Epitope-Dependent Impact on CD8+ T Cell Memory Inflation during Murine Cytomegalovirus Infection. J Immunol. 2009 Sep 15;183(6):3932–41.
306. Khan N, Shariff N, Cobbold M, Bruton R, Ainsworth JA, Sinclair AJ, et al. Cytomegalovirus seropositivity drives the CD8 T cell repertoire toward greater clonality in healthy elderly individuals. J Immunol. 2002 Aug 15;169(4):1984–92.
307. Gillespie GM, Wills MR, Appay V, O'Callaghan C, Murphy M, Smith N, et al. Functional heterogeneity and high frequencies of cytomegalovirus-specific CD8(+) T lymphocytes in healthy seropositive donors. J Virol. 2000 Sep;74(17):8140–50.
308. Lang KS, Moris A, Gouttefangeas C, Walter S, Teichgräber V, Miller M, et al. High frequency of human cytomegalovirus (HCMV)-specific CD8+ T cells detected in a healthy CMV-seropositive donor. Cell Mol Life Sci. 2002 Jun;59(6):1076–80.
309. Webster A, Lee CA, Cook DG, Grundy JE, Emery VC, Kernoff PB, et al. Cytomegalovirus infection and progression towards AIDS in haemophiliacs with human immunodeficiency virus infection. Lancet (London, England). 1989 Jul 8;2(8654):63–6.
310. Lachmann R, Bajwa M, Vita S, Smith H, Cheek E, Akbar A, et al. Polyfunctional T Cells Accumulate in Large Human Cytomegalovirus-Specific T Cell Responses. J Virol. 2012 Jan 15;86(2):1001–9.
311. Alonso Arias R, Moro-García MA, Echeverría A, Solano-Jaurrieta JJ, Suárez-García FM, López-Larrea C. Intensity of the humoral response to cytomegalovirus is associated with the phenotypic and functional status of the immune system. J Virol. 2013 Apr 15;87(8):4486–95.
312. Erlandson KM, Allshouse AA, Rapaport E, Palmer BE, Wilson CC, Weinberg A, et al. Physical Function Impairment of Older, HIV-Infected Adults Is Associated with Cytomegalovirus Immunoglobulin Response. AIDS Res Hum Retroviruses. 2015;31(9).
313. Roberts ET, Haan MN, Dowd JB, Aiello AE. Cytomegalovirus antibody levels, inflammation, and mortality among elderly latinos over 9 years of follow-up. Am J Epidemiol. 2010;15(172(4)):363–71.
314. Gkrania-Klotsas E, Langenberg C, Sharp SJ, Luben R, Khaw KT, Wareham NJ. Seropositivity and higher immunoglobulin g antibody levels against cytomegalovirus are associated with mortality in the population-based European prospective investigation of Cancer-Norfolk cohort. Clin Infect Dis. 2013/02/28. 2013;56(10):1421–7.
315. Gkrania-Klotsas E, Langenberg C, Sharp SJ, Luben R, Khaw K-T, Wareham NJ. Higher Immunoglobulin G Antibody Levels Against Cytomegalovirus Are Associated With Incident Ischemic Heart Disease in the Population-Based EPIC-Norfolk Cohort. J infect Dis. 2012;206(12):1897–903.
316. Miller MF, Haley C, Koziel MJ, Rowley CF. Impact of hepatitis C virus on immune restoration in HIV-infected patients who start highly active antiretroviral therapy: a meta-analysis. Clin Infect Dis. 2005 Sep 1;41(5):713–20.
317. Joao D. Martins, Joana Liberal, Ana Silva, Isabel Ferreira BMN and MTC. Autophagy and Inflammasome Interplay. DNA Cell Biol. 2015;34(4):274–281.
318. Doitsh G, Galloway NLK, Geng X, Yang Z, Monroe KM, Zepeda O, et al. Cell death by pyroptosis drives CD4 T-cell depletion in HIV-1 infection. Nature. 2014;505:509–14.