



Moragas, Matías

# Estudio de los reservorios virales en la infección por HIV-1 en pediatría : caracterización de las formas virales latentes y su comportamiento durante el tratamiento antirretroviral combinado



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Argentina.  
Atribución - No Comercial - Sin Obra Derivada 2.5  
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.5/ar/>

Documento descargado de RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes de la Universidad Nacional de Quilmes

*Cita recomendada:*

Moragas, M. (2020). *Estudio de los reservorios virales en la infección por HIV-1 en pediatría: caracterización de las formas virales latentes y su comportamiento durante el tratamiento antirretroviral combinado. (Tesis de doctorado). Universidad Nacional de Quilmes, Bernal, Argentina Disponible en RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes*  
<http://ridaa.unq.edu.ar/handle/20.500.11807/2681>

Puede encontrar éste y otros documentos en: <https://ridaa.unq.edu.ar>

## **Estudio de los reservorios virales en la infección por HIV-1 en pediatría: caracterización de las formas virales latentes y su comportamiento durante el tratamiento antirretroviral combinado**

TESIS DOCTORAL

**Matías Moragas**

matias.moragas@gmail.com

### **Resumen**

Desde el inicio de la epidemia del virus de inmunodeficiencia humana (HIV-1, del inglés *human immunodeficiency virus type 1*), aproximadamente 75 millones de personas contrajeron la infección y 32 millones murieron por causas asociadas a la misma. En 1997, con el advenimiento de la terapia antirretroviral combinada (TARVc) contra el HIV-1, se logró por primera vez controlar significativamente y de forma sostenida la replicación del virus, llevando sus niveles en plasma a valores inferiores al límite de detección de los ensayos moleculares disponibles. A este hecho se suma que entre 2005 y 2010 se reunió evidencia suficiente para demostrar que el inicio temprano del TARVc mejora considerablemente la morbi-mortalidad de las personas que viven con HIV-1. No obstante estos grandes avances, la erradicación del HIV-1 aún no se ha logrado. Esto se debe principalmente a que luego de la infección, el virus se establece muy tempranamente en células de larga vida, principalmente células T CD4<sup>+</sup> de memoria, y puede permanecer indefinidamente en un estado de silenciamiento, evadiendo su reconocimiento por parte del sistema inmune y de las drogas antirretrovirales. Estas células que albergan variantes latentes, pero funcionales del HIV-1, se denominan reservorios virales, y constituyen una fracción muy pequeña del total de células infectadas, la cual se estima que es <7% (~ 1 célula T CD4<sup>+</sup> en reposo/millón). Dentro de este contexto, se planteó como objetivo general del presente trabajo determinar la dinámica de establecimiento y mantenimiento del reservorio del HIV-1 en niñas, niños y adolescentes que contrajeron la infección por transmisión vertical. Asimismo, se planteó determinar, en dicha población, el impacto del tiempo de inicio de tratamiento y de la supresión viral (SV) en el establecimiento y mantenimiento del reservorio. Para ello, en primer lugar, se desarrollaron y validaron 3 ensayos para la cuantificación de diferentes marcadores moleculares del tamaño del reservorio viral -copias de genoma de ADN de HIV-1 (ADN-HIV total), círculos de 2-LTR (forma episomal de HIV-1) y ARN

intracelular de HIV-1 (ARN-HIV) no procesado- en células mononucleares totales (CMT). Estos ensayos mostraron una elevada sensibilidad (3 a 7 copias/reacción) y reproducibilidad (desvío estándar inter-ensayo <0,9), además de una capacidad de detección del virus del 94,4% (68/72) en muestras de pacientes HIV-positivos, y del 92,9% (39/42) en aquellas muestras donde la carga viral plasmática (CVp) fue inferior al límite de cuantificación de los ensayos comerciales. En cuanto a la dinámica del tamaño del reservorio viral bajo TARVc efectivo (o SV), se halló una caída significativa del nivel de ADN-HIV total durante los primeros dos años de SV ( $p < 0,001$ ), con una clara tendencia hacia un mayor decaimiento en aquellos pacientes que alcanzaron la SV tempranamente (pendiente igual a -0,68 vs -0,33 y -0,29  $\log_{10}$  copias/millón de CMT en pacientes con inicio de SV  $\leq 1,5$  años vs  $> 1,5 - 5$  años y  $> 5$  años, respectivamente). Luego de los dos años de SV el ADN-HIV total alcanzó un estado de equilibrio y permaneció constante, independientemente de la edad de inicio de la SV. Esta dinámica no se vio afectada por la edad de inicio de TARVc, en contra de lo esperado, pero justificada en buena parte por el hecho de que un inicio temprano no necesariamente va acompañado de una buena adherencia, y por ende de una SV temprana. Finalmente, en la búsqueda de mecanismos de persistencia del reservorio de HIV-1 en circulación, no se encontraron evidencias de evolución viral, ni de trazas de intermediarios de replicación viral (círculos de 2-LTR) durante 6 a 15 años de SV, en pacientes que alcanzaron dicha SV antes del año de vida. Sumado a ello se encontró que una proporción mayoritaria de las variantes virales en SV ( $> 70\%$ ) estaba presente previo al inicio del TARVc (6 a 15 años antes). Estos resultados sugieren que la proliferación de las células infectadas previo al inicio del TARVc -fenómeno de expansión clonal- es el principal mecanismo de mantenimiento del reservorio del HIV-1.

Los resultados del presente trabajo de tesis aportan una mayor comprensión de los mecanismos y la dinámica de persistencia del reservorio en la infección perinatal por HIV-1, los cuales resultan relevantes para avanzar en la búsqueda de los factores determinantes del éxito de la remisión virológica en ausencia de TARVc y la investigación de enfoques tendientes hacia la cura del HIV-1.

# **Estudio de los reservorios virales en la infección por HIV-1 en pediatría: caracterización de las formas virales latentes y su comportamiento durante el tratamiento antirretroviral combinado**

**Lic. Matías Moragas**

Tesista

**Dra. Andrea Mangano**

Director

**Dra. Paula Aulicino**

Co-Director

Lugar de realización:

Laboratorio de Biología Celular y Retrovirus -CONICET  
Hospital de Pediatría "Prof. Dr. Juan P. Garrahan"



# **ÍNDICE GENERAL**

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>1.1. ORIGEN DEL HIV/SIDA</b>	<b>2</b>
<b>1.2. EPIDEMIOLOGÍA DEL HIV/SIDA</b>	<b>3</b>
1.2.1. MUNDIAL	3
1.2.2. EN ARGENTINA	5
<b>1.3. ESTRUCTURA Y GENOMA DEL HIV-1</b>	<b>6</b>
<b>1.4. CICLO DE REPLICACIÓN DEL HIV-1</b>	<b>9</b>
<b>1.5. VÍAS DE TRASMISIÓN</b>	<b>12</b>
1.5.1. TRANSMISIÓN DEL HIV-1 EN ADULTOS	13
1.5.2. TRANSMISIÓN PERINATAL DEL HIV	13
<b>1.6. CURSO NATURAL DE LA INFECCIÓN VIRAL</b>	<b>15</b>
<b>1.7. INMUNOPATOGENIA EN NIÑOS Y SUS DIFERENCIAS CON ADULTOS</b>	<b>18</b>
1.7.1. RESPUESTA INMUNE INNATA CONTRA LA INFECCIÓN POR EL HIV-1	21
1.7.2. INMUNIDAD HUMORAL: ROL DE ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES EN LA INFECCIÓN POR HIV-1	22
<b>1.8. TERAPIA ANTIRRETROVIRAL CONTRA EL HIV-1</b>	<b>24</b>
<b>1.9. RESERVORIOS DEL HIV-1</b>	<b>26</b>
1.9.1. LATENCIA	27
1.9.2. ESTIMACIÓN DEL TAMAÑO DE LOS RESERVORIOS DEL HIV-1	27
1.9.3. MANTENIMIENTO DEL RESERVORIO DE HIV-1	30
1.9.4. CURA	32
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>35</b>
<b>2.1. OBJETIVOS GENERALES</b>	<b>36</b>
<b>2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>	<b>36</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>39</b>
<b>3.1. CRONOLOGÍA DEL PROCESO METODOLÓGICO</b>	<b>40</b>
<b>3.2. GRUPOS DE ESTUDIO</b>	<b>40</b>
<b>3.3. OBTENCIÓN, PREPARACIÓN Y ALMACENAMIENTO DE MUESTRAS CLÍNICAS</b>	<b>42</b>

3.3.1.	EXTRACCIÓN DE ADN EN CMT	43
3.3.2.	EXTRACCIÓN DE ARN EN CMT Y PLASMA	43
<b>3.4.</b>	<b>DISEÑO DE ENSAYOS DE PCR EN TIEMPO REAL PARA LA CUANTIFICACIÓN DEL RESERVORIO DE HIV-1 CIRCULANTE</b>	<b>44</b>
3.4.1.	DISEÑO Y SELECCIÓN IN SILICO DE CEBADORES Y SONDAS	44
3.4.2.	DESARROLLO DE ESTÁNDARES PARA LA CUANTIFICACIÓN DE ADN DE HIV-1 ASOCIADO A CÉLULA	45
3.4.3.	DESARROLLO DE ESTÁNDARES PARA LA CUANTIFICACIÓN DE ARN DE HIV-1 NO PROCESADO	48
3.4.4.	OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE REACCIÓN	49
<b>3.5.</b>	<b>ESTIMACIÓN DEL TAMAÑO DEL RESERVORIO DE HIV-1 EN CIRCULACIÓN</b>	<b>49</b>
3.5.1.	CUANTIFICACIÓN DE ADN-HIV-1 TOTAL Y CÍRCULOS DE 2-LTR EN CMT	49
3.5.2.	CUANTIFICACIÓN DE ARN-HIV NO PROCESADO	50
<b>3.6.</b>	<b>DINÁMICA Y RELACIÓN FILOGENÉTICA DE LAS VARIANTES DE HIV-1 EN CMT DURANTE TARVC EFECTIVO Y PROLONGADO</b>	<b>51</b>
3.6.1.	CONSTRUCCIÓN DE LAS LIBRERÍAS Y SECUENCIACIÓN DE NUEVA GENERACIÓN	51
3.6.2.	ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO: PROCESAMIENTO DE LAS SECUENCIAS OBTENIDAS	52
3.6.3.	ANÁLISIS FILOGENÉTICO	54
<b>3.7.</b>	<b>ANÁLISIS ESTADÍSTICO.</b>	<b>55</b>
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>57</b>
<b>4.1.</b>	<b>DISEÑO, DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE METODOLOGÍAS CUANTITATIVAS PARA LA CARACTERIZACIÓN DE LOS RESERVORIOS DEL HIV-1</b>	<b>58</b>
4.1.1.	DISEÑO DEL ENSAYO	58
4.1.2.	EVALUACIÓN DEL DESEMPEÑO DE LA METODOLOGÍA DE PCR EN TIEMPO REAL SEMI-ANIDADA PARA LA CUANTIFICACIÓN DE LOS RESERVORIOS DEL HIV-1 EN CIRCULACIÓN	58
<b>4.2.</b>	<b>IMPACTO DE LA EFICACIA DEL TARVC EN LOS NIVELES DE ADN-HIV TOTAL</b>	<b>61</b>
4.2.1.	LOS PACIENTES RESPONDEDORES AL TARVC PRESENTARON UN MAYOR DECAIMIENTO EN EL TAMAÑO DEL RESERVORIO DE HIV-1 RESPECTO A LOS PACIENTES NO RESPONDEDORES	62
4.2.2.	CORRELACIÓN ENTRE EL NIVEL DE ADN-HIV TOTAL Y MARCADORES DE PROGRESIÓN DE LA INFECCIÓN	64
<b>4.3.</b>	<b>DINÁMICA DEL TAMAÑO DEL RESERVORIO CIRCULANTE A LO LARGO DE 4 AÑOS DE SV SOSTENIDA E IMPACTO DE LA EDAD DE SV EN LA MISMA</b>	<b>65</b>
4.3.1.	CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO	65
4.3.2.	EL ADN-HIV TOTAL DECAE RÁPIDAMENTE DURANTE LOS PRIMEROS DOS AÑOS DE SV Y LUEGO SE ESTABILIZA, INDEPENDIENTEMENTE DE SU FORMA DE EXPRESIÓN	67
4.3.3.	PACIENTES CON INICIO DE SV DURANTE EL PRIMER AÑO Y MEDIO DE VIDA TIENDEN A UN MAYOR DECAIMIENTO EN EL NIVEL DE ADN-HIV TOTAL	69

4.3.4. LA FRECUENCIA DE CÍRCULOS DE 2-LTR DECAEN EN EL TIEMPO INDEPENDIEMENTE DEL NIVEL DE ADN-HIV TOTAL	72
<b>4.4. DINÁMICA DE ESTABLECIMIENTO Y MANTENIMIENTO DE LOS RESERVORIOS DEL HIV-1 EN NIÑOS CON SV TEMPRANA Y PROLONGADA</b>	<b>72</b>
4.4.1. CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO	72
4.4.2. EL RESERVORIO DE HIV-1 EN CIRCULACIÓN PERMANECE ESTABLE A LO LARGO DE 6 A 15 AÑOS DE SV SOSTENIDA, A PESAR DE UN INICIO DE SV TEMPRANO	73
4.4.3. MÉTRICAS DEL PROCESO DE OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS HAPLOTIPOS DE HIV-1 EN CMT	75
4.4.4. AUSENCIA DE EVIDENCIA DE EVOLUCIÓN GENÉTICA DEL RESERVORIO DE HIV-1 EN CIRCULACIÓN	76
4.4.5. LA PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS INFECTADAS ANTES DEL INICIO DEL TARVC ES EL PRINCIPAL MECANISMO DE PERSISTENCIA DEL RESERVORIO DE HIV-1 EN CIRCULACIÓN	79
<b>5. DISCUSIÓN</b>	<b>82</b>
5.1. DESARROLLO, EVALUACIÓN E IMPLEMENTACIÓN DE ENSAYOS PARA EL MONITOREO DEL RESERVORIO CIRCULANTE EN NUESTRA REGIÓN	84
5.2. IMPACTO DEL TARVC EFECTIVO SOBRE EL TAMAÑO DEL RESERVORIO: EVALUACIÓN DEL TIEMPO DEL INICIO DE TRATAMIENTO Y SUPRESIÓN VIRAL	85
5.3. ESTUDIO DEL MECANISMO DE MANTENIMIENTO DEL RESERVORIO CIRCULANTE: EXPANSIÓN CLONAL VS. REPLICACIÓN VIRAL RESIDUAL	90
<b>6. CONCLUSIÓN GENERAL E IMPLICANCIAS</b>	<b>97</b>
<b>7. REFERENCIAS</b>	<b>99</b>

# **ÍNDICE DE FIGURAS**

<i>Figura 1.1. Indicadores del estado de la infección por HIV-1.</i> .....	4
<i>Figura 1.2. Estructura y genoma del HIV-1</i> .....	8
<i>Figura 1.3. Ciclo de replicación del HIV-1</i> .....	11
<i>Figura 1.4. Curso normal de la infección por el HIV-1 en ausencia de TARVc</i> .....	16
<i>Figura 1.5. Dinámica de la CVp en población adulta y pediátrica HIV-1 positiva.</i> .....	20
<i>Figura 1.6. Perfil de los diferentes tipos de provirus que se pueden encontrar en las células T CD4<sup>+</sup> en reposo</i> .....	29
<i>Figura 1.7. Diferencias entre replicación viral en curso y producción de virus desde el reservorio.</i> .....	31
<i>Figura 3.1. Población de estudio.</i> .....	42
<i>Figura 3.2. Flujo de trabajo para la obtención y análisis de variantes virales</i> .....	51
<i>Figura 4.1. Curvas estándar para el ensayo de cuantificación de ADN-HIV total.</i> .....	60
<i>Figura 4.2. Velocidades de decaimiento del nivel de ADN-HIV total en diferentes compartimentos a lo largo de 4 años de SV sostenida.</i> .....	69
<i>Figura 4.3. Velocidades de decaimiento del nivel de ADN-HIV total de acuerdo a la edad de inicio de la SV y a lo largo de 4 años de SV sostenida.</i> .....	71
<i>Figura 4.4. Evolución del tamaño del reservorio de HIV-1 durante la SV</i> .....	75
<i>Figura 4.5. Tiempos de muestreo para cada paciente.</i> .....	76
<i>Figura 4.6. . Árbol filogenético obtenido por maximum likelihood a partir de los haplotipos de todos los pacientes.</i> .....	77
<i>Figura 4.7. Árbol filogenético de los haplotipos de cada paciente obtenido por maximum likelihood</i> .....	78
<i>Figura 4.8. Dinámica de los haplotipos no defectivos obtenidos para cada paciente, antes del inicio del TARVc y durante la SV</i> .....	81

# **ÍNDICE DE TABLAS**

<i>Tabla 1-1. Estadio inmunológico de la infección por HIV-1 basado en el número o porcentaje de células T CD4+ por edad. ....</i>	<i>18</i>
<i>Tabla 3-1. Cebadores y sondas .....</i>	<i>46</i>
<i>Tabla 4-1. Capacidad de cuantificación del ensayo de ADN-HIV total en muestras clínicas.....</i>	<i>61</i>
<i>Tabla 4-2. Características descriptivas de la población de estudio I (ver Materiales y Métodos) de acuerdo al tipo de respuesta al TARVc. ....</i>	<i>63</i>
<i>Tabla 4-3. Correlación de factores asociados a la progresión de la infección con el nivel de ADN-HIV total. ....</i>	<i>64</i>
<i>Tabla 4-4. Características descriptivas de la población de estudio II (ver Materiales y Métodos) de acuerdo a la edad a la que alcanzaron la SV.....</i>	<i>66</i>
<i>Tabla 4-5. Velocidades de decaimiento y valores medios del nivel de ADN-HIV total, estimados durante la SV y por compartimento.....</i>	<i>68</i>
<i>Tabla 4-6. Velocidades de decaimiento y valores medios del nivel de ADN-HIV total, estimados durante la SV y por de acuerdo a la edad de inicio de la SV.....</i>	<i>70</i>
<i>Tabla 4-7. Características descriptivas de los pacientes de la población de estudio III (ver Materiales y Métodos).....</i>	<i>73</i>
<i>Tabla 4-8. Composición de haplotipos únicos y repetidos por muestra. ....</i>	<i>79</i>

# **ABREVIATURAS**

ADCC	citotoxicidad celular mediada por anticuerpos
ADN-HIV	genoma de ADN de HIV-1
AZT	zidovudina
BNAbs	anticuerpos ampliamente neutralizantes
C1	1er cuartil
C3	3er cuartil
CDC	Centro para el Control y Prevención de Enfermedades
CG	centro germinal
CMH	complejo mayor de histompatibilidad
CMT	células mononucleares totales
CRF	formas recombinantes circulantes
Ct	ciclo umbral
DS	desvío estándar
HIV	virus de inmunodeficiencia humana
HSCT	trasplante alogénico de células madre
HTLV	virus linfotrópico de células T humanas
IC. 95%	intervalo de confianza 0,95
IN	integrasa
INFs	interferones
INNTI	inhibidores no nucleosídicos de la transcriptasa inversa
INSTI	inhibidores de la integrasa viral
INTI	inhibidores nucleosídicos de la transcriptasa inversa
IP	inhibidores de la proteasa
IP. 95%	intervalo predictivo 0,95
LD	límite de detección
LIC	límite inferior de cuantificación
LTR	repetición terminal larga
Nabs	anticuerpos neutralizantes
NR	pacientes no respondedores al tratamiento antirretroviral
OMS	Organización Mundial de la Salud
pos-TARVc	luego del inicio del tratamiento antirretroviral
PR	proteasa
pre-SV	antes del comienzo de la supresión viral

pre-TARVc	antes del inicio del tratamiento antirretroviral
QVOA	<i>quantitative viral outgrowth assays</i>
R	pacientes respondedores al tratamiento antirretroviral
RT	transcriptasa inversa
S/CO	<i>sample/cut-off</i>
sida	síndrome de inmunodeficiencia adquirida
SV	supresión viral
TA	temperatura ambiente
TARVc	terapia antirretroviral combinada
Tfh	T cooperadoras foliculares
Tfr	T foliculares regulatorias
TLRs	receptores de tipo toll
TV	transmisión vertical
U	unidades

# **1. INTRODUCCIÓN**

## 1.1. Origen del HIV/sida

El 5 de junio de 1981 el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC por sus siglas en inglés) de Estados Unidos publicó un artículo en *Morbidity and Mortality Weekly Report* [1], en el cual se describieron casos raros de infecciones pulmonares por *Pneumocystis carinii* en 5 jóvenes de sexo masculino, homosexuales, en los Ángeles (EE.UU.). En todos los jóvenes se observaron otras infecciones inusuales, que dieron cuenta de una disfunción progresiva e irreversible de la inmunidad celular y, que, en último término, condujo a la muerte de todos ellos. Este fue el primer reporte oficial de aquello que más adelante se conoció como la epidemia del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (sida). En los días siguientes, surgieron reportes de formas inusuales de cáncer, sarcoma de Kaposi, y otras infecciones oportunistas en varones homosexuales<sup>1</sup> [2], donde el sarcoma de Kaposi al igual que la pulmonía por *Pneumocystis carinii*, se encuentran asociados a personas con inmunosupresión severa. En diciembre de ese mismo año, 5 niñas y niños fueron atendidos en el *Albert Einstein Medical College* en Nueva York (EE.UU.) por signos de inmunodeficiencia severa y *Pneumocystis carinii*. Tres de los niños eran hijos de madres usuarias de drogas y/o trabajadoras sexuales. En total, para finales de diciembre de 1981 se reportaron 337 casos de personas con inmunodeficiencia severa, de los cuales 321 eran adolescentes y adultos, mientras que 16 eran personas menores de 13 años, y para entonces 130 habían muerto [3].

A mediados de 1983 la Dra. Barré-Sinoussi y el Dr. Luc Montagnier del Instituto Pasteur de Francia aislaron un retrovirus que denominaron *Lymphadenopathy Associated Virus* [4], a partir de tejido linfoide de un varón homosexual con sida. Simultáneamente, el Dr. Gallo, perteneciente a la escuela de medicina de la Universidad de Maryland (EE.UU.) determinó que un retrovirus, por aquel entonces de la familia de los virus linfotrópicos de células T humanas (HTLV por sus siglas en inglés) y denominado HTLV-III, era la principal causa de los casos de sida que se estaban observando en los EE.UU. [5,6]. Estos trabajos fueron los primeros en identificar a lo

---

<sup>1</sup> Es muy posible que esta población también haya estado conformada por travestis, transexuales y transgéneros, cuya reconocimiento para esa época era sumamente reducido.

que hoy se denomina virus de inmunodeficiencia humana (HIV por sus siglas en inglés) como el agente causal del sida.

En Argentina, los primeros casos de HIV se conocieron en 1982, muchos de ellos se concentraron en la Academia Nacional de Medicina y el Hospital Dr. Juan A. Fernández de la Ciudad de Buenos Aires [7] y correspondían a personas que consumían drogas inyectables, hombres que tenían relaciones sexuales con hombres<sup>1</sup> y hemofílicos [8,9] que habrían adquirido la infección en EE.UU.

A finales de la década del 1990, distintos grupos de investigadores establecieron que las primeras infecciones con el HIV en seres humanos provinieron de primates infectados con el virus de la inmunodeficiencia del simio (SIV por sus siglas en inglés, con un sufijo para denotar la especie de origen) en África subsahariana a comienzos del siglo XX [10–12]. Estas transmisiones, específicamente, por el chimpancé y *sooty mangabeys* dieron origen al HIV de tipo 1 (HIV-1) [13] y tipo 2 (HIV-2) [14], respectivamente. Diversos estudios filogenéticos han permitido establecer que han ocurrido varias introducciones individuales de SIV<sub>cpz</sub> desde chimpancé a la población humana [11]. Como resultado de estos eventos zoonóticos, se dio origen a cuatro grupos de HIV-1 genéticamente diferenciados: M, O, N y P [15]. Pero de estos cuatro, el grupo M es el principal responsable de la pandemia mundial. Como consecuencia de la vasta diversidad de HIV-1, el grupo M presenta nueve subtipos (denominados A, B, C, D, F, G, H, J y K) y más de 100 formas recombinantes circulantes (CRF por sus siglas en inglés) reportadas [16].

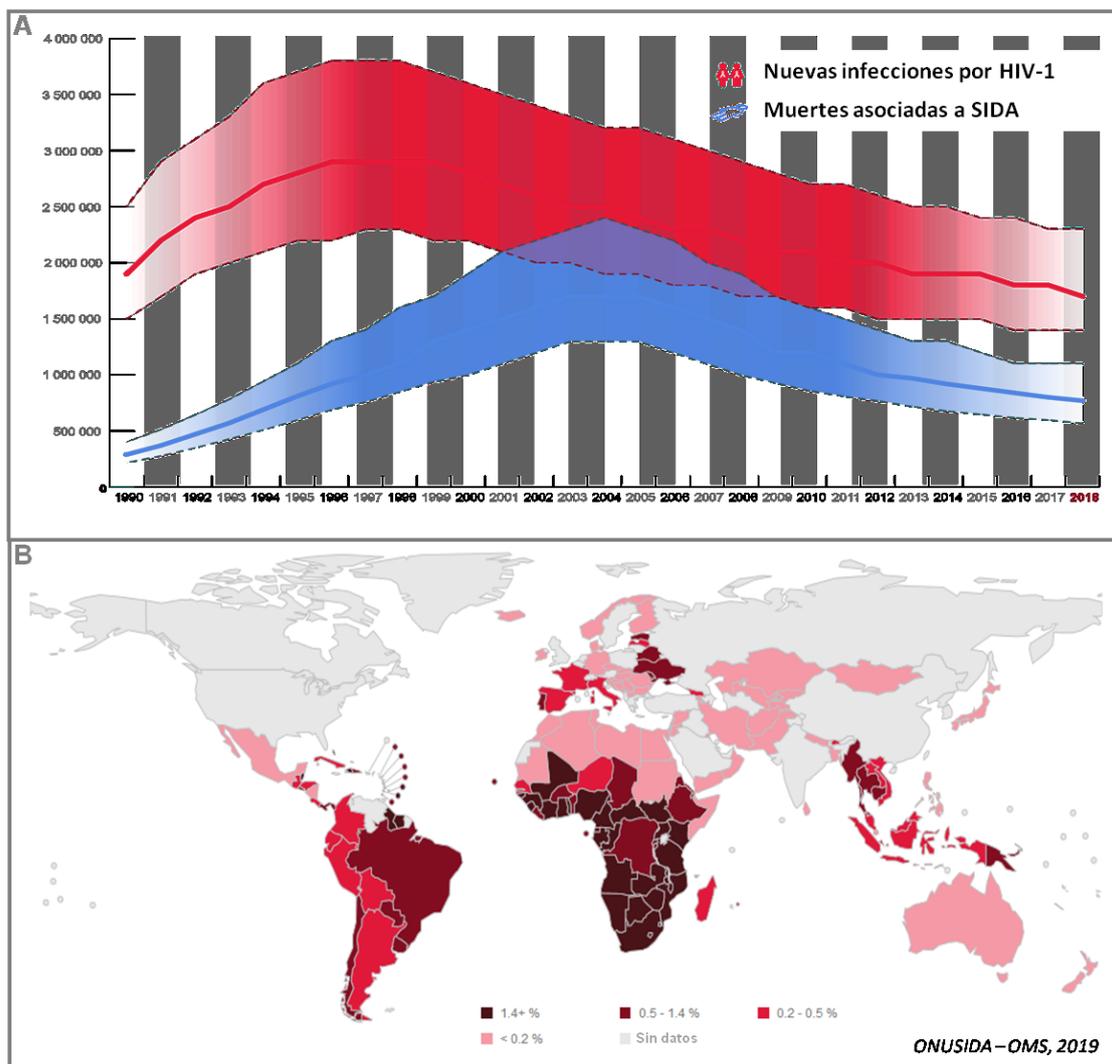
Para el año 2008, los Dres. Barré-Sinoussi y Montagnier, fueron distinguidos con el premio Nobel de Medicina por haber configurado su hallazgo inicial, uno de los primeros pasos trascendentales en el estudio del HIV.

## **1.2. Epidemiología del HIV/sida**

### ***1.2.1. Mundial***

De acuerdo al último reporte de la Organización Mundial de la Salud (OMS) [17], en 2018 se produjeron 1,7 millones (1,4 millones–2,3 millones) de nuevas infecciones por el HIV-1 (ver Figura 1.1A). Esto significó un descenso del 39% desde

el año 2000, que fue el punto de estabilización del mayor pico de nuevas infecciones. Es importante destacar que, en este mismo periodo el número de nuevas infecciones por el HIV-1 en niños, niñas y adolescentes (0 a 14 años) descendió desde 450.000 [300.000–700.000] hasta 160.000 [110.000–260.000], lo que representó una disminución del 64%. En consecuencia, la proyección del número de personas que vivía con el HIV-1 en 2018 fue de 37,9 millones [32,7 millones–44,0 millones], de este total 36,2 millones (31,3 millones–42,0 millones) eran parte de la población adulta y 1,7 millones (1,3 millones–2,2 millones) eran población infanto-juvenil, menores de 15 años.



**Figura 1.1. Indicadores del estado de la infección por HIV-1.**

**A.** Evolución del número de nuevos casos de infección por HIV-1 y muertes asociadas a SIDA. **B.** Prevalencia global de HIV-1 por país. Las figuras fueron extraídas y modificadas de la página web de la OMS (<https://www.who.int/hiv/data/en/>).

Por otra parte, en 2018 el número de muertes asociadas a sida descendió al nivel más bajo del siglo, con menos de 1 millón de muertes por año [770.000 (570.000–1,1 millones), ver Figura 1.1A], gracias a la ampliación y sostenimiento del acceso a la terapia antirretroviral. Del total de muertes reportadas, 670.000 (500.000-920.000) correspondían a adultos y 100.000 (64.000-160.000) a chicos y chicas menores de 15 años. Este gran descenso a nivel mundial fue liderado por África subsahariana, principalmente en África oriental y meridional, en donde se concentra el 55% de las personas que viven con el HIV-1 en el mundo (ver Figura 1.1B). En dicha región, el número de muertes asociadas a sida se redujo un 44% en el periodo 2010 - 2018. En este mismo periodo, el descenso de muertes en África occidental y central fue más modesto y alcanzó un 29%; mientras que en Asia y el Pacífico el descenso fue continuo y alcanzó un 24%. Por su parte, en Europa central/occidental y América del Norte se registró una reducción del 35%, cifra muy similar a la del Caribe que presentó un descenso del 38%. En América Latina, donde la cobertura de la terapia antirretroviral ha sido relativamente alta y el número de muertes asociadas a sida fue relativamente bajo durante varios años, entre 2010 y 2018 se registró una disminución de tan solo el 14% en el número de muertes.

Las mejoras significativas en el estado actual de la epidemia de HIV/sida responden a las metas fijadas en el año 2013 por la Organización de las Naciones Unidas para el año 2020 [18]. Las metas a alcanzar denominadas "90-90-90" son tres y apuntan a que en 2020 el 90% de las personas que viven con el HIV-1 conozcan su estado serológico respecto al mismo, el 90% de las personas diagnosticadas con el HIV-1 reciba terapia antirretroviral, y el 90% de las personas que recibe terapia antirretroviral alcance la supresión viral (SV). En este sentido, en el 2018 el 79% de las personas que vivía con el HIV-1 en todo mundo conocía su estado, partiendo de un 66% en 2015 [19]. Entre las personas que conocían su estado, el 62% tenía acceso al tratamiento, y de los que tenían acceso al tratamiento, el 53% había logrado la SV [17]. Esta última cifra dista considerablemente de la meta del 90% para el 2020.

### ***1.2.2. En Argentina***

En Argentina hace varios años que la epidemia del HIV-1 se ha estabilizado gracias a acciones de prevención sostenidas, el acceso universal a las pruebas

diagnósticas y a los tratamientos, incluyendo el uso de test rápidos y la simplificación de los esquemas antirretrovirales, provistos por el Programa de Prevención de VIH-Sida y Enfermedades de Transmisión Sexual del Ministerio de Salud de la Nación. Aún así, los últimos datos epidemiológicos [20] distan considerablemente de las metas "90-90-90" fijadas para el 2020 [18]. En el año 2017, el número total de personas que vivían con el HIV-1 fue 120.000 (110.000-130.000), de las cuales el 25% (67%-83%) desconocía su situación. Asimismo, en ese mismo año, el 66% (60%-73%) de las personas que vivían con el HIV-1 estaban bajo tratamiento antirretroviral. En 2017, se diagnosticaron 6.500 (5600–7200) nuevas infecciones por el HIV-1, en donde el 35% se encontraba en etapas avanzadas de la infección. Mientras que la tasa de transmisión perinatal fue del 5%, donde el 66% fue diagnosticado tempranamente. Para ese año, 2000 (1400–2600) personas murieron por causas relacionadas con el sida.

En relación a los objetivos del presente trabajo, el cual se focaliza en el estudio de poblaciones pediátricas que contrajeron el HIV-1 mediante transmisión vertical (TV), resulta relevante entender los desafíos epidemiológicos que enfrenta esta población. En este sentido, el diagnóstico en las personas gestantes es un eje importante para la prevención oportuna de la TV. Sin embargo, en 2017 solo el 53,1% de la población femenina en Argentina conocía su situación virológica antes del embarazo [20]. De la población restante, un 34,7% fueron diagnosticadas durante el embarazo, 5,2% durante el trabajo de parto y 2,7% durante el puerperio. Otra de las principales variables relacionadas con la transmisión materno infantil es el porcentaje de mujeres embarazadas que llegan al parto con una CVp inferior a 1000 copias/mL, el cual se mantuvo estable desde 2015 con un 79,2% (454/573 mujeres) hasta 2017 con un 79,5% (461/580 mujeres). Finalmente, se estima que en nuestro país durante el 2018 hubo menos de 100 chicos y chicas menores de 15 años fallecidas por causas asociadas a sida [21].

### **1.3. Estructura y genoma del HIV-1**

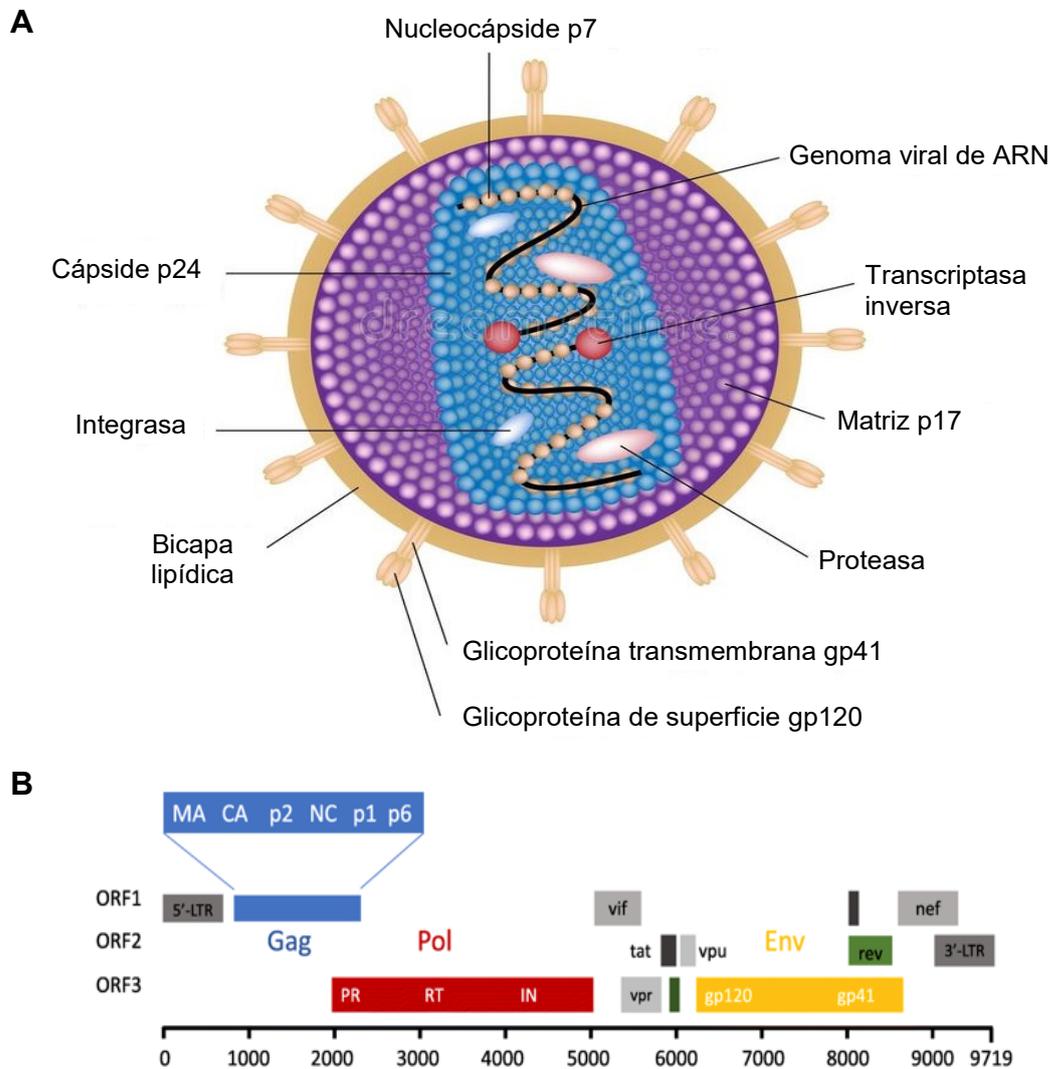
El HIV-1 pertenece al género lentivirus de la familia Retroviridae [22]. Una de las principales características de los miembros de esta familia es la de revertir el flujo normal de información genética, de ADN a ARN. Estructuralmente, el HIV-1 es una partícula esférica envuelta de aproximadamente 100 nm de diámetro (Figura 1.2A). Esta

consiste en una cápside interna y cónica formada por la proteína p24. Dentro se encuentra el genoma viral compuesto por 2 copias de ARN simple cadena de aproximadamente 9,2 Kb con polaridad positiva, las enzimas transcriptasa inversa (RT por sus siglas en inglés), integrasa (IN), proteasa (PR) y las proteínas de la nucleocápside p7 y p9. Por fuera se encuentra una cápside externa que es una matriz proteica con simetría icosaédrica compuesta por la proteína p17. La envoltura externa es una bicapa lipídica con proteínas de matriz insertadas en la superficie interna. Contiene además a la glicoproteína viral gp41, que es una proteína transmembrana que se une en forma no covalente con la gp120. Esta última, es la glicoproteína más externa y posee dominios de unión a la célula hospedadora.

El genoma del HIV-1 se describe, generalmente, desde su forma proviral, que es el ADN viral generado por el proceso de transcripción inversa (descrito en la sección 1.4) y que se ha integrado al genoma celular. Este genoma de ADN, al igual que otros retrovirus, se encuentra flanqueado tanto en el extremo 5' como en el 3' por repeticiones terminales largas (LTR por sus siglas en inglés) y, cuenta con 3 genes estructurales (*gag*, *pol*, y *env*) [22]. A su vez, el HIV-1 posee 2 genes regulatorios (*tat* y *rev*) y 4 accesorios (*vif*, *vpr*, *vpu* y *nef*) (Figura 1.2B). La totalidad de los precursores polipeptídicos de las proteínas virales se encuentran codificados en 9 marcos abiertos de lectura distintos.

Las LTR intervienen activamente en una serie de procesos tales como, el inicio de la transcripción inversa del genoma viral, la inserción del ADN genómico viral en el ADN cromosómico de la célula hospedadora y el empaquetamiento del ARN genómico viral en la progenie viral [23]. Además, las LTR poseen secuencias promotoras del tipo “TATA box” y potenciadoras, dependientes de los factores de transcripción SP1 y del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NFκB por sus siglas en inglés), las cuales interaccionan junto a diversos factores celulares en el reclutamiento de la ARN polimerasa II. El gen estructural *gag* codifica para la poliproteína p55, que a su vez da origen a las proteínas p17, p24, p7, las cuales conforman la base estructural de la partícula viral [24]. Mientras que a partir de la poliproteína Pol, se generan las enzimas virales de PR, IN y RT. Finalmente, el precursor Env da origen a la glicoproteína de envoltura (gp160), la cual es procesada para dar lugar a la glicoproteína externa gp120 y a la glicoproteína transmembrana gp41 [25]. La principal función de gp120 es interaccionar con los receptores presentes en la

superficie de las células blanco. Por su parte, gp41 participa activamente en los procesos de entrada del virus a la célula, la regulación de la expresión de Env en la superficie de la célula hospedadora y el empaquetamiento de la partícula viral.



**Figura 1.2. Estructura y genoma del HIV-1.**

**A.** Representación de la estructura de la partícula del HIV-1. **B.** Representación esquemática del genoma de HIV-1. El genoma del HIV-1 presenta 3 genes estructurales, *gag*, *pol* y *env*, que se muestran en azul, rojo y amarillo, respectivamente; 4 genes accesorios en gris; y 2 genes regulatorios en verde. Estos genes se traducen en 3 diferentes marcos abiertos de lectura (ORF, del inglés *open reading frame*): ORF1, ORF2 y ORF3. La figura fue extraída y modificada del trabajo de Cervera *et al* [26].

Las proteínas Tat y Rev del HIV-1 regulan el ciclo de replicación del virus. Específicamente, Tat actúa como transactivador de la expresión genética del HIV-1, favoreciendo el inicio y la elongación de la transcripción desde el promotor del LTR. Mientras que, Rev promueve la exportación nuclear, estabilización y utilización de los ARN mensajeros virales no procesados. Entre los genes accesorios del HIV-1, se encuentra, en primer lugar, Vif que promueve la maduración e infectividad del virión, pero no la producción de partículas virales. En segundo lugar, se encuentra la proteína Vpr, que contribuye en la importación del complejo de pre-integración hacia el núcleo celular, la transactivación de genes celulares, la inducción de la diferenciación celular y el detenimiento del ciclo celular. En tercer lugar, se halla la proteína Vpu, que promueve la degradación del receptor CD4 en el retículo endoplasmático, lo que resulta en la incorporación de Env a los viriones [27]. Asimismo, Vpu aumenta la liberación de partículas virales a partir de linfocitos T CD4<sup>+</sup> infectados [28]. Finalmente, se encuentra la proteína multifuncional Nef, que interactúa con diferentes componentes de las vías de señalización de la célula hospedadora, disminuyendo la expresión de diversos receptores de membrana, incluyendo el receptor CD4 y el complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) de clase I [29]. De este modo, Nef le permite al HIV-1 eludir el reconocimiento por parte del sistema inmune, regular el ciclo celular, inhibir la apoptosis, y así aumentar su tasa de replicación e infectividad.

#### **1.4. Ciclo de replicación del HIV-1**

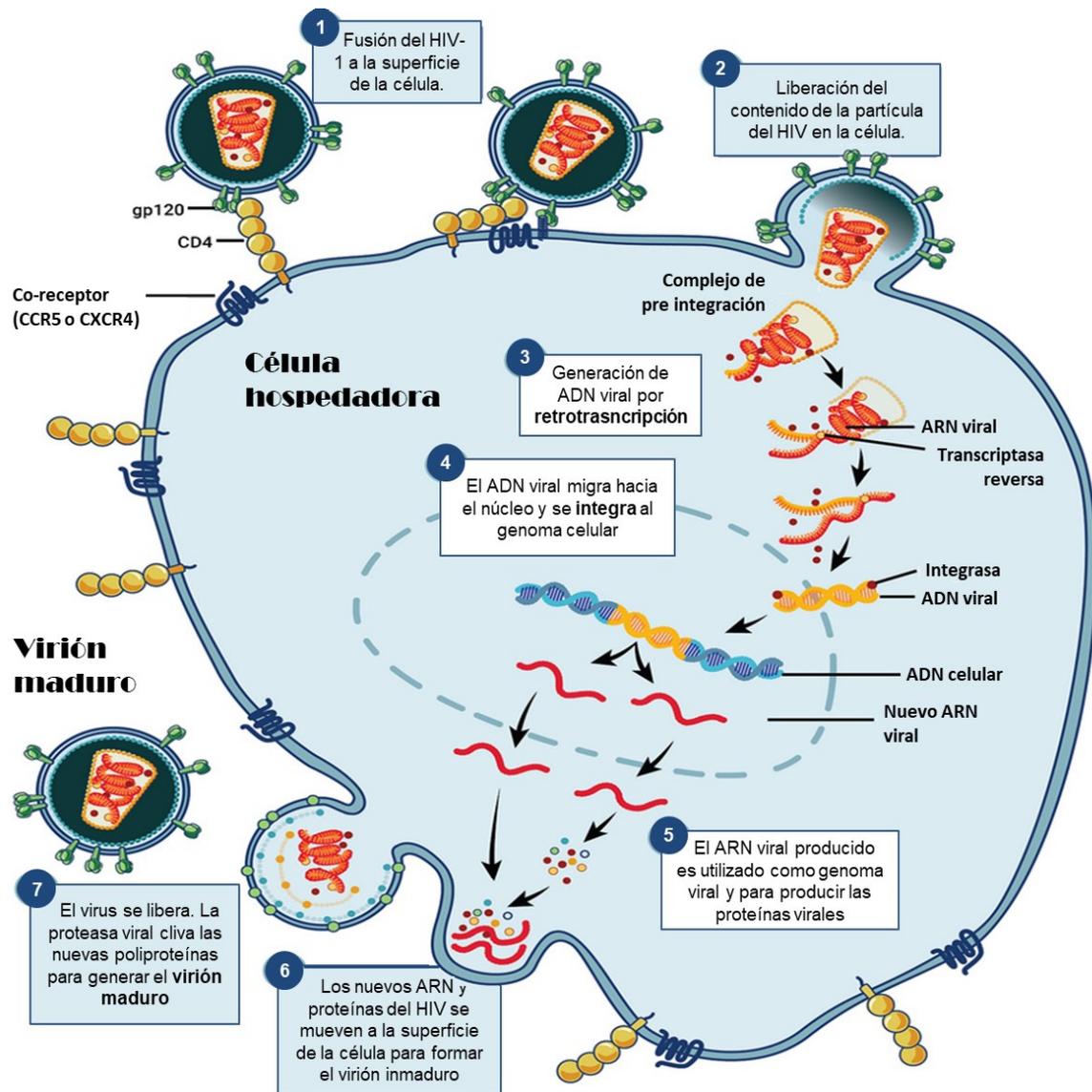
El ciclo de replicación de HIV-1 es complejo y puede dividirse en una etapa temprana y otra tardía [30]. La etapa temprana comienza con el reconocimiento y la unión del virión a la superficie celular y termina con la integración del ADN proviral al genoma celular. La etapa tardía inicia con el comienzo de la transcripción y finaliza con la liberación de viriones maduros. El proceso de replicación del HIV-1 representa en sí algunos desafíos asociados con la patogenia viral. Así, como la RT del HIV-1 posee una tasa de mutación muy alta (1 error cada 10.000 nucleótidos), las poblaciones virales presentes en una persona infectada no son uniformes, sino más bien una colección de diferentes poblaciones, a las cuales se las denomina cuasiespecies virales. Por otro lado, el corto tiempo de generación y la producción masiva de virus ( $\sim 2 \times 10^9$  viriones/día), permiten que este se adapte rápidamente a su huésped y desarrolle resistencia contra las

drogas antirretrovirales o las respuestas inmunitarias. Es debido a ello que en 1996 se dio inicio al uso de la terapia antirretroviral combinadas (TARVc), con drogas que inhiben diferentes procesos del ciclo de replicación del virus, para generar una barrera más alta contra la selección de variantes resistentes a los antirretrovirales. Por último, corresponde destacar, que la integración del HIV-1 en el genoma de la célula infectada le permite resguardarse de forma latente en células con larga vida media.

En la Figura 1.3 se ilustran los principales procesos del ciclo de replicación de HIV. Así, se observa que el proceso de infección se inicia por la interacción de la glicoproteína viral externa gp120 con el receptor celular CD4 [30]. Esta unión induce cambios conformacionales en el trímero de Env que permite la interacción de gp120 con los receptores de quimiocinas CXCR4 y/o CCR5, que son los principales co-receptores de entrada del HIV. A partir de la interacción con el co-receptor celular se producen cambios conformacionales adicionales en Env que exponen a la proteína transmembrana gp41, la cual permite la fusión del virus con la membrana celular. Posteriormente, el trímero de gp41 forma una estructura helicoidal que une las membranas virales y celulares, lo cual permite la fusión del virión y la liberación del contenido de la partícula del virus en la célula.

Luego del ingreso del HIV a la célula, la RT utiliza al ARN genómico viral como molde para sintetizar una doble cadena de ADN genómico viral [30]. Durante la migración del intermediario proviral hacia el núcleo se produce el desmontaje de la cápside viral. Una vez en el núcleo, el ADN proviral que forma parte del complejo de pre-integración se inserta finalmente en el genoma de la célula hospedadora por acción de la integrasa viral. La inserción del genoma viral en el ADN cromosómico de la célula hospedadora es crítica para luego dar inicio a la transcripción activa de mensajeros y nuevos genomas virales, por parte de la ARN polimerasa II celular. La transcripción proviral es iniciada por el promotor viral, que se encuentra en la región U3 del 5'LTR y es activo en muchos tipos de células. La expresión de los genes virales depende estrictamente de factores de transcripción celular, como NFκB y NFAT. Al inicio, el alargamiento de los transcriptos virales es muy ineficiente y se requiere de la expresión de la proteína transactivadora viral Tat para una expresión génica viral efectiva. Tat se une a una secuencia específica en la región R del 5'LTR, denominada elemento trans-regulador o TAR, para aumentar la procesividad transcripcional y permitir la síntesis eficiente de los transcriptos virales: (i) ARN intracelular de HIV-1 (ARN-HIV) no

procesado (9 kb) que actúa como ARN genómico o precursor de Gag y Gag-Pol (ii) ARN-HIV parcialmente procesado (4 kb) que codifica Vif, Vpr, Vpu y Env; y (iii) ARN-HIV completamente procesado (2 kb) que expresa Tat, Rev y Nef.



**Figura 1.3. Ciclo de replicación del HIV-1.**

La infografía ilustra las principales etapas del proceso de replicación del virus, las cuales se describen con mayor detalle en el cuerpo del texto. La figura fue extraída y modificada de la página web del *National Institute of Allergy and Infectious Diseases* (<https://www.niaid.nih.gov/diseases-conditions/hiv-replication-cycle>).

Seguidamente, los ARNs mensajeros no procesados y parcialmente procesados son transportados desde el núcleo al citoplasma mediante la proteína viral Rev, que interactúa con el elemento de respuesta a Rev, conocido como RRE, en el ARN viral y el factor de exportación celular Crm1 [31]. En consecuencia, las primeras proteínas virales en ser sintetizadas son Tat, Rev y Nef, ya que estimulan la transcripción de genes y la síntesis de proteínas virales. Luego, prosigue la biosíntesis de las proteínas estructurales de HIV-1, la cual se lleva a cabo en compartimentos celulares diferentes. De modo que, por un lado, Env se sintetiza dentro del retículo endoplasmático y se modifica en Golgi, para llegar luego a la membrana plasmática. En cambio, por otro lado, las poliproteínas Gag y Pol son sintetizadas a partir de ribosomas citoplasmáticos. Estos precursores proteicos se asocian con dímeros de ARN genómico viral y se condensan por debajo de la membrana plasmática en estrecho contacto con Env [32]. A continuación, las partículas virales inmaduras comienzan a brotar de la superficie de la célula infectada. La maduración de dichas partículas virales es dependiente de la acción proteolítica de la proteasa viral que ha sido previamente incorporada a los viriones.

### 1.5. Vías de transmisión

Una persona que tiene HIV-1 puede transmitir el virus a partir de ciertos fluidos corporales: sangre, semen o líquido preseminal, fluidos rectales, fluidos vaginales y leche materna. Estos fluidos deben entrar en contacto con una membrana mucosa o tejido lesionado, o ser inyectados directamente en el torrente sanguíneo (desde una aguja o jeringa) para que ocurra la transmisión. De este modo, las vías de transmisión del HIV-1 se clasifican en **sexual**, **parenteral** y **vertical**. Esta última incluye la transmisión del virus de la persona gestante al bebe durante el embarazo, el parto o la lactancia [33].

Existen diferentes estrategias para prevenir la transmisión del HIV por la vía **sexual**, que incluyen principalmente el uso de condones y, más recientemente, la profilaxis Pre-exposición, conocido como PrEP por sus siglas en inglés [33]. Esta última estrategia de prevención del HIV consiste en que las personas que no tienen HIV, pero que tienen prácticas que pueden exponerlos a la transmisión del virus, toman un fármaco antirretroviral y así reducen la posibilidad de adquirirlo. En cuanto a la vía **parenteral**, es importante mencionar que, a partir de los controles exhaustivos durante

las transfusiones de sangre y sus derivados, así como durante el trasplante de órganos, la transmisión del HIV por esta vía ocurre principalmente en personas que se inyectan drogas. Otra vía de infección, aunque muy poco frecuente, es la ingesta de alimentos que fueron previamente masticados por una persona HIV-positiva. Hasta el momento, los únicos casos de este tipo de transmisión se produjeron en bebés [34].

### *1.5.1. Transmisión del HIV-1 en adultos*

La CVp en la persona transmisora es el principal determinante de riesgo de infección por HIV-1, independientemente de la vía de transmisión. En parejas donde uno de los miembros vive con el HIV-1 y el otro no, denominadas parejas sero-discordantes, se observó un aumento de la transmisión de hasta 2,5 veces, por cada incremento de 10 veces en la CVp [35,36]. Además, se determinó que las personas con CVp menor a 1000 copias/mL rara vez transmiten el HIV-1 a sus parejas sexuales. El último hallazgo, y uno de los más importantes vinculado a la transmisibilidad del virus, se produjo a partir de tres amplios estudios llevados a cabo entre 2007 y 2016, en donde se estudiaron miles de parejas sero-discordantes [37–39]. En estos estudios no se observó ni un solo caso transmisión del HIV-1 desde personas que viven con el virus y que presentan CVp indetectable hacia sus parejas seronegativas.

Otros factores que pueden afectar la eficiencia de la transmisión de HIV-1 son: i) **las enfermedades de transmisión sexual**, particularmente aquellas que causan inflamación genital y úlceras, ya que pueden incrementar la propagación del virus en el tracto genital y así aumentar de 2 a 10 veces las posibilidades de infección [40]; ii) **el embarazo**, durante el cual se ha observado un aumento mayor al doble en el riesgo de adquisición de HIV-1 [41]; y iii) **la circuncisión**, que en una serie de ensayos clínicos demostraron reducir en un 60% el riesgo de infección en la pareja sexual masculina [42,43].

### *1.5.2. Transmisión perinatal del HIV*

La mayoría de las infecciones por HIV-1 en pediatría ocurren por transmisión de la persona gestante al bebe, y esta se puede dar en tres momentos distintos, que son durante el embarazo (intraútero), el parto (intraparto) o la lactancia. La tasa de

transmisión del HIV-1 en la población gestante con estadio crónico de infección y que no reciben TARVc son del 5–10% intraútero, 10–20% intraparto, y 5–15% durante la lactancia [44].

En el año 1994 se evidenció a partir de un ensayo clínico randomizado, denominado ACTG 076, que un régimen antirretroviral con zidovudina (AZT) administrado a la persona gestante durante el tercer trimestre del embarazo e intraparto, como así también al recién nacido durante las primeras 6 semanas de vida, reduce significativamente la tasa de TV de HIV-1 [45]. En dicho ensayo clínico, donde se evaluaron 364 niñas y niños, se observó que la tasa de transmisión de HIV-1 en el grupo al que se le administró placebo fue de 25,5%, mientras que la tasa de transmisión en la rama a la que se le administró AZT fue del 8,3%.

A pesar de los 9 meses de exposición en la interfaz materno-fetal y la evidencia de tráfico celular bidireccional entre la persona gestante y el feto, la transmisión intraútero de HIV-1 es la forma menos eficiente de TV [46]. Tanto es así, que pueden detectarse células maternas en la sangre de los bebés HIV-negativos nacidos de mujeres HIV-positivas [47]. Esta baja eficiencia de transmisión puede deberse a que la mayoría de las células fetales son inactivas, mientras que la infección productiva de HIV-1 ocurre principalmente en células T activadas [48]. También, durante el intercambio celular entre la persona gestante y el feto, donde potencialmente se puede transmitir el HIV-1, se promueve el desarrollo de células T reguladoras fetales, que suprimen activamente las respuestas inmunes contra los antígenos maternos [49].

En ausencia de profilaxis antirretroviral, la TV ocurre con mayor frecuencia en el momento del parto. Se desconoce aún si durante el parto esto se debe a la transferencia transplacentaria del virus o a la exposición del neonato a las secreciones y la sangre de la parturienta. Sin embargo, debido al efecto protector mediado por la cesárea contra la transmisión de HIV-1 en pacientes con alta CVp [50], junto con la presencia del virus en aspirados gástricos infantiles y la abundancia de células T CD4<sup>+</sup> CCR5<sup>+</sup> -que son altamente susceptibles a la infección por HIV-1, en la mucosa intestino neonatal [51]- es posible que la mayoría de la transmisión intraparto sea a través de la mucosa.

Por último, la TV puede suceder luego del parto a través de la leche materna. Se estima que la vía oral y la mucosa gastrointestinal de un niño o niña que nació de una

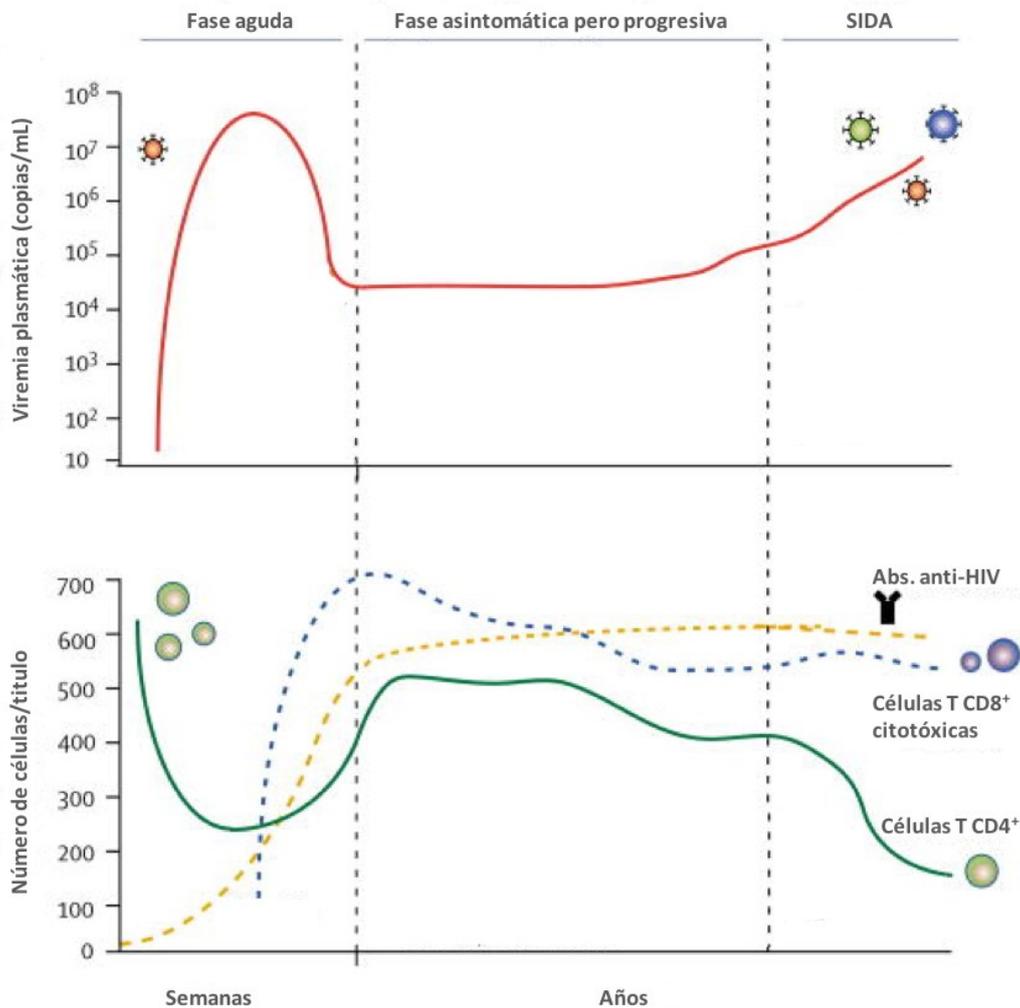
persona infectada con el HIV-1 está expuesta diariamente a través de la leche materna a al menos 700.000 partículas virales [52]. Sin embargo, la probabilidad de transmisión por esta vía se estima que varía entre 0,050% y 0,064% por cada litro de leche materna ingerida [53,54]. La baja frecuencia de transmisión durante la lactancia, a pesar de que la exposición al virus es elevada, sugiere la presencia de factores que restringen la replicación del virus en la leche materna y en el niño o niña expuesta al virus [55]. En este sentido, varios estudios reportaron que altos niveles de alfa-defensinas, IL-15, eritropoyetina, oligosacáridos, ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga y citotoxicidad celular mediada por anticuerpos (ADCC por sus siglas en inglés) están correlacionados con un descenso en el riesgo de transmisión de HIV-1 por amamantamiento. Cabe señalar que en la mayoría de los países desarrollados los infantes con exposición perinatal al HIV-1 reciben fórmulas de leche maternizada en lugar de leche materna. Por el contrario, en los países subdesarrollados o en vías de desarrollo, las guías de la OMS recomiendan la ingesta de leche materna durante los primeros 6 meses de vida en niños expuestos al HIV-1, en combinación con el TARVc en la persona que amamanta y el lactante [56]. Esto se debe, a que tiene mayor peso los beneficios que aporta la leche materna para la salud del niño o niña en cuanto a la prevención de causas de muerte infantil no relacionadas al HIV-1, que el riesgo de transmisión del HIV-1 [57]. En Argentina, se reemplazó la lactancia por leche formulada, la cual es provista de manera gratuita por el Programa de Prevención de VIH-Sida y Enfermedades de Transmisión Sexual del Ministerio de Salud de la Nación.

## **1.6. Curso natural de la infección viral**

En ausencia de TARVc, la mayoría de los individuos HIV-positivos avanzan hacia distintos estadios clínicos que son progresivamente más perjudiciales, pues el virus destruye gradualmente el sistema inmune hasta progresar al estadio más crítico que es el SIDA.

Hasta el momento, la infección por HIV-1 no tiene cura, aunque la eficacia de las drogas y esquemas antirretrovirales actuales retardan o evitan la progresión de la infección de un estadio al siguiente. De esta manera, los nuevos TARVc mejoran la morbi-mortalidad de la infección por HIV-1 y disminuyen las posibilidades de transmisión.

En la Figura 1.4 se ilustra el comportamiento general de las principales variables inmunológicas y virales durante el curso clínico de la infección por HIV-1 en ausencia de TARVc, el cual consta de tres estadios característicos que son los siguientes [58]:



**Figura 1.4. Curso normal de la infección por el HIV-1 en ausencia de TARVc.**

La primera etapa, fase aguda, de la infección por el HIV-1 se caracteriza por un rápido aumento de la CVp (arriba, representada por la línea continua en color rojo) y descenso en el número de células T CD4+ (abajo, representada por la línea continua en color verde), junto con una ausencia de anticuerpos específicos anti-HIV-1 (abajo, representada por la línea discontinua en color naranja). Al finalizar esta etapa, por un lado, la CVp disminuye hasta alcanzar un equilibrio y el número de células T CD4+ experimenta una pequeña recuperación y, por otro lado, el título de anticuerpos anti-HIV-1 y la respuesta citotóxica mediada por células T CD8+ (abajo, representada por la línea discontinua en color azul) alcanzan un pico. Superada la primera etapa, durante la fase asintomática, el recuento de células T CD4+ disminuye nuevamente de forma progresiva, al tiempo que la CVp permanece constante. Finalmente, si la infección no es contenida durante las primeras dos etapas, se produce un deterioro severo del sistema inmune, la progresión a SIDA y la muerte. La figura fue extraída y modificada del reporte de Simon *et al.* [59].

I. **Fase aguda:** Es el primer estadio de infección por HIV-1 y generalmente se desarrolla dentro de las semanas 2 a 4 pos-infección. Durante esta etapa, algunas personas pueden desarrollar síntomas asociados al virus de influenza, como ser fiebre, dolor de cabeza y rash. A lo largo de este estadio el virus se multiplica rápidamente y se disemina por el organismo, destruyendo células inmunitarias, principalmente a las células T CD4<sup>+</sup> [58]. Aproximadamente el 20% de las células T del tejido linfoide asociado al intestino se infectan dentro de los primeros 10 días y cerca del 60% de las no infectadas mueren por mecanismos de hiperactivación o efecto “*bystander*” (efecto de la infección de células vecinas). Así, antes del primer mes post-infección entre el 70 y 80% de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> del sistema inmune de mucosas mueren ya sea directamente por el efecto citopatogénico propio de la infección o de forma indirecta [60,61]. Durante esta etapa de la infección, los linfocitos T CD4<sup>+</sup> en circulación también experimentan un descenso importante y se observa la aparición de un pico de viremia [62]. En este periodo el nivel de virus es tan elevado que se incrementa el riesgo de transmisión. Sin embargo, todavía no se detectan anticuerpos específicos contra el HIV-1 y por eso se designa período de “ventana inmunológica”. Luego, con la aparición de los anticuerpos se produce una reducción considerable de la viremia [63,64], etapa que se denomina “seroconversión”. Alrededor de los 3 meses post-infección se alcanza un *plateau* en nivel de CVp y de células T CD4<sup>+</sup> circulantes, al que se llama estado estacionario o *set point*, y cuyo nivel tiene un valor predictivo sobre el curso clínico de la infección: un nivel elevado de CVp de *set point* se asocia con una progresión acelerada a SIDA [65].

II. **Fase Crónica:** Es el segundo estadio de infección por HIV-1, también se conoce como etapa asintomática. Durante esta etapa, el virus continúa multiplicándose en el organismo, pero a bajos niveles comparado con la etapa aguda de infección [58]. Si bien las personas en estadio crónico no presentan síntomas asociados a la infección, pueden transmitir el virus a otras personas. La gran mayoría de las personas adultas que transitan este estadio de infección en ausencia de TARVc progresan a SIDA en 10 o más años, aunque existen personas que progresan más rápidamente.

III. **SIDA:** Es el último estadio de la infección por HIV-1 y es donde el sistema inmune se encuentra tan severamente dañado que ya no puede hacer frente a nuevas infecciones oportunistas como la neumonía por *Pneumocystis carinii*, criptococosis y neoplasias características de pacientes inmunodeficientes, tales como el sarcoma de

Kaposi [66]. Se considera que una persona ha progresado a SIDA si el recuento de células T CD4<sup>+</sup> cae por debajo de 200 células/mm<sup>3</sup> o si presentan determinadas infecciones oportunistas (ver Tabla 1-1). En ausencia de TARVc, una persona adulta con SIDA tiene una esperanza de vida de aproximadamente 3 años [58].

**Tabla 1-1. Estadio inmunológico de la infección por HIV-1 basado en el número o porcentaje de células T CD4<sup>+</sup> por edad.**

Estadio <sup>a</sup>	Edad al momento del recuento de células T CD4 <sup>+</sup>					
	<1 año		1 a <6 años		≥6 años	
	células/uL	%	células/uL	%	células/uL	%
1	≥1.500	≥34	≥1.000	≥30	≥500	≥26
2	750-1.499	26-33	500-999	22-29	200-499	14-25
3	<750	<26	<500	<22	<200	<14

<sup>a</sup> El estadio se basa principalmente en el recuento de células CD4<sup>+</sup>. El recuento de células T CD4<sup>+</sup> tiene prioridad sobre el porcentaje de células T CD4<sup>+</sup>, y el porcentaje se considera sólo cuando no se cuenta con el dato del recuento absoluto [67].

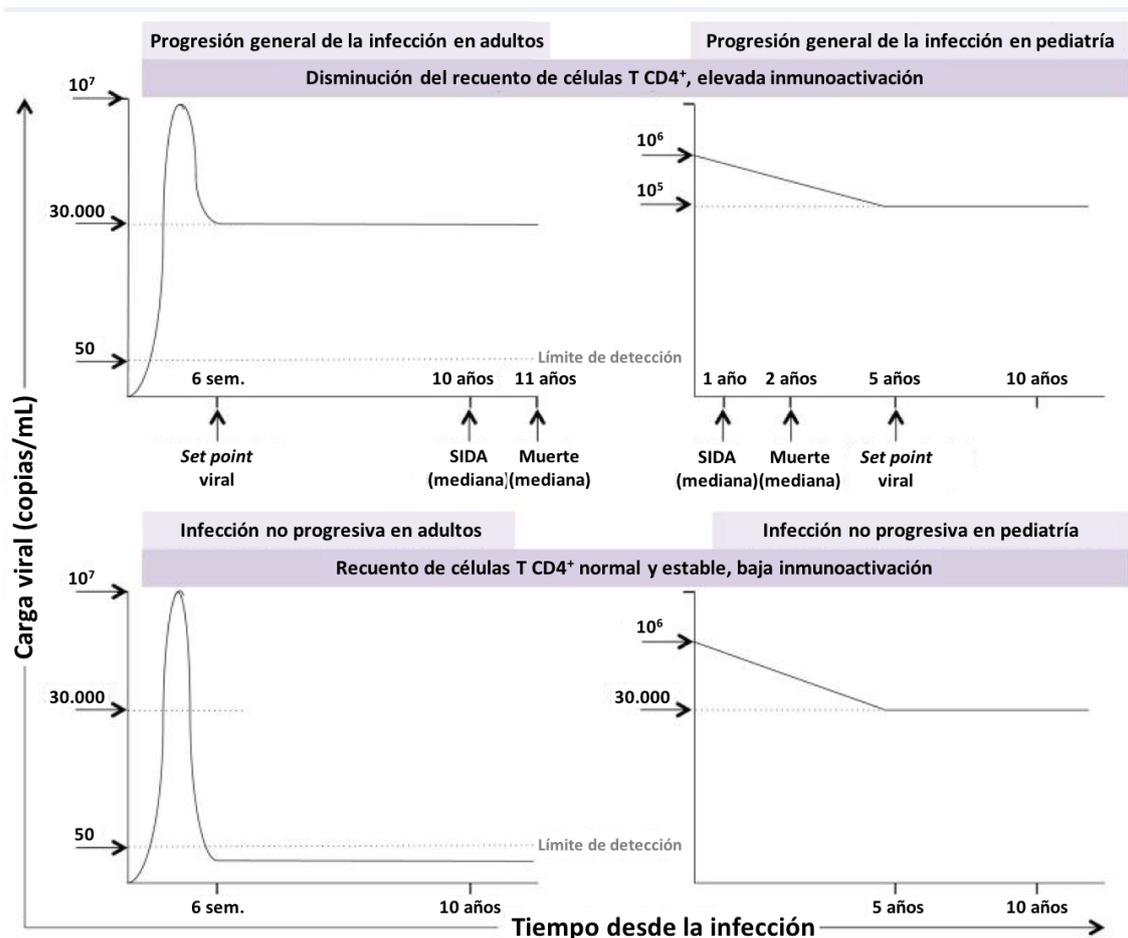
### 1.7. Inmunopatogenia en niños y sus diferencias con adultos

Una vez que la infección se establece, su progresión es generalmente más rápida en niñas y niños HIV-positivos que en adultos, con un descenso muy rápido del nivel de células T CD4<sup>+</sup>, la aparición de infecciones recurrentes, la falta de crecimiento y retraso madurativo [68]. El tiempo de vida medio en ausencia de TARVc en población adulta es de aproximadamente 11 años y este decrece cuanto mayor es la edad de seroconversión, mientras que en población infantil el 50% que contrajo el HIV-1 por TV muere a los 2 años de vida [69]. Asimismo, en poblaciones pediátricas el tiempo exacto de la transmisión del virus es un factor determinante del tiempo de vida medio. Así, según un estudio de meta-análisis, en el cual se incluyeron 12 trabajos con un total de 12.112 niñas y niños HIV-positivos mediante TV, la tasa de mortalidad al año de vida fue del 26% en quienes contrajeron el virus post-parto, a través de la lactancia, y del 52% en aquellos que lo contrajeron durante el parto [70]. Respecto de las infecciones intraútero, cabe resaltar que estas ocurren unas pocas semanas antes del parto [71], y que el curso de la enfermedad en estos bebés es sorprendentemente diferente de aquellos que se infectaron en el momento del nacimiento con un tiempo de vida medio de 208 días y 380 días respectivamente [72].

El recuento de células T CD4<sup>+</sup> y la CVp son marcadores clínicos bien establecidos de la progresión de la infección tanto para la población adulta como infantil, sin embargo, deben interpretarse de manera diferente en ambas poblaciones. Por un lado, el recuento de células T CD4<sup>+</sup> es tres a cuatro veces mayor en recién nacidos que en adultos y este disminuye gradualmente con la edad, alcanzando los niveles presentes en adultos después de aproximadamente 6 años de vida o más [73]. El porcentaje de células T CD4<sup>+</sup> es menos variable con la edad y se utiliza a menudo como un indicador de agotamiento celular en población pediátrica durante los primeros años de vida. Por otro lado, el nivel de CVp es generalmente más alto en niñas y niños HIV-positivos mediante TV que en población adulta y, el pico de viremia (que oscila entre 5 y 7 log<sub>10</sub> copias/mL) se observa alrededor de los 3 meses de vida [74]. Asimismo, el pico de viremia es más alto en los infantes que contrajeron el HIV-1 durante el parto, seguidos, en primer lugar, por aquellos que lo contrajeron en el útero [75] y, en segundo lugar, por quienes lo contrajeron después del nacimiento. Esto sugiere un mejor control de la replicación viral cuanto mayor es la madurez del sistema inmunitario [76]. Mientras que, en población adulta la CVp se estabiliza varias semanas post-infección [77], en infantes esta viremia persiste en niveles altos con una disminución muy lenta hasta alcanzar un *set point* después de varios años [78] (ver Figura 1.5). El control gradual de la replicación viral se ha asociado con el aumento de la maduración y el desarrollo del sistema inmunológico [79].

Existe un pequeño porcentaje de individuos HIV-positivos que en ausencia de tratamiento antirretroviral mantienen un nivel normal de células T CD4<sup>+</sup> y de las funciones inmunológicas y que por lo tanto no progresan a SIDA. El o los mecanismos que operan en dichos casos son muy diferente entre población adulta e infantil. En adultos, esta población no progresora que se conoce como “controladores de élite”, representa menos del 1% de los individuos HIV-positivos y se caracteriza por una respuesta T CD8<sup>+</sup> específica, eficaz y muy fuerte contra el HIV-1 [80], la cual, entre otras cuestiones, está asociada a la presencia de alelos protectivos del CMH (HLA-B27 y HLA-B57 principalmente) [81] que son significativamente frecuentes en esta población. Esta respuesta inmune conlleva un control satisfactorio de la viremia plasmática, es decir, el nivel de CVp alcanza valores inferiores al límite de detección (LD) de los ensayos comerciales, y en consecuencia permiten el mantenimiento del número de células T CD4<sup>+</sup>. Por el contrario, las niñas y los niños que no progresan a

SIDA en ausencia de tratamiento antirretroviral, mantienen un nivel normal de células T CD4<sup>+</sup> a pesar de tener una mediana de CVp de ~30,000 copias por mL (ver Figura 1.5) [73]. Además, la presencia de determinados alelos HLA de clase B que tienen un alto impacto en la progresión de la infección en población adulta, no presenta un rol significativo en infantes [82]. El mecanismo por el cual los no progresores pediátricos mantienen un nivel de inmunoadactivación bajo, aún en presencia de altos niveles de viremia, se desconoce.



**Figura 1.5. Dinámica de la CVp en población adulta y pediátrica HIV-1 positiva.**

Generalmente, en ausencia de TARVc, la CVp alcanza el estado de equilibrio considerablemente más temprano en poblaciones adultas HIV-positivas (dentro de las primeras 6 semanas) con respecto a poblaciones pediátricas, con una mediana de 10 años para desarrollar SIDA en los primeros y de tan solo 1 año en los segundos (paneles superiores). En contraste, las poblaciones adultas no progresoras, cuya prevalencia es inferior al 1%, se caracterizan por tener una CVp baja o no detectable y un bajo nivel de inmunoadactivación. Mientras que, las poblaciones pediátricas no progresoras, si bien también presentan bajo nivel de inmunoadactivación, la CVp permanece elevada (aproximadamente 30.000 copias/mL). La prevalencia de estas poblaciones pediátricas no progresoras varía entre un 5% a 10%. La figura fue extraída y modificada del reporte de Goulder *et al.* [83].

### *1.7.1. Respuesta inmune innata contra la infección por el HIV-1*

El HIV-1 es inicialmente reconocido por el sistema inmune innato a partir de los ácidos nucleicos virales presentes en el citosol de las células infectadas y en los endosomas de células fagocíticas [78]. El reconocimiento del virus en el citosol está mediado principalmente por los receptores de tipo RIG-1, mientras que en los endosomas actúan los receptores de tipo toll (TLRs por sus siglas en inglés), principalmente TLR-7 y TLR-9. En ambos casos, estos receptores actúan como sensores del virus mediante el reconocimiento de las moléculas de ARN de simple hebra del HIV-1. Este primer reconocimiento del virus que se da en macrófagos, monocitos y células dendríticas, produce la síntesis de citoquinas pro-inflamatorias y de interferones de tipo 1 (INFs). El IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$  son las principales moléculas efectoras antivirales. Estos INFs secretados por las células infectadas se unen a un receptor de superficie celular común, conocido como el receptor de interferón, tanto en la célula infectada como en las células no infectadas. A partir de esta interacción, en primer lugar, se desencadena una cascada de señalización que inhibe la replicación del virus en células no infectadas mediante la activación de genes que causan la destrucción de ARN mensajero e inhiben la traducción de proteínas virales [84]. En segundo lugar, se puede producir un incremento de la síntesis de moléculas del CMH de clase I en células recién infectadas por virus, lo que las hace más susceptibles al reconocimiento por células T CD8<sup>+</sup> citotóxicas. En tercer lugar, se activan linfocitos citolíticos, conocidos como células NK, que también contribuyen en el control de las infecciones virales mediante la secreción de citoquinas y quimiocinas, o bien mediante su acción citotóxica contra las células infectadas. Las células NK reconocen a las células infectadas a través de los anticuerpos unidos a la superficie de la misma, y desencadenan la respuesta ADCC. Se ha observado que las células NK aisladas en niñas y niños HIV-positivos mediante TV presentan una menor actividad citolítica comparado con niños HIV-negativos, y una respuesta ADCC inferior en relación a las células aisladas en población adulta [85,86].

Las células presentadoras de antígenos del sistema inmune innato no sólo juegan un papel importante en la inhibición de la replicación viral, sino también en la regulación de la respuesta inmune adaptativa contra la infección por HIV-1. Dentro de estas células, los macrófagos y células dendríticas estimuladas vía TLR son menos polifuncionales y producen menos INFs en neonatos HIV-positivos con respecto a los adultos HIV-positivos [87]. Aún así, no se observó en la población neonata HIV-

positiva un déficit de secreción de citoquinas pro-inflamatorias, sino más bien un perfil de citoquinas que moldea una respuesta inmune adaptativa diferente comparado con adultos HIV-positivos. Por lo tanto, en neonatos HIV-positivos la vía de diferenciación de células T CD4<sup>+</sup> se encuentra favorecida hacia Th2/Th17 en lugar de Th1 que es la que predomina en adultos HIV-positivos [88]. Esta inmunoregulación diferencial, no solo limita la secreción de citoquinas pro-inflamatorias Th1, que ante la exposición del neonato a nuevos antígenos en el útero podrían generar un efecto autoinmune, sino que además confiere al bebé una protección contra patógenos bacterianos y fúngicos.

La respuesta inmune adaptativa empieza a desarrollarse muy temprano luego de las primeras 9 semanas de gestación cuando las células T progenitoras pueblan el timo [89]. En niñas y niños HIV-positivos mediante TV se pueden detectar respuestas T CD8 específicas contra el HIV-1 desde el nacimiento, pero con una magnitud considerablemente inferior a la de personas adultas. En efecto, es la aparición de la respuesta T CD8 específica la que permite en adultos un rápido descenso de la CVp de aproximadamente tres logaritmos hasta alcanzar los niveles basales [90]. Durante esta respuesta, las células T CD8<sup>+</sup> citotóxicas que presentan en su superficie receptores T específicos, reconocen los péptidos virales expuestos en la superficie de las células infectadas con el HIV-1 a través de las moléculas del CMH. Y es debido a dicha interacción que algunos alelos HLA de clase I pueden llegar a afectar la progresión de la infección, como en el caso de los alelos B\*57 y B\*27 que están asociados a un control inmune efectivo y duradero de la infección [91], y por el contrario los alelos B\*35 y B7 están asociados a una progresión más rápida a SIDA [92,93]. El rol protector de los alelos B\*57 y B\*27 se debe principalmente a su especificidad por péptidos conservados e inmunodominantes de HIV-1, que provoca que la presión de selección ejercida a través de los CTL permita la selección de variantes virales que escapan al reconocimiento de estos epítopes específicos [94]. No obstante, este mecanismo de escape conlleva un elevado costo relacionado con la eficiencia replicativa del virus [95,96].

### *1.7.2. Inmunidad humoral: rol de anticuerpos neutralizantes en la infección por HIV-1*

Durante la etapa aguda de la infección por HIV-1 hay una respuesta inmune vigorosa que no puede contener la replicación del virus o el establecimiento de la latencia. En muchos casos, un solo virus fundador establece la infección y luego evoluciona dentro del huésped generando una población de virus diversa [97]. Los primeros cambios en la población de HIV-1 son impulsados por la respuesta CTL que es inducida a medida que aumenta la CVp [98], ya que dicha respuesta ejerce una fuerte presión de selección sobre el virus, lo que resulta en la renovación completa del conjunto de virus dentro de las primeras semanas de infección [99]. El desarrollo de las respuestas mediadas por anticuerpos sigue un patrón determinado, que inicia tempranamente con el surgimiento de anticuerpos antivirales que se detectan como complejos inmunes, seguidos por anticuerpos libres dirigidos a la subunidad gp41 de la envoltura del HIV-1 y luego con el desarrollo de anticuerpos de unión (BAbs, del inglés *binding antibodies*) a gp120 [100,101]. Si bien estos anticuerpos que surgen de forma temprana no neutralizan ni ejercen presión de selección sobre la evolución del virus, son capaces de mediar la fagocitosis de virus libre o de células infectadas, y la eliminación de células infectadas por la respuesta ADCC, mediante su dominio Fc [102]. Luego de semanas o meses posteriores al establecimiento de la infección surgen los primeros anticuerpos neutralizantes (NAbs, por sus siglas en inglés) que tienen la capacidad de prevenir la infección de células blanco por parte de variantes autólogas del HIV-1 solamente [64]. Con el transcurso del tiempo, ante la constante exposición antigénica se produce una maduración gradual de la afinidad de los NAbs, que se ve reflejada en un incremento en el título de los anticuerpos neutralizantes y un aumento en la afinidad hacia la proteína Env [103]. De esta forma se inicia una puja entre el virus que evoluciona para escapar a la neutralización y el sistema inmune que evoluciona para neutralizar las nuevas variantes virales de escape [104]. A partir de esta interacción y de un intenso proceso de hipermutación somática es que una minoría de individuos desarrolla NAbs capaces de reconocer virus heterólogos, conocidos como anticuerpos ampliamente neutralizantes (BNAbs, por sus siglas en inglés) [105,106].

Aproximadamente el 20% de las personas adultas HIV-positivas desarrolla BNAbs, los cuales surgen tardíamente durante la etapa crónica de la infección (2 a 15 años pos-infección) [105,107,108]. En contraste, más del 70% de los niños HIV-positivos desarrolla BNAbs, que asimismo son considerablemente más potentes que los observados en adultos [109] y aparecen tempranamente luego del primer año de vida

[110]. En adultos, el desempeño de los BNABs es el reflejo de la persistente maduración de la afinidad a largo plazo mediada por los altos niveles de hipermutación somática, y el surgimiento excepcional de inserciones y deleciones. En cambio, en niños aún no está claro el mecanismo por el cual se desarrollan los BNABs, aunque se conoce que el alto nivel de CVp sería uno de los factores implicados en dicho proceso, como así también factores propios de la TV [111]. En este sentido, diferentes estudios en macacos sugieren que los anticuerpos maternos adquiridos pasivamente por los bebés podrían tener un rol en el incremento de la respuesta mediada por NABs [112].

Las células T cooperadoras foliculares ( $T_{fh}$  por sus siglas en inglés) son un grupo especializado de células T  $CD4^+$  que se localizan en el centro germinal (CG) de los órganos linfoides secundarios, incluyendo las amígdalas, el bazo y los nódulos linfáticos, y ayudan a las células B en la maduración de la afinidad de los anticuerpos mediante hipermutación somática. Los órganos linfoides secundarios contienen numerosos linfocitos, separados en zonas definidas de células T y B. Solo los  $T_{fh}$  se encuentran en la zona B y están en su mayor parte del tiempo en estrecho contacto con ellas. La mayoría de los BNABs identificados hasta el momento presentan elevados niveles de hipermutación somática, lo que sugiere una respuesta  $T_{fh}$  eficiente en el CG [113]. En adición a la acción de las células  $T_{fh}$ , es importante la contribución de las células T foliculares regulatorias ( $T_{fr}$ ) para el incremento de la amplitud y potencia de los anticuerpos contra HIV-1. Las células  $T_{fr}$  surgen a partir de los precursores de células T reguladoras en el timo y contribuyen en la regulación y proliferación de células  $T_{fh}$  y B [114,115]. El balance  $T_{fr}/T_{fh}$  es importante para el control de la proliferación de células  $T_{fh}$  en el CG y así asegurar una respuesta humoral efectiva [116].

## **1.8. Terapia antirretroviral contra el HIV-1**

En 1997, por primera vez, mediante la combinación de tres drogas antirretrovirales -que incluyen diferentes blancos virales- fue posible llevar el nivel de HIV-1 en plasma por debajo del LD de los métodos comerciales disponibles (50 copias/mL) [117], mejorando así la eficacia general de la terapia [118]. Esta estrategia terapéutica que se denominó *highly active antiretroviral therapy* o HAART por sus siglas en inglés, es lo que hoy se conoce como TARVc. Con el advenimiento de estas

terapias el HIV-1 pasó de ser una infección fatal en el corto plazo a una infección crónica, donde el número de muertes asociadas al virus disminuyó significativamente [119]. Hoy en día, los pacientes que inician el tratamiento tempranamente y son adherentes al mismo tienen una esperanza de vida similar a la de personas HIV-negativas [120]. Inicialmente, el comienzo del TARVc se recomendaba solo para niños, niñas, adolescentes y personas adultas que habían progresado a SIDA, con síntomas relacionados al síndrome (estadio clínico C) [66] o con una supresión inmune severa (estadio inmunológico 3, ver Tabla 1-1) [121]. Sin embargo, hace varios años diversos estudios demostraron que el inicio temprano del TARVc está asociado a una mejora en la morbi-mortalidad, tanto en población pediátrica [122,123] como adulta [124,125]. Por ello, desde 2013 las guías internacionales recomiendan el inicio del TARV, tanto en niños, niñas y adolescentes como en población adulta, apenas se confirma el diagnóstico, independientemente del estado clínico, inmunológico o virológico [126,127]. Esto remarca la importancia de realizar el diagnóstico molecular de la infección por HIV-1 en población pediátrica lo más cerca posible del nacimiento. Los beneficios del inicio temprano incluyen el control efectivo de la replicación viral, que se correlaciona con una menor evolución del HIV-1, un mayor límite al establecimiento y expansión del virus en el organismo, como así también con preservar la respuesta inmune específica contra el virus [128–130].

Existen seis clases de drogas antirretrovirales que se diferencian de acuerdo al mecanismo de acción molecular: i) inhibidores nucleosídicos de la transcriptasa inversa (INTI), ii) inhibidores no nucleosídicos de la transcriptasa inversa (INNTI), iii) inhibidores de la proteasa (IP), iv) inhibidores de la integrasa viral (INSTI), v) inhibidores de la fusión, y vi) antagonistas de los correceptores del HIV-1 [131]. Los esquemas de inicio de TARVc según las guías locales e internacionales incluyen tres drogas pertenecientes a dos o más clases, o bien dos drogas si se incluye un INSTI en el primer esquema [132–134].

El TARVc modificó la dinámica de replicación del HIV-1 *in vivo*. Específicamente, se observó una disminución bifásica de la CVp luego del inicio del TARVc. La fase inicial se caracteriza por una rápida caída de la CVp dentro de las primeras 2 semanas de TARVc y supone una caída del 99% en los niveles de HIV-1 en circulación. Este brusco descenso es consecuencia, en gran parte, de la rápida disminución de virus libre (vida media  $\leq 6$  hs.) y células infectadas (vida media  $\leq 1.6$

días) [135,136]. La segunda fase se desarrolla más lentamente y comprende principalmente la muerte de macrófagos, células T CD4<sup>+</sup> parcialmente activadas y células dendríticas infectadas. La vida media de los macrófagos puede durar varias semanas, dependiendo del tipo de tejido en el que residen, y si bien son susceptibles a la infección por HIV-1, son más resistentes a los efectos citopáticos del virus que las células T CD4<sup>+</sup> [137].

A pesar de los beneficios del TARV, el mismo es de por vida y las personas que viven con el HIV siguen teniendo un riesgo más alto de presentar anomalías inmunológicas asociadas con el envejecimiento celular, denominado inmunosenescencia, entre ellas enfermedades cardiovasculares, cáncer, osteoporosis [138]. Estas anomalías se asemejan con cambios observados en el sistema inmune adaptativo en edades avanzadas. Además, el retraso en el diagnóstico perinatal, que aún es frecuente en nuestra región, conlleva al retraso en el inicio de TARVc en niños y adolescentes, lo cual podría acelerar el envejecimiento celular prematuro. El mecanismo patogénico que subyace al aumento de la senescencia aún no se conoce bien. La activación y la inflamación, debido a la persistencia de una pequeña fracción de viriones liberados desde células latentemente infectadas, podría estar jugando un papel clave en la vía senescente, y además provocar cambios en los mecanismos homeostáticos inmunes [139].

## **1.9. Reservorios del HIV-1**

Si bien el TARVc ha logrado modificar el curso clínico y el pronóstico de la infección por HIV-1, mejorando notablemente la supervivencia y calidad de vida de las personas que viven con este virus, por sí mismo no es curativo. Esto se debe al rápido establecimiento de variantes del HIV-1 con capacidad replicativa (no defectivas) en células de larga vida luego de la infección, donde el virus puede permanecer durante mucho tiempo en un estado de silenciamiento, conocido como latencia viral. Estas células infectadas escapan al reconocimiento por parte del sistema inmune y los antirretrovirales, y son las responsables del rebote de la CVp en ausencia de tratamiento, por lo que se las denominan reservorios del HIV-1 [140]. Hoy en día, estos reservorios representan la principal barrera contra la cura de la infección por HIV-1.

### 1.9.1. Latencia

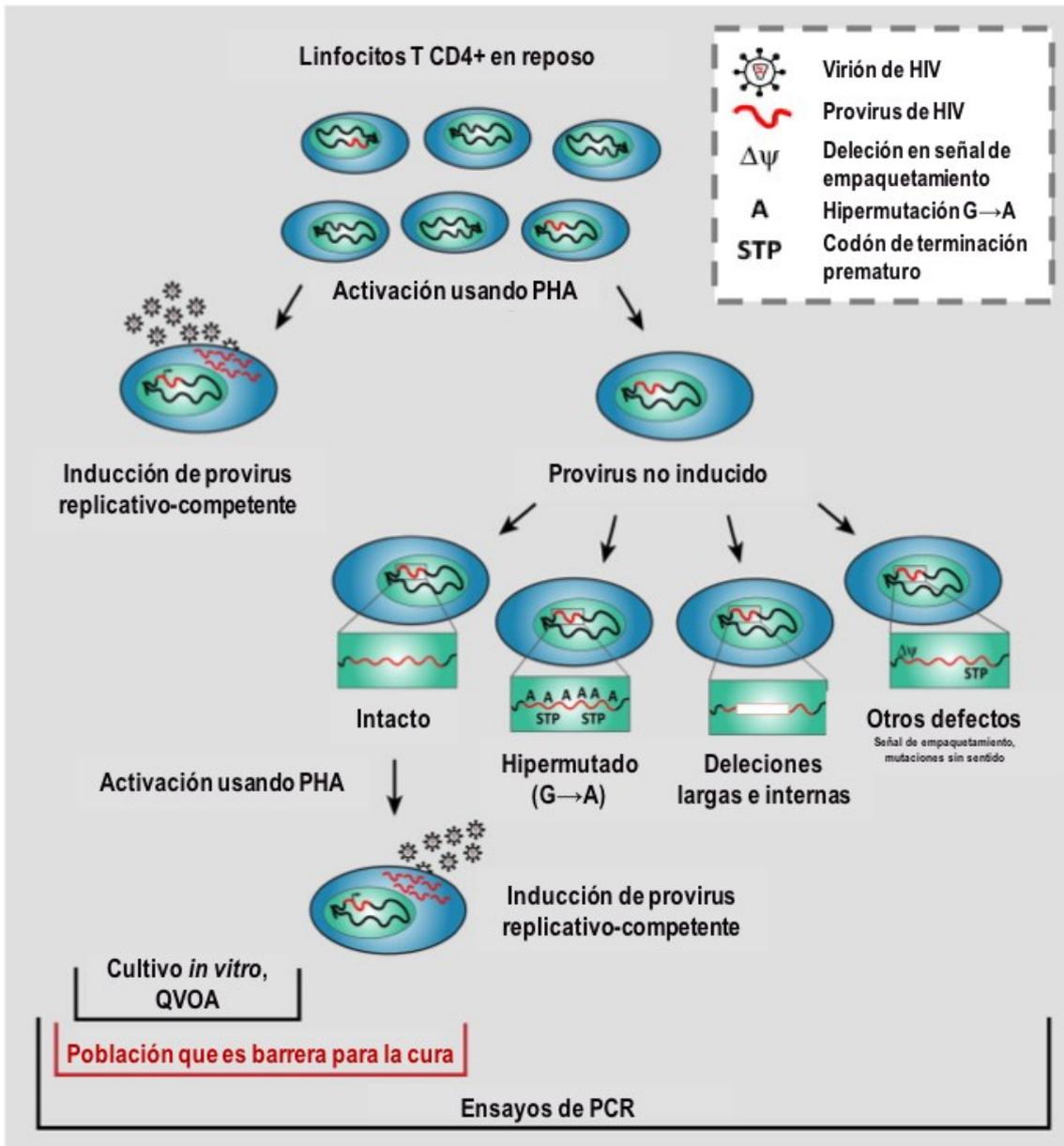
Existen varios mecanismos celulares que contribuyen con el establecimiento y la persistencia del HIV-1 latente. Entre los principales se encuentran la formación de estructuras compactas de cromatina (heterocromatina) sobre las LTR del HIV-1, que son mantenidas por la actividad de las histonas deacetilasas y otras proteínas regulatorias; y la ausencia de factores transcripcionales del hospedador necesarios para la transcripción del HIV-1, como ser NF $\kappa$ B y el factor de elongación de la transcripción PTEF-b [141]. Además de la latencia inducida por el nivel de condensación del cromosoma, existen mecanismos de regulación de la actividad transcripcional del HIV-1 mediada por los nucleosomas. Sorprendentemente, los nucleosomas nuc-0 y nuc-1 se forman dentro del 5'LTR del provirus, incluso cuando la integración sucede en regiones de eucromatina [142]. Estos nucleosomas ocupan los sitios de unión de varios factores de transcripción necesarios para la expresión génica del HIV-1 y de esta manera regulan la actividad transcripcional basal en el 5'LTR. La reactivación del provirus latente producida por estímulos externos está estrechamente asociada con la remodelación de nuc-1. El mantenimiento de nuc-1 depende del estado de acetilación de las histonas, por lo que los inhibidores de la histona deacetilasa promueven la remodelación efectiva de nuc-1 y en consecuencia la activación de la transcripción del HIV-1 [143].

La metilación del ADN es otro mecanismo que colabora con el mantenimiento de la latencia del HIV-1. Se observó que la metilación *in vitro* de las islas CpG que flanquean el sitio de inicio de la transcripción del HIV-1 conlleva a la latencia del virus [144]. Además, otro factor que contribuye a la latencia es la interferencia producida por la actividad promotora de la transcripción del hospedador que evita la transcripción efectiva del provirus [145].

### 1.9.2. Estimación del tamaño de los reservorios del HIV-1

La medición del tamaño del reservorio es compleja, ya que el número estimado de células infectadas con el HIV-1 que persisten a lo largo de varios años de TARVc efectivo es muy baja y difiere según la metodología empleada [146,147]. Aproximadamente 100-1.000 células T CD4<sup>+</sup> por millón presentan genomas de ADN de HIV-1 (ADN-HIV) (intactos y defectivos), pero sólo una pequeña fracción de dichos genomas es capaz de producir ARN-HIV (infectivo y no infectivo) y una fracción aún

menor es la que puede producir viriones capaces de infectar otras células (variantes con capacidad replicativa, ver Figura 1.6). Asimismo, estas variantes con potencial replicativo se pueden encontrar en distintos estados de latencia, siendo algunas de ellas fácilmente inducibles y cuantificables mediante técnicas de cultivo celular, mientras que otras requieren procesos de estimulación más complejos para revertir la latencia *in vitro* y por ende son difícilmente cuantificables [148]. Las metodologías de cultivo que permiten cuantificar el número de células infectadas que son capaces de liberar viriones se denominan en inglés *quantitative viral outgrowth assays* (QVOA) y son el método de referencia para la estimación del tamaño del reservorio del HIV-1 [149,150]. No obstante, es importante destacar que el QVOA tiende a subestimar el tamaño del reservorio, debido a que existe una fracción de células infectadas con variantes potencialmente replicativas que no pueden ser activadas *in-vitro*, y en consecuencia no son detectadas por el método. En contraste con el QVOA, las metodologías moleculares que miden las diferentes formas de genoma de ADN-HIV sobreestiman el tamaño real del reservorio, ya que detectan por igual aquellas variantes con y sin capacidad replicativa. Por lo expuesto, se puede afirmar que hasta el momento no se ha identificado un biomarcador confiable que permita medir de forma precisa el tamaño del reservorio circulante. Sin embargo, se reportó que las cargas de ADN-HIV total, integrado y episomal son marcadores importantes para la caracterización de los diferentes estadios de los reservorios [151]. Estos marcadores tienen la ventaja de poder ser medidos mediante metodologías accesibles y relativamente poco complejas de realizar en un laboratorio de biología molecular. Respecto a las formas episomales del HIV-1 como marcador del reservorio, cabe mencionar que surgen como consecuencia de un proceso de replicación fallido, en donde el genoma de doble hebra de ADN de HIV-1 en lugar de integrarse al genoma de la célula infectada se circulariza. Esta circularización del genoma de ADN-HIV puede surgir como consecuencia de la recombinación homóloga o la ligación de las dos LTR flanqueantes, dando lugar a los círculos de 1-LTR o 2-LTR, respectivamente [152,153]. Los círculos de 2-LTR se pierden muy rápido en la población de células en división, por lo que su presencia sería un indicador de nuevas infecciones o una replicación viral en curso [154,155]. Otro de los marcadores que permite evaluar la activación de los reservorios virales es el ARN-HIV intracelular en sus dos formas: ARN-HIV no procesado y procesado. Hasta el presente, la medida de este marcador es la única que ha presentado una fuerte asociación con el tiempo de remisión virológica en ausencia de TARVc [156].



**Figura 1.6. Perfil de los diferentes tipos de provirus que se pueden encontrar en las células T CD4<sup>+</sup> en reposo.**

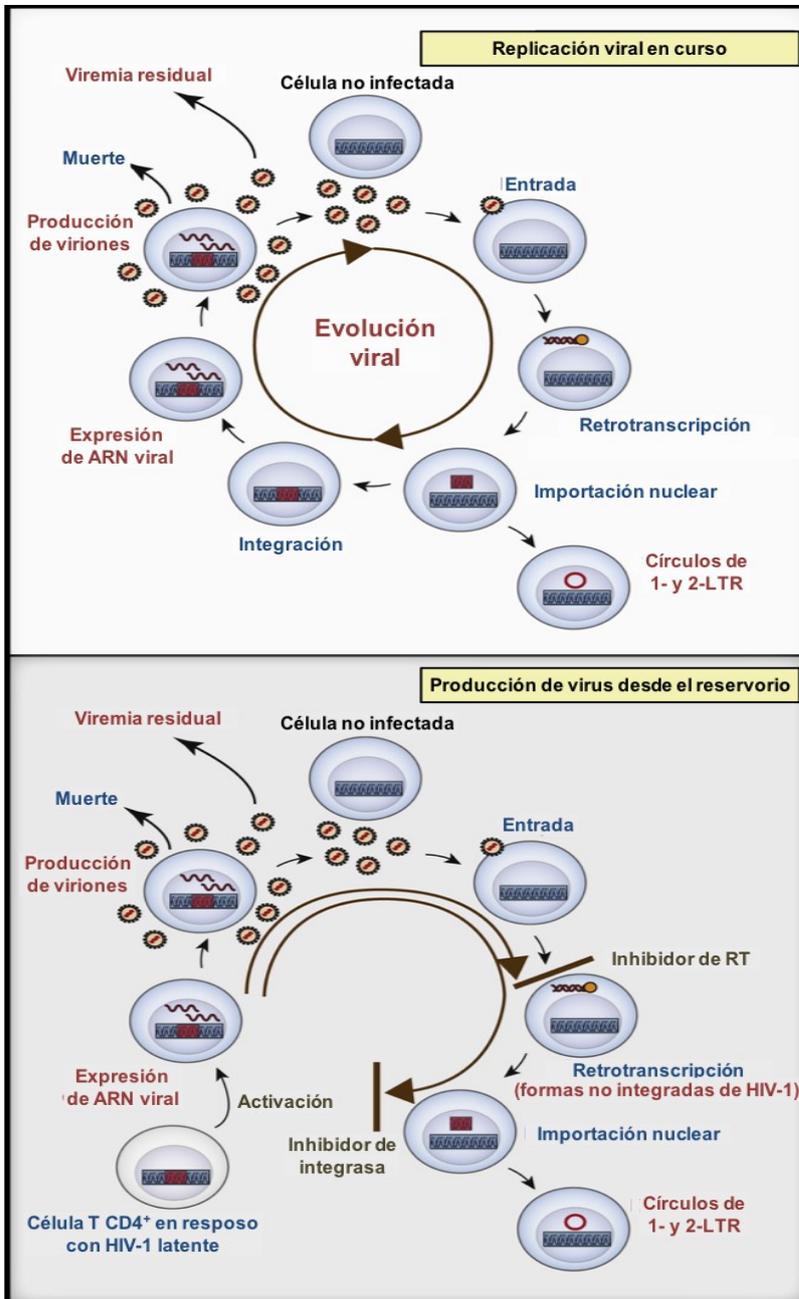
Se determinó mediante ensayos *in vitro* que luego de una primera ronda de activación, mediada por fitohemaglutinina (PHA), las células T CD4<sup>+</sup> en reposo infectadas con HIV-1 son capaces de producir viriones, que tienen la capacidad de infectar otras células (viriones replicativo-competentes). Sin embargo, la gran mayoría de los provirus no son inducidos luego de dicha ronda de activación. Esto se debe, por un lado, a que la mayoría de los provirus no inducidos son defectivos, es decir, presentan largas delecciones internas, hipermutaciones G → A, entre otros defectos. Por otro lado, existe una pequeña proporción de provirus no inducidos que presentan un genoma completamente funcional, y que luego de sucesivas rondas de activación son capaces de producir viriones. Estos provirus funcionales no inducidos son difícilmente cuantificables mediante QVOA, mientras que los ensayos de PCR son capaces de detectar dichos provirus como así también el resto de los provirus. La figura fue extraída y modificada del reporte de Bruner *et al.* [146].

### *1.9.3. Mantenimiento del reservorio de HIV-1*

En la actualidad, aún se encuentra en debate si el TARVc detiene por completo la replicación del HIV-1. Esto se debe a que si bien, los tratamientos antirretrovirales actuales suprimen la CVp hasta valores que están por debajo del LD de los ensayos comerciales (<20-50 copias/mL), se detectó en pacientes bajo TARVc efectivo muy bajos niveles de virus en plasma, mediante ensayos de alta sensibilidad (1 copia/mL) [157–159]. Este bajo nivel de virus en plasma, bajo TARVc efectivo, se conoce como viremia residual. La viremia residual por sí misma no es evidencia de replicación viral bajo TARVc. Los TARVc actuales tienen la capacidad de inhibir la unión y fusión, transcripción reversa, integración o maduración de las partículas virales luego de ser liberadas hacia el exterior de la célula infectada. Sin embargo, estos TARVc no son capaces de evitar la transcripción del provirus, su traducción, ni tampoco el ensamble y exocitosis de las partículas virales, por lo que en consecuencia no previenen la producción o liberación de virus en las células latentemente infectadas.

El hecho de que actualmente no se pueda determinar de forma conclusiva si hay replicación viral bajo TARVc, y en consecuencia si este es uno de los mecanismos involucrados en el mantenimiento de los reservorios del HIV-1, radica en que la mayoría de los marcadores de replicación viral también reflejan la producción de virus a partir de los reservorios latentes (ver Figura 1.7). Sin embargo, determinados marcadores virológicos se manifiestan de forma diferencial cuando el virus replica y cuando el virus se produce a partir de la activación de células latentemente infectadas. Algunos de estos marcadores son los productos lábiles del proceso de transcripción inversa, como ser los genomas de ADN lineales no integrados y los círculos de 1- y 2-LTR. Se ha reportado que las formas lineales no integradas de ADN de HIV-1 son inestables, ya que pueden ser degradadas por las exonucleasas celulares [160,161]. Por ello, su detección en pacientes con TARVc efectivo podría ser un indicador de infección reciente, y, en consecuencia, un marcador de replicación viral residual. No obstante, la estabilidad de estas formas episomales es controversial, tal como se mencionó anteriormente, y por lo tanto su función como marcador esta en duda. Por otro lado, es importante considerar que las formas de ADN viral no integrado pueden producirse también a partir de la activación de células infectadas en estado de latencia en pacientes con TARVc que incluyan inhibidores de la integrasa como principal efector de la respuesta antiviral (ver Figura 1.7). Por lo tanto, su medición no proporciona de manera

inequívoca evidencia de replicación residual en todos los pacientes bajo TARVc efectivo.



**Figura 1.7. Diferencias entre replicación viral en curso y producción de virus desde el reservorio.**

Los parámetros evaluados para determinar si existe replicación viral bajo TARVc se muestran en rojo, e incluyen la expresión de ARN viral, viremia residual, formas lineales no integradas, círculos de 1- y 2-LTR, y la acumulación de mutaciones (evolución viral). De acuerdo al régimen antirretroviral la mayoría de estos parámetros no distinguen entre replicación viral residual y activación de células infectadas con HIV-1 latente. En el caso de los TARVc basados en INSTI todos estos parámetros pueden estar presentes a excepción de evolución viral. Este último parámetro es el único marcador inequívoco de replicación viral residual. La figura fue extraída y modificada del reporte de Eisele *et al.* [140].

La progresiva acumulación de cambios en el genoma de HIV-1, debido en gran medida a la elevada tasa de error de la transcriptasa inversa, es una característica inevitable de la replicación de HIV-1 [162]. Por lo tanto, la evidencia de evolución viral bajo TARVc efectivo sería un claro marcador de replicación viral. Recientemente, Lorenzo-Redondo *et al.* [163] reportaron la presencia de replicación viral bajo TARVc efectivo en nódulos linfáticos y el subsiguiente tráfico de dichas nuevas células infectadas al torrente sanguíneo. Si bien este trabajo se encuentra en sintonía con otros pocos trabajos previos [164,165], la mayoría de los estudios realizados hasta el momento no encontraron evidencia de evolución bajo TARVc efectivo [166–169]. Al contrario de los resultados reportados por Lorenzo-Redondo y colaboradores, todos estos últimos trabajos aportaron clara evidencia acerca de que la persistencia y proliferación homeostática de células infectadas previo al TARVc son los principales mecanismos de persistencia de los reservorios.

Entendiendo que aún resta alcanzar un mayor conocimiento sobre los mecanismos involucrados en el mantenimiento de los reservorios, sobre todo en poblaciones pediátricas, se abordará en el presente trabajo dicha problemática.

#### **1.9.4. Cura**

Actualmente, existen dos modelos de cura del HIV-1, uno basado en la completa eliminación del reservorio viral, denominado cura “esterilizante”, y otro basado en la ausencia de replicación viral, aún en presencia de genomas virales latentes y/o defectivos, la cual se denomina cura “funcional”. Desde el advenimiento de la epidemia de HIV-1 hasta el presente, solo existe un caso de cura “esterilizante”, conocido como “el paciente de Berlín” [170]. El paciente, recibió un trasplante alogénico de células madre (HSCT por sus siglas en inglés) de un dador homocigota para la variante defectiva del gen CCR5 (denominada CCR5  $\Delta 32$ ), el cual codifica para uno de los dos principales co-receptores de ingreso del HIV-1 a las células blanco. Cabe mencionar, que el trasplante fue indicado para el tratamiento de la leucemia que presentaba el paciente. Recientemente, se reportó otro caso de posible cura en Londres, en donde un paciente HIV-positivo y bajo TARVc recibió un HSCT de un donante CCR5  $\Delta 32/\Delta 32$  para el tratamiento de un linfoma de Hodgkin. El paciente suspendió el TARVc luego de 16 meses pos-trasplante y estuvo 18 meses con niveles indetectables del virus en

plasma en ausencia de TARVc [171]. En pediatría, se reportó de manera inicial un caso de cura en EE. UU, donde una bebé HIV-positiva mediante TV inició TARVc a las 30 horas de vida, ya que la madre no pudo realizar la profilaxis antirretroviral [172]. La bebé logró tener CVp no detectable al mes de inicio del TARVc, pero luego de 18 meses abandonó dicho tratamiento. A pesar de ello, la CVp se mantuvo indetectable hasta los 27 meses de haber suspendido la medicación, momento en que tuvo un rebote de la carga viral (con CVp detectable en por lo menos dos muestras consecutivas) [173]. Este último caso fue muy conocido debido a las expectativas que generó alrededor de una posible cura del HIV-1 bajo TARVc, tal es así, que a este caso hoy se lo conoce internacionalmente como “*Mississippi baby*”. Si bien esta paciente no logró la cura, el estudio en muestras muy cercanas al nacimiento permitió demostrar, por un lado, que el establecimiento del reservorio viral ocurre muy tempranamente, como se demostró en estudios en primates [112], y por otro lado, el TARVc temprano limita el tamaño del reservorio.

Por otro parte, como se mencionó anteriormente, existen controladores de élite que mantienen un control adecuado de la infección, con cargas virales indetectable y sin deterioro inmunológico evidente durante períodos prolongados en ausencia del TARVc [174]. A pesar de que, estos individuos logran un control efectivo de la replicación viral, aún es tema de debate médico si requieren o no iniciar TARVc, porque presentan mayores niveles de activación celular e inflamación comparados con individuos HIV-negativos. También, en algunos casos se ha descrito el desarrollo de inmunodeficiencia y progresión clínica de la infección a largo plazo.

Otro grupo con características particulares, son aquellos pacientes adultos que comenzaron el TARVc en forma muy temprana en el curso de la infección aguda, y que luego de interrumpir el tratamiento mantuvieron la CVp no detectable durante varios años. A dichos individuos se los conoce en inglés como *post-treatment controllers* [175]. Recientemente, se ha informado sobre un caso de TV en Francia, en el que un niño con diagnóstico confirmado por detección de ADN-HIV y CVp  $>6 \log_{10}$  copias/mL inició TARVc al tercer mes de vida; dicho tratamiento fue suspendido por la familia alrededor de los 6 años de edad, pero luego de más de 11 años sin tratamiento continúa con CVp indetectable [176]. Estos casos, que logran el control de la replicación en ausencia de TARVc, se los considera casos de “cura funcional” o remisión virológica sostenida.

Es muy probable que una única estrategia no sea suficiente para alcanzar la cura de la infección por el HIV-1. Sin embargo, hoy en día se encuentran en curso distintas líneas de investigación muy promisorias centradas en la cura del HIV-1. Una de estas líneas busca determinar si las infusiones o inyecciones periódicas de BNABs pueden prevenir la adquisición del HIV-1, así como suprimir el virus en las personas HIV-positivas [177,178]. Otra línea de investigación tendiente a la cura del HIV-1 y que ha sido muy estudiada en los últimos años, es el uso de una combinación de agentes reversores de la latencia, para reactivar y eliminar el virus presente en los reservorios.

Dilucidar los factores del hospedador y del virus, que son claves para controlar la infección, permitirá desarrollar modelos predictivos para identificar pacientes candidatos para la suspensión del TARVc o nuevas estrategias de cura. Por ello, entre los principales objetivos del presente trabajo se encuentra el de profundizar en el conocimiento del comportamiento de los reservorios del HIV-1 en niños, niñas y adolescentes con TARVc temprano, efectivo y sostenido. De este modo, se busca identificar los determinantes que influyen en el establecimiento y mantenimiento de los reservorios y, posiblemente en la remisión virológica sostenida en ausencia de TARVc.

## **2. OBJETIVOS**

## **2.1. Objetivos generales**

A pesar de la eficacia del TARVc en el control de la replicación del HIV-1 en el plasma, la erradicación del mismo aún no es posible. El principal obstáculo en la cura del HIV-1 es el rápido establecimiento y la permanencia indefinida de los reservorios virales. Es por esto, que el estudio de dichos reservorios podría aportar evidencia acerca de la respuesta de los pacientes frente a nuevas estrategias terapéuticas, además de poder predecir el éxito de la remisión virológica al interrumpir el TARVc efectivo.

En los últimos años, si bien se iniciaron diferentes estudios para caracterizar los reservorios del HIV-1, principalmente en poblaciones adultas, resultan escasos aún los reportes en población pediátrica. La hipótesis del presente trabajo plantea que cuanto más temprano es el inicio del TARVc efectivo, mayor es la limitación al establecimiento del reservorio de HIV-1 y, al mismo tiempo, mayor es la dinámica de decaimiento del mismo bajo SV sostenida. Asimismo, se plantea que durante la SV el principal mecanismo de persistencia del reservorio es la proliferación de células latentes e infectadas previo al inicio del TARVc.

El objetivo general de este trabajo es determinar la dinámica de establecimiento y mantenimiento del reservorio de HIV-1, a partir del desarrollo de metodologías para la medición del tamaño y la caracterización de las variantes virales de los reservorios, adaptadas a las cepas circulantes en nuestra región. Al tiempo que, mediante estos estudios, se podrá determinar la influencia del perfil inmunológico, y el tipo y tiempo de respuesta al TARVc en la dinámica de los reservorios.

## **2.2. Objetivos específicos**

I. Diseñar, desarrollar y evaluar el desempeño de metodologías cuantitativas de diferentes marcadores moleculares, para la caracterización de los reservorios del HIV-1:

- PCR en tiempo real para la medición de las diferentes formas de genoma de ADN-HIV: total y círculos de 2-LTR.

- PCR en tiempo real para la medición de los transcritos no procesados de HIV-1.

II. Estudiar el impacto de la eficacia del TARVc en el tamaño de los reservorios del HIV-1, mediante la evaluación de dos grupos de niñas y niños HIV-positivos mediante TV, en donde uno presentó una respuesta favorable al TARVc (respondedores, R) y el otro no (no respondedores, NR).

- Determinar la diferencia entre los grupos R y NR en la evolución del nivel de ADN-HIV total previo y posterior al inicio de TARVc.
- Determinar qué correlación hay entre los niveles de ADN-HIV y CVp antes y después del inicio de TARVc.

III. Estudiar la dinámica del tamaño de los reservorios del HIV-1 en niñas y niños con supresión viral sostenida y determinar el impacto de la edad de inicio de la supresión viral en el decaimiento de dichos reservorios.

- Establecer la dinámica del nivel de ADN-HIV total y de la frecuencia de círculos de 2-LTR.
- Determinar en que medida la edad de inicio de TARVc y de supresión viral afectan la dinámica de los niveles de ADN-HIV total y de círculos de 2-LTR.
- Estudiar en qué medida la aparición transitoria de virus en el plasma, durante la supresión viral sostenida, afecta la dinámica del tamaño de los reservorios del HIV-1.

IV. Estudiar los mecanismos de persistencia del reservorio de HIV-1 en circulación, mediante la evaluación de patrones de replicación viral y expansión clonal en niñas y niños HIV-positivos mediante TV, que alcanzaron la supresión viral tempranamente y que perduraron en dicha condición por más de 6 años.

- Evaluar el decaimiento en los niveles de ADN-HIV total y círculos de 2-LTR, y determinar la actividad transcripcional del virus, mediante la medición del nivel de ARN-HIV no procesado.
- Evaluar en que medida la señal de anticuerpos anti-HIV-1 varía durante la supresión viral sostenida.
- Determinar la existencia de replicación viral bajo TARVc efectivo, mediante el estudio de la evolución genética del reservorio latente en circulación.

- Evaluar la dinámica de las variantes virales durante la supresión viral sostenida y determinar la estabilidad de las variantes presentes previo al inicio de dicha condición.

### **3. MATERIALES Y** **MÉTODOS**

### **3.1. Cronología del proceso metodológico**

En primera instancia se realizó el diseño experimental, mediante el cual se evaluaron, seleccionaron y estratificaron los pacientes a incluir en el estudio, de acuerdo a los objetivos planteados. En esta etapa también se determinaron las metodológicas y los análisis estadísticos necesarios para el desarrollo del presente trabajo. En segunda instancia, se diseñaron, desarrollaron y validaron los ensayos de PCR en tiempo real cuantitativos, para la estimación del tamaño del reservorio de ADN y ARN circulante del HIV-1. Es importante mencionar, que dichos ensayos se fueron optimizando constantemente en cuanto a la sensibilidad, ya que en gran medida se estudiaron pacientes con CV indetectables durante varios años. Durante esta segunda etapa también se evaluó el desempeño de las metodologías, esto es la eficiencia de amplificación, rango dinámico y reproducibilidad, y se realizó la estandarización de los ensayos desarrollados. Una vez determinado el desempeño de cada metodología, se procedió al estudio de los distintos grupos de pacientes. Con estos resultados y diferentes datos clínicos que fueron recolectados en paralelo, se crearon distintas bases de datos. Finalmente, a partir de estas bases de datos se realizaron distintos análisis estadísticos con el objetivo de determinar la veracidad de las hipótesis planteadas en este trabajo.

### **3.2. Grupos de Estudio**

Se estudiaron muestras de sangre periférica de niños, niñas y adolescentes HIV-positivos mediante TV, que nacieron entre 1990 y 2014, y que concurrieron al Hospital de Pediatría "Prof. Dr. Juan P. Garrahan" para el diagnóstico de la infección perinatal y/o seguimiento de la infección por HIV-1. De todos ellos se obtuvo el consentimiento informado de los padres o tutores. Asimismo, este estudio cuenta con la aprobación del Comité Revisor y de Ética en Investigación del Hospital de Pediatría "Prof. Dr. Juan P. Garrahan" (Protocolo: 856/2015).

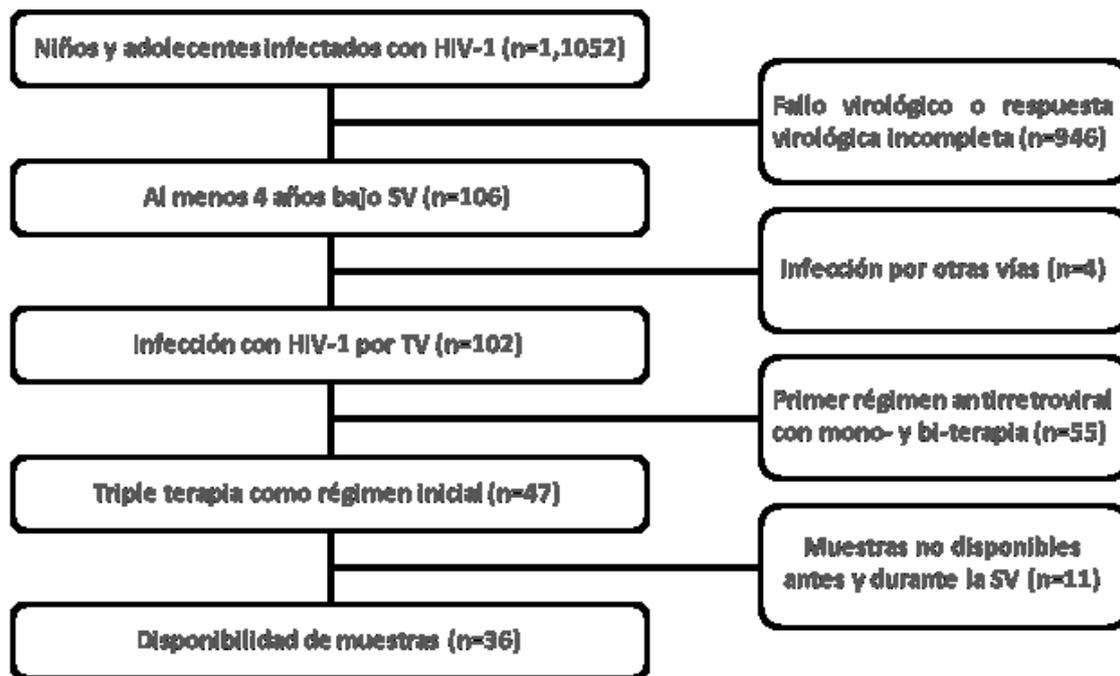
El diagnóstico precoz de la infección por el HIV-1 se realizó siguiendo los criterios establecidos por el CDC [179]. Las niñas y los niños menores de 18 meses de edad que presentaron dos determinaciones separadas de PCR con resultado positivo para la detección de HIV-1, fueron considerados HIV-positivos. Mientras que las niñas

y los niños con edad igual o superior a los 18 meses que presentaron detección de anticuerpos anti-HIV-1 en el suero fueron considerados HIV-positivos.

La selección de los pacientes y muestras, de acuerdo a los criterios de inclusión que se describen en los párrafos siguientes, se realizó mediante el uso del Sistema Informático Garrahan, que reúne las historias clínicas informatizadas de los pacientes, y de la herramienta informática SISGEN-HIV, que interactúa con la primera y constituye una base de datos personalizada con información epidemiológica y de laboratorio de los pacientes HIV-positivos. La cohorte de pacientes HIV-positivos al momento del estudio y sobre la cual se realizó la selección fue de 1052 pacientes.

I. Para evaluar el impacto de la respuesta al TARVc en el tamaño de los reservorios del HIV-1, se estudiaron de forma longitudinal 18 pacientes pediátricos HIV-positivos mediante TV y que nacieron entre 2003 y 2013. Por cada paciente se estudió una muestra previa al inicio de TARVc (pre-TARVc) y una o dos muestras durante el TARVc (pos-TARVc). Los pacientes fueron agrupados de acuerdo a la respuesta al TARVc: respondedores (R) y no respondedores (NR). Se definieron como R a niñas y niños que alcanzaron CVp indetectables durante el primer año de inicio del TARVc, es decir, que presentaron una respuesta efectiva al TARVc; y NR a aquellos que no alcanzaron dicha condición.

II. Para estudiar el impacto de la edad de inicio de la SV sostenida en la dinámica del tamaño del reservorio de HIV-1, se estudiaron longitudinalmente, al inicio de la SV (pre-SV) y durante al menos 4 años de SV, 36 niños, niñas y adolescentes HIV-positivos mediante TV. Estos pacientes fueron seleccionados de acuerdo a los criterios de inclusión que se detallan en la Figura 3.1. Los mismos fueron agrupados de acuerdo a la edad a la que alcanzaron la SV: Grupo 1 inició la SV durante la edad de 1,5 años, Grupo 2 entre más de 1,5 años y hasta 5 años, y Grupo 3 superado los 5 años. La edad de inicio de la SV sostenida se definió como la edad a la cual se alcanzaron dos CVp consecutivas debajo del límite inferior de cuantificación (LIC); y el mantenimiento de dichos niveles se consideró como mantenimiento de la SV. La aparición transitoria de niveles detectables, pero no mayores a 1.000 copias/mL, durante la SV fueron admitidos, sólo si la siguiente CVp fue indetectable.



**Figura 3.1. Población de estudio.**

En los recuadros de la derecha se detallan los criterios de exclusión y el número de pacientes excluidos de acuerdo a cada criterio.

III. Para el estudio del establecimiento y de la dinámica del tamaño del reservorio de HIV-1 durante SV sostenida de largo plazo, se estudiaron longitudinalmente (previo al inicio de TARVc, al inicio de la SV, y durante al menos 6 años de SV) 5 niñas HIV-positivas mediante TV, que nacieron entre 2000 y 2009, y que iniciaron TARVc y alcanzaron la SV antes del año de vida.

### **3.3. Obtención, preparación y almacenamiento de muestras clínicas**

A partir de muestras de sangre periférica obtenidas de forma estéril y anticoaguladas con EDTA-tripotásico 5%, se separó el plasma mediante centrifugación a 1.500 rpm durante 20 minutos. El plasma se almacenó a -80°C hasta su posterior utilización en la extracción de ARN. Subsiguientemente, se diluyó el paquete celular remanente y se aislaron las células mononucleares totales (CMT) mediante centrifugación en gradiente de Ficoll-Hypaque. Se recogió la interfase enriquecida en células mononucleares, se realizó un lavado con solución fisiológica y se eliminó el exceso de glóbulos rojos mediante incubación con buffer de lisis (Tris-CNH<sub>4</sub>).

Posteriormente, se efectuó el recuento de células en un contador hematológico (CELL-DYN, Abbott) y se recolectó una fracción de entre 2 a 5 millones de células, que se precipitó y almacenó a -20°C para su posterior utilización en la extracción de ADN. En aquellos casos donde se requería cuantificar el ARN-HIV no procesado, una fracción superior a los 5 millones de CMT se resuspendió en 1 mL de dimetilsulfóxido 10% en suero fetal bovino, y se almacenaron en N<sub>2</sub> líquido (<-135°C).

### 3.3.1. Extracción de ADN en CMT

Para la extracción de ADN se utilizaron dos metodologías. Una consistió en el uso de las columnas comerciales *QIAamp DNA Mini Kit* (QIAGEN), siguiendo las instrucciones del fabricante. La segunda se basó en la metodología de precipitación salina descrita por Miller *et al.*[180]. Esta consistió, brevemente, en lisar los leucocitos durante al menos 3 horas a 55°C con una solución de Tris-HCl 10 mM, NaCl 50 mM, EDTA 10 mM, SDS 2 % y Proteinasa K 0,1 mg/mL (Qiagen); eliminar las proteínas mediante precipitación salina con NaCl 5M; y finalmente, el ADN se precipitó con isopropanol y etanol 70 %. El ADN se conservó a -20 °C hasta su utilización.

### 3.3.2. Extracción de ARN en CMT y plasma

Para la extracción de ARN-HIV se descongelaron a 37°C durante 10 minutos los viales de CMT almacenados en N<sub>2</sub> y se lavaron en medio de cultivo RPMI. En primera instancia, el pellet de CMT se resuspendió en 1 mL de *TRI Reagent* (SIGMA) [incubación de 5 minutos a temperatura ambiente (TA)]. A partir de dicho punto el tubo permaneció en hielo en todo momento; los procesos de centrifugación se realizaron a 12.000 xg y 4°C; y los lavados consistieron en la adición de etanol 75%, el posterior centrifugado del tubo durante 10 minutos y el descarte del sobrenadante. Luego, se adicionaron 0,2 mL de cloroformo (incubación de 5 minutos a TA) y se centrifugó durante 15 minutos. La fase acuosa superior se traspasó a un tubo nuevo al que se le adicionaron 0,5 mL de isopropanol 100% (incubación durante toda la noche a -20°C). Al día siguiente, el tubo se centrifugó durante 30 minutos y se realizó un lavado. Al pellet se le agregaron 0,3 mL de H<sub>2</sub>O de calidad Milli-Q (incubación 10 minutos a TA), 0,03 mL de acetato de sodio y 0,75 mL de etanol 100% frío (incubación 1 hora a -20°C), se centrifugó durante 30 minutos y se realizó un lavado. El pellet se incubó a TA

durante 5 minutos para eliminar el exceso de etanol. Finalmente, el pellet se resuspendió en 20  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O de calidad Milli-Q.

En cuanto a las muestras de plasma, las mismas se descongelaron en hielo, se transfirieron 500 mL a un tubo nuevo y se centrifugaron a 24.000 xg y a 4°C durante una hora. Se descartó la totalidad del sobrenadante y se resuspendió el pellet en 1 mL de *TRI Reagent*. Luego, se procedió exactamente igual que con las muestras de CMT descritas anteriormente.

### **3.4. Diseño de ensayos de PCR en tiempo real para la cuantificación del reservorio de HIV-1 circulante**

#### *3.4.1. Diseño y selección in silico de cebadores y sondas*

A partir de un panel de cebadores específicos contra diferentes regiones del genoma de HIV-1 utilizado en estudios previos, se seleccionaron aquellas duplas que presentaron una mayor compatibilidad y especificidad. En primer lugar, se analizó la especificidad de cada cebador individualmente. Para ello, se utilizó la herramienta *Sequence Search Interface* (Los Alamos National Laboratory) para descargar y alinear todas las secuencias reportadas para la región *ltr/gag* de los subtipos circulantes en nuestra región: B, BF y las formas recombinantes CRF12\_BF y CRF17\_BF. A partir de dicho alineamiento, se identificó la región de unión de cada cebador y se determinó la variabilidad de cada nucleótido usando la herramienta *Sequence Logo Generator* (WebLogo). Esta herramienta, genera una representación gráfica de la secuencia nucleotídica, donde la altura de cada nucleótido representa la frecuencia de aparición del mismo en una posición determinada en el alineamiento. Los cebadores más conservados fueron seleccionados y se les asignaron sus posibles duplas. Seguidamente, se determinó para cada cebador el nivel de formación de estructuras secundarias en forma individual y en conjunto con su dupla (energía libre de Gibbs superior a -11 kcal/mol), %GC (30-60%), temperatura de *melting* (<65°C y una diferencia no mayor a 5°C con su dupla). Finalmente, se evaluó la especificidad -potencial apareamiento inespecífico dentro del genoma humano- para cada par de cebadores seleccionados, mediante la herramienta *Primer-BLAST* (National Center for Biotechnology Information), usando la configuración por defecto.

Para el diseño de nuevos cebadores se seleccionaron las zonas más conservadas de la región *ltr/gag* de HIV-1 y se delimitaron en tamaño manualmente de acuerdo a la viabilidad individual de cada cebador y a la compatibilidad con su dupla, siguiendo el mismo procedimiento y criterio descrito anteriormente.

#### 3.4.2. Desarrollo de estándares para la cuantificación de ADN de HIV-1 asociado a célula

Para la generación de los estándares de cuantificación de ADN-HIV total y círculos de 2-LTR, se amplificaron mediante PCR las regiones del genoma del virus sobre las cuales se diseñaron los cebadores y las sondas, a partir de un *pool* de pacientes HIV-1 positivos. Posteriormente, dichos productos de amplificación fueron clonados en vectores plasmídicos. La mezcla de reacción para la amplificación de las regiones de ADN HIV-1 total y círculos de 2-LTR consistió en: 2 unidades (U) de la enzima ADN polimerasa *GoTaq® DNA Polymerase* (Promega); 1X del buffer *5X Green GoTaq® Reaction Buffer* (Promega); 0,2 mM de cada desoxirribonucleótido (dNTP); 2 mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,4 μM de los cebadores *MH535* y *LTR4* para ADN-HIV-1, y *MH535* y *ENVIN* para los círculos de 2-LTR (ver Tabla 3-1); 250 ng de ADN de un *pool* de pacientes HIV-positivos. Las condiciones de ciclado fueron las siguientes: desnaturalización inicial durante 3 minutos a 94°C; 35 ciclos de 45 segundos a 94°C, 30 segundos a 56°C, 60 segundos a 72°C; y una extensión final durante 5 minutos a 72°C. Los productos de PCR fueron analizados en geles de agarosa (Invitrogen) al 2% y 0,6 μg/mL de bromuro de etidio (Invitrogen). Se utilizó un marcador de peso molecular de 100 pb (100-bp Ladder, Invitrogen) para corroborar el tamaño del amplicón.

Luego de corroborar la presencia de producto de amplificación, 2 μL del mismo se clonó en un vector plasmídico, que posteriormente se utilizó para transformar bacterias químicamente competentes mediante el kit comercial *TOPO® TA Cloning® Kit* (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante. A partir de dicho kit, se obtuvieron colonias de bacterias azules (plásmido sin inserto) y blancas (plásmido con inserto) de acuerdo a la funcionalidad del gen *lacZα* presente en el sitio de clonado en el vector. Se corroboró la presencia del inserto de interés mediante *colony-PCR*. Para ello, se levantó mediante pipeteo una fracción de las colonias blancas, se resuspendieron en 10 μL de agua de PCR y se incubaron a 95°C durante 5 minutos. Luego, a partir de 5 μL

de dicho producto se determinó la presencia de los insertos de ADN-HIV total y círculos de 2-LTR por PCR, de acuerdo a las condiciones descritas anteriormente para la generación de los insertos.

**Tabla 3-1. Cebadores y sondas**

Ensayo	Región genómica	Tipo <sup>a</sup>	Nombre	Secuencia (5'-3') <sup>b</sup>
ADN-HIV total y ARN-HIV no procesado	<i>ltr</i> (HIV-1)	Sentido I	<i>MH535</i>	AACTAGGGAACCCACTGCTTAA G
	<i>ltr</i> (HIV-1)	Antisentido I	<i>LTR-4</i>	AAATCTTGTGGGGTGGCTCC
	<i>ltr</i> (HIV-1)	Sentido II	<i>MH531</i>	TGTGTGCCCGTCTGTTGTGT
	<i>gag</i> (HIV-1)	Antisentido II	<i>MH532bis</i>	CCGAGTCCTGCGTCGAGAG
	<i>gag</i> (HIV-1)	Sonda	<i>LTR</i>	FAM-CAGTGGCGCCCGAACAGG GA-TAMRA
círculos de 2-LTR	<i>ltr</i> (HIV-1)	Sentido I, II	<i>MH535</i>	AACTAGGGAACCCACTGCTTAA G
	<i>ltr</i> (HIV-1)	Antisentido I	<i>ENV1</i>	CTGCTAATCAGGGAAGTAGCCT TGTGT
	<i>ltr</i> (HIV-1)	Antisentido II	<i>MH536</i>	TCCACAGATCAAGGATATCTTG TC
	<i>ltr</i> (HIV-1)	Sonda	<i>2-LTR</i>	FAM-ACACTACTTGAAGCACTC AAGGCAAG CTTT-TAMRA
Preparación de librería para NGS	<i>gag</i> (HIV-1)	Sentido I	<i>Gag689</i>	ACGCAGGACTCGGCTTGC
	<i>gag</i> (HIV-1)	Antisentido I	<i>Gag1339.a</i>	AATCTTGTGGGGTGGCTCC
	<i>gag</i> (HIV-1)	Antisentido I	<i>Gag1339.b</i>	RATCYTGTGGGGTGGCTCC
	<i>gag</i> (HIV-1)	Sentido II	<i>Gag770</i>	<u>TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGT</u> <u>ATAAGAGACAGCGGAGGCTAG</u> AAGGAGAG
	<i>gag</i> (HIV-1)	Antisentido II	<i>Gag1173.a</i>	<u>GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTG</u> <u>TATAAGAGACAGCTATAGGGT</u> AATTTTGGCTG
	<i>gag</i> (HIV-1)	Antisentido II	<i>Gag1173.b</i>	<u>GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTG</u> <u>TATAAGAGACAGCTATAGGGT</u> AATTTTGRCTR
Gen constitutivo / normalizador	<i>beta globina humana</i>	Sentido I	<i>BGB-F</i>	GGCAACCCTAAGGTGAAGGC
	<i>beta globina humana</i>	Antisentido I	<i>BGB-R</i>	GGTGAGCCAGGCCATCACTA
	<i>beta globina humana</i>	Sonda	<i>BGB-P</i>	FAM-CATGGCAAGAAAGTGCTC GGTGCCT-BHQ 1

<sup>a</sup> I y II hacen referencia a la primera y segunda ronda de amplificación, respectivamente.

<sup>b</sup> Los fragmentos subrayados corresponden a secuencias adaptadoras necesarias para la secuenciación en la plataforma de NGS de Illumina.

Una vez obtenidas y seleccionadas las bacterias portadoras de los plásmidos con los insertos de interés se purificó el ADN plasmídico mediante el kit comercial *illustra plasmidPrep Mini Spin Kit* (GE-Healthcare). A continuación, los plásmidos fueron manipulados genéticamente para incorporarles una región del gen constitutivo de  $\beta$ -

globina humana. En primer lugar, el inserto de  $\beta$ -globina humana se generó mediante PCR, a partir de la siguiente mezcla de reacción: 2U de la enzima ADN polimerasa *Taq DNA Polymerase* (Invitrogen); 1X del buffer *10X Taq Buffer* (Invitrogen); 0,2 mM de cada dNTP; 2 mM de  $MgCl_2$ ; 0,4  $\mu M$  de los cebadores *BGB-F* y *BGB-R* (ver Tabla 3-1); 100 ng de ADN genómico. Las condiciones de ciclado fueron las siguientes: desnaturalización inicial durante 3 minutos a 94°C; 30 ciclos de 45 segundos a 94°C, 30 segundos a 60°C, 90 segundos a 72°C; y una extensión final durante 10 minutos a 72°C. En segundo lugar, se digirió el plásmido para su linealización, utilizando una enzima de restricción de un solo sitio de reconocimiento dentro del plásmido y ninguno dentro del inserto de interés. Se utilizó la herramienta *NEBcutter V2.0* (New England BioLabs) para seleccionar la enzima de restricción adecuada. La mezcla de reacción para la digestión enzimática del plásmido fue la siguiente: 10 U de *EcoRV enzyme* (New England BioLabs); 1X de *10X Buffer* (New England BioLabs); 1  $\mu g$  de ADN plasmídico. Se incubó la mezcla de reacción durante 15 minutos a 37°C.

Los productos de la reacción de generación del inserto y linealización del plásmido se purificaron utilizando el kit comercial *Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (Ge Healthcare), de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Se modificaron los extremos 3' libres del inserto y el plásmido linealizado mediante la adición de desoxinucleótidos de adenina y timina, respectivamente. La mezcla de reacción para dicha modificación fue la siguiente: 5U de la enzima ADN polimerasa *Taq DNA Polymerase* (Invitrogen); 1X del buffer *10X Taq Buffer* (Invitrogen); 0,2 mM de dATP en un caso y dTTP en el otro; 2,5 mM de  $MgCl_2$ ; 500 ng de ADN plasmídico en un caso y 100 ng de producto de PCR en el otro. Las mezclas de reacción que contenían el inserto y el plásmido linealizado se incubaron a 72°C por 30 minutos y 2 horas, respectivamente. Se llevó a cabo la ligación del plásmido con el inserto utilizando una concentración 9 veces mayor del primero respecto al segundo, 5  $\mu L$  de la enzima ligasa *Blunt T/A ligase Master Mix* (New England BioLabs), e incubando la mezcla de reacción durante 15 minutos a temperatura ambiente.

Los productos de ligación se utilizaron para transformar bacterias químicamente competentes y luego se purificó el ADN plasmídico. En ambos casos se siguió el mismo procedimiento descrito en la primera ronda de transformación. El stock de ADN plasmídico se cuantificó por quintuplicado, mediante espectrofotometría de microgota (NanoDrop, Thermo Fisher) y, a partir de la media de dicha concentración (expresada

en ng/μl) se determinó el número de copias de ADN-HIV-1/μL mediante la siguiente relación:

$$(X \text{ g/}\mu\text{L ADN} / [\text{tamaño del plásmido en pares de bases} \times 660]) \times 6,022 \times 10^{23} \\ = Y \text{ copias/}\mu\text{L}$$

### 3.4.3. Desarrollo de estándares para la cuantificación de ARN de HIV-1 no procesado

El estándar para la cuantificación de ARN-HIV asociado no procesado se desarrolló mediante la transcripción *in vitro* del inserto clonado en el plásmido de ADN-HIV total. Para ello, en primer lugar, se linealizó el plásmido mediante digestión enzimática de acuerdo a la siguiente mezcla y condiciones de reacción: 10 U de enzima de restricción *BamHI* (Fermentas), 1X de *10X Buffer* (Fermentas) y 1 μg de ADN plasmídico, con una incubación a 37°C durante 4 horas. En segundo lugar, se purificó el plásmido linealizado mediante columnas comerciales *NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up*, (MACHEREY-NAGEL) según las instrucciones del fabricante. En tercer lugar, se llevó a cabo la transcripción *in vitro*, mediante la siguiente mezcla de reacción: 2 μL de la enzima ARN polimerasa *T7 RNA Polymerase Mix* (New England BioLabs); 10 mM de cada dNTP; 1X del buffer *10X Reaction Buffer* (New England BioLabs); y 1 μg de ADN plasmídico linealizado. Se homogeneizó dicha mezcla de reacción mediante vortex y se incubó a 37°C durante 4 horas. En cuarto lugar, para eliminar el ADN plasmídico el producto de transcripción (20 μL) se sometió a un tratamiento con 4U de la enzima *DNase I* (Ambion™) y 1X del buffer *10x DNase I Buffer* (Ambion™) en un volumen final de 100 μL y a una temperatura de 37°C durante 1 hora. Se purificó el ARN siguiendo el protocolo de extracción de ARN a partir de CMT, descrito anteriormente, pero utilizando 850 μL de *TRI Reagent* (SIGMA). Finalmente, el stock de ARN obtenido se cuantificó por quintuplicado mediante espectrofotometría de microgota (NanoDrop, Thermo Fisher) y, a partir de la media de dicha concentración (expresada en ng/μL) se determinó el número de copias de ARN-HIV-1/μL mediante la siguiente relación:

$$(X \text{ g/}\mu\text{L ARN} / [\text{tamaño del transcrito en pares de bases} \times 340]) \times 6,022 \times 10^{23} \\ = Y \text{ copias/}\mu\text{L}$$

#### 3.4.4. Optimización de las condiciones de reacción

En primer, lugar se determinó la temperatura óptima de pegado de los cebadores utilizando las herramientas web *Tm Calculator* (Thermo Fisher) y *Biomath Calculators* (Promega). Seguidamente, se realizó un gradiente de número de ciclos durante la primera ronda de amplificación de cada ensayo de PCR en tiempo real semi-anidada para determinar a partir de qué ciclo se pierde linealidad en la cuantificación. Finalmente, se ajustaron las concentraciones de los cebadores y las sondas de ambas rondas de amplificación hasta obtener una eficiencia reproducible y dentro de un rango de 90% a 105%

### 3.5. Estimación del tamaño del reservorio de HIV-1 en circulación

#### 3.5.1. Cuantificación de ADN-HIV-1 total y círculos de 2-LTR en CMT

El nivel de ADN-HIV total y círculos de 2-LTR, expresado como número de copias de ADN-HIV-total y -2-LTR por millón de CMT respectivamente, se determinó de manera individual y absoluta mediante PCR en tiempo real semi-anidada. Para ambos marcadores del tamaño del reservorio, la composición de la mezcla de reacción en la primera ronda de amplificación fue la siguiente: 2U de la enzima ADN polimerasa *Taq DNA Polymerase* (Invitrogen); 1X del buffer *10X Taq Buffer* (Invitrogen); 0,2 mM de cada dNTP; 2 mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,15 μM de los cebadores *MH535* y *LTR4* para ADN-HIV total, y 0,2 μM de los cebadores *MH535* y *ENVIN* para los círculos de 2-LTR (ver Tabla 3-1); y 20-500 ng de ADN genómico. Los ciclados se llevaron a cabo en un termociclador *Veriti 96 Well Thermal Cycler* (Applied Biosystems). Las condiciones de ciclado para ADN-HIV total fueron las siguientes: desnaturalización inicial durante 3 minutos a 94°C; 10 ciclos de 45 segundos a 94°C, 30 segundos a 63°C con un ΔT de -0,6°C/ciclo, 60 segundos a 72°C; 3 ciclos de 45 segundos a 94°C, 30 segundos a 58°C, 60 segundos a 72°C; y una extensión final durante 5 minutos a 72°C. En el caso de los círculos de 2-LTR, el ciclado consistió en: una desnaturalización inicial durante 3 minutos a 94°C; 13 ciclos de 45 segundos a 94°C, 30 segundos a 55°C, y 60 segundos a 72°C; y una extensión final durante 5 minutos a 72°C. La segunda ronda de amplificación se llevó a cabo en ambos casos mediante PCR en tiempo real utilizando 2

$\mu\text{L}$  del producto de la primera ronda en la siguiente mezcla de reacción: 1X de *TaqMan Universal Master Mix* (Applied Biosystems); 0,25  $\mu\text{M}$  de los cebadores *MH531* y *MH532bis* para ADN-HIV total, y 0,4  $\mu\text{M}$  de los cebadores *MH535* y *MH536* para los círculos de 2-LTR (ver Tabla 3-1); y 0,16  $\mu\text{M}$  de la sonda *TaqMan LTR* para ADN-HIV total, y 0,2  $\mu\text{M}$  de la sonda *TaqMan 2-LTR* para los círculos de 2-LTR (ver Tabla 3-1). En ambos casos, el ciclado se llevó a cabo en el sistema *7500 Real Time PCR System* (Applied Biosystems) y de acuerdo a las siguientes condiciones: 2 minutos a 50°C; 10 minutos a 95°C; 15 segundos a 95°C; y 60 segundos a 59°C. En paralelo (mismo ciclado), se cuantificó una región del gen de  $\beta$ -globina humana mediante PCR en tiempo real para determinar el número de células por reacción. La mezcla de reacción consistió en: 1X de *TaqMan Universal Master Mix* (Applied Biosystem); 0,4  $\mu\text{M}$  de los cebadores *BGB-F* y *BGB-R* (ver Tabla 3-1); 0,18  $\mu\text{M}$  de la sonda *TaqMan BGB-P* (ver Tabla 3-1); y la misma concentración de ADN utilizada para la reacción de ADN-HIV total. Tanto las muestras como los estándares de cuantificación fueron estudiados por triplicado. Las curvas estándar para la cuantificación de ambos marcadores de HIV-1 se construyeron a partir de diluciones seriadas 1:5 o 1:10 de cada estándar en un rango de  $1,1 \times 10^5$  a  $7,0$  o  $3,0 \times 10^5$  a 3,0 copias/reacción, respectivamente. Mientras que el rango de la curva de cuantificación de  $\beta$ -globina humana fue de  $5,0 \times 10^6$  a  $5,0 \times 10^2$  copias/reacción.

### 3.5.2. Cuantificación de ARN-HIV no procesado

En primer lugar, se llevó a cabo la reacción de transcripción inversa de acuerdo a la siguiente mezcla de reacción: 10 U/ $\mu\text{L}$  de la enzima transcriptasa inversa *SuperScript™ III RT* (Invitrogen); 1X del buffer *5X First-Strand Buffer* (Invitrogen); 0,5 mM de cada dNTP; 5 mM de  $\text{MgCl}_2$ ; 0,01 M de DTT (Invitrogen); 2,5 ng/ $\mu\text{L}$  de *Random Primers* (Biodiynamics); 2 U/ $\mu\text{L}$  del inhibidor recombinante de ribonucleasa *RiboLock RNase Inhibitor* (Thermo Fisher Scientific); y 100-800 ng de ARN como molde. Las condiciones de la reacción fueron las siguientes: 5 minutos a 65°C, 1 minuto en hielo, 10 minutos a 25°C, 60 minutos a 42°C, y finalmente 5 minutos a 85°C para inactivar la enzima RT. El ADN complementario resultante de esta reacción, se utilizó como templado para la primera ronda de amplificación por PCR en tiempo real semi-anidada. Para esta PCR, tanto en la primera como segunda ronda, se usaron las mismas condiciones de reacción de la PCR en tiempo real semi-anidada anteriormente descrita

para la cuantificación del número de copias de ADN-HIV total (igual mezcla de reacción, incluyendo los cebadores, y el ciclado). Finalmente, la curva estándar se realizó a partir de diluciones seriadas 1:5 o 1:10 del estándar en un rango de  $1,1 \times 10^5$  a  $7,0$  o  $3,0 \times 10^5$  a  $3,0$  copias/reacción, respectivamente.

### 3.6. Dinámica y relación filogenética de las variantes de HIV-1 en CMT durante TARVc efectivo y prolongado

El proceso de obtención y análisis de las variantes virales en circulación conllevó una serie de pasos, los cuales se abordan a continuación, pero que a modo de guía y para una mejor comprensión de los mismos se esquematizan en la Figura 3.2.

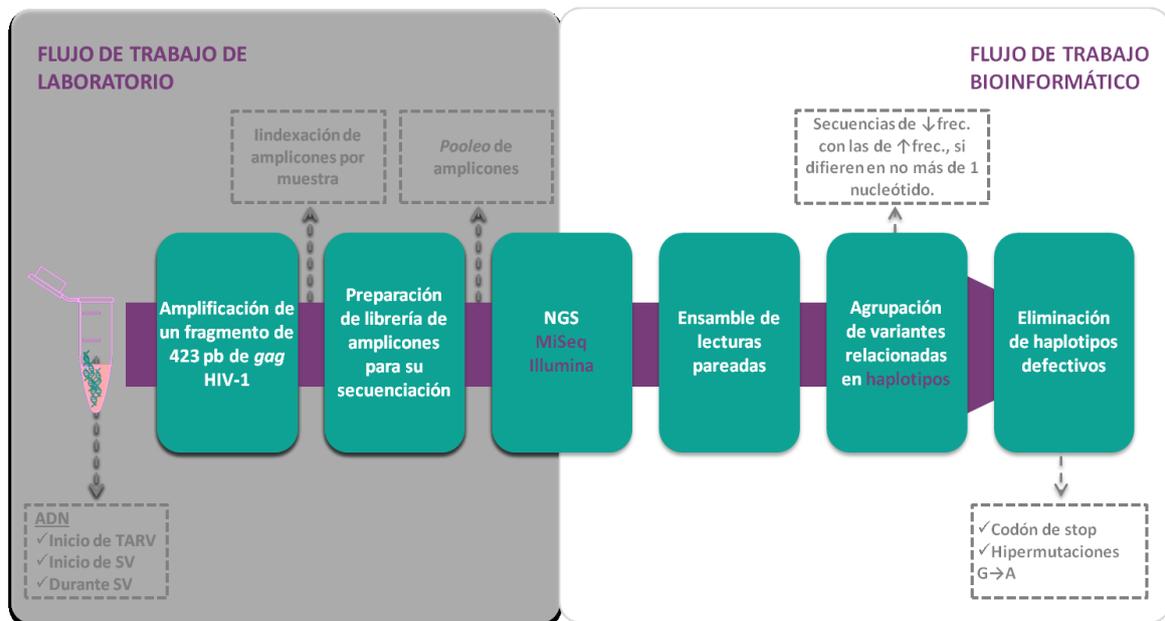


Figura 3.2. Flujo de trabajo para la obtención y análisis de variantes virales.

#### 3.6.1. Construcción de las librerías y secuenciación de nueva generación

Se amplificó mediante PCR anidada una región de 423 pb del gen gag de HIV-1, en muestras de ADN extraídas a partir de CMT antes del inicio del TARVc y la SV, y durante 6 a 15 años de SV. Además, dicha región se amplificó por triplicado a partir del plásmido pNL4-3 (contiene una copia de tamaño completo y funcional de un clon de

HIV-1 de subtipo B) para calcular la tasa de error del proceso de secuenciación descrito más adelante. La primera ronda de amplificación consistió en la siguiente mezcla de reacción: 0,75U de la enzima ADN polimerasa *GoTaq® DNA Polymerase* (Promega); 1X del buffer *5X Colorless GoTaq® Reaction Buffer* (Promega, en concentración 1X contiene 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>); 0,2 mM de cada dNTP; 0,5 mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,2 µM del cebador *Gag689*, 0,1 µM de los cebadores *Gag1339.a* y *Gag1339.b* (ver Tabla 3-1); y, aproximadamente, 500 ng de ADN genómico. Las condiciones de ciclado fueron las siguientes: desnaturalización inicial durante 3 minutos a 94°C; 11 ciclos de 30 segundos a 94°C, 45 segundos a 58°C con un ΔT de -0,7°C/ciclo, 45 segundos a 72°C; 10 ciclos de 30 segundos a 94°C, 45 segundos a 55°C, 45 segundos a 72°C; 14 ciclos de 30 segundos a 94°C, 45 segundos a 53°C, 45 segundos a 72°C; y una extensión final durante 2 minutos a 72°C. La segunda ronda de amplificación se llevó a cabo utilizando 2,5 µL del producto de la primera ronda y la misma mezcla de reacción, excepto por los cebadores, que en este caso fueron *Gag770*, *Gag1173.a* y *Gag1173.b* (ver Tabla 3-1) en una concentración igual a 0,25, 0,13 y 0,13 µM, respectivamente. Los productos de PCR fueron analizados mediante electroforesis capilar (QIAxcel, QIAGEN) utilizando el cartucho *QIAxcel DNA High Resolution Kit* y el marcador de peso molecular *QX Alignment Marker 15 bp/3 kb*.

El siguiente paso del proceso de secuenciación de nueva generación (NGS por sus siglas en inglés) consistió en la preparación de las librerías de amplicones, que básicamente consiste en la adaptación de los amplicones generados anteriormente para su secuenciación. Para ello, se siguieron exactamente los mismos procedimientos descritos en el protocolo "*Preparing 16S Ribosomal RNA Gene Amplicons for the Illumina MiSeq System*" ([https://support.illumina.com/documents/documentation/chemistry\\_documentation/16s/](https://support.illumina.com/documents/documentation/chemistry_documentation/16s/)). Las librerías generadas se secuenciaron en la plataforma MiSeq (Illumina), usando el kit *MiSeq Reagent Kits v2 500 Cycles PE*.

### **3.6.2. Análisis bioinformático: Procesamiento de las secuencias obtenidas**

El kit de secuenciación empleado se basa en la secuenciación por lecturas pareadas (del inglés *paired-end*), lo cual significa que el equipo produce dos secuencias a partir de un mismo fragmento de ADN, iniciando cada una desde los extremos opuestos de dicho fragmento. Es por ello que, a partir de la secuenciación se obtuvieron

2 archivos FASTQ (R1 y R2) por muestra, en donde cada uno reúne a todas las secuencias o lecturas producidas desde un mismo extremo del fragmento secuenciado e incluye valores de calidad de secuenciación por cada base. Estas lecturas obtenidas se procesaron de acuerdo a su calidad. Para ello, se recortaron los nucleótidos de los extremos de cada lectura que no superaron un valor de corte de calidad igual a 25 por un lado, y por el otro, por ventanas de 4 nucleótidos, si en promedio su calidad no superaba un valor de corte de 20. A su vez se eliminaron las lecturas de menos de 150 nucleótidos. Este proceso se realizó usando el software *Trimmomatic v0.36*.

Para reconstruir la identidad de cada variante del fragmento de 423 pb del gen *gag*, se llevó a cabo un proceso de ensamblado con referencia, que consistió en unir cada lectura con su correspondiente pareja (lectura de R1 con su pareja en R2), siempre que estén solapadas por un mínimo definido de bases. Posteriormente, se descartaron las secuencias repetidas para obtener un *set* de variantes únicas, que fueron mapeadas contra una secuencia de referencia para descartar ensamblados no correspondientes con la región de interés. Una vez reconstituidas las variantes, se estimó su frecuencia de acuerdo a la cantidad de secuencias repetidas mencionadas anteriormente. Para esta etapa, se utilizó el software *SAVAGE v0.4.0*, y como secuencia de referencia una secuencia consenso del set de pacientes estudiados y obtenida previamente por secuenciación de Sanger. El solapamiento mínimo entre lecturas R1 y R2 se configuró en 20 nucleótidos idénticos y el largo mínimo de ensamblado final en 300 nucleótidos.

Una vez reconstituidas las variantes para cada muestra, estas se procesaron para minimizar los sesgos ocasionados por los posibles errores de amplificación, secuenciación y remuestreo. Este proceso consistió en hacer un alineamiento múltiple de secuencias por muestra, para luego agrupar las variantes que se encontraron por debajo de la tasa de error de secuenciación con aquellas secuencias relacionadas que se encontraron por encima de dicha tasa, siempre y cuando la diferencia entre las mismas no sea superior a un nucleótido en una matriz de distancia. Este agrupamiento de variantes relacionadas se denomina haplotipo y su frecuencia final surge de la sumatoria de las frecuencias individuales de las variantes que lo constituyen. Las variantes con frecuencia inferior a la tasa de error remanentes, que no agruparon con ninguna mayoritaria, fueron eliminadas. Para este proceso se desarrolló un *script* utilizando el lenguaje de programación *Python*. Luego, debido a que el objetivo del presente trabajo fue estudiar el reservorio de HIV-1, el cual incluye solo variantes no defectivas o

potencialmente replicativas, se eliminaron los haplotipos con codones de terminación prematuros e hipermutaciones, a los que se definió como haplotipos defectivos. Para clasificar las secuencias en hipermutadas y no hipermutadas, se contó el número de mutaciones en posiciones que no fueron variables en los haplotipos obtenidos pre-TARVc. Los haplotipos obtenidos de muestras en SV que presentaron más de 4 mutaciones en dichas posiciones y donde la mitad de esas mutaciones fueron G → A, se clasificaron como hipermutadas. Este análisis se llevó a cabo usando la herramienta *Hypermut* de *Los Alamos HIV databases and compendiums* [181].

Finalmente, se representó la composición y dinámica de haplotipos no defectivos en los distintos tiempos de muestreo para cada paciente, mediante un diagrama de Sankey. Para la reconstrucción de este diagrama, primero se identificaron los haplotipos idénticos entre los distintos tiempos de estudio, mediante un script en *R v3.3.1* usando el paquete *BiocManager*, para poder enlazarlos en el gráfico. Luego, se representaron gráficamente, y de forma distintiva, los haplotipos idénticos y aquellos que aparecieron solo en un tiempo de muestreo utilizando la librería de *JavaScript D3.js* y *HTML*

### 3.6.3. Análisis filogenético

La primera etapa de un análisis filogenético consiste en construir una matriz con secuencias alineadas entre sí. Por ello, se construyó una matriz por cada paciente, en donde se incluyeron todos los haplotipos obtenidos pre-TARVc, al inicio de la SV y a lo largo de la misma. Los alineamientos se realizaron mediante el software *AliView v1.24* [182], y cuando fue necesario se editaron manualmente. Como se mencionó en la sección 3.6.2, las secuencias cortas, con codones de terminación prematuros y/o hipermutaciones fueron eliminadas del análisis.

Luego, se estudiaron las relaciones filogenéticas entre los haplotipos mediante el método de *maximum likelihood* usando el software *PhyML v3.0* en su formato web (<http://www.atgc-montpellier.fr/phyml/>) [183]. La selección del modelo de sustitución de nucleótido que se ajustó a las matrices de secuencia, se realizó mediante la opción "*Automatic model selection by SMS*" [184]. Como grupo externo (*out group*) se utilizó una secuencia consenso de subtipo B obtenida de la base de datos *Los Alamos National Laboratory* (<http://www.hiv.lanl.gov/>). El análisis de *bootstrap* se realizó con 100 réplicas.

Finalmente, para evaluar la estructura temporal en los árboles, se determinó la correlación entre la distancia de los haplotipos obtenidos a los distintos tiempos de muestreo en SV y aquellos presentes en la primera muestra (al inicio del TARVc), mediante el análisis de *root-to-tip distance* y utilizando el software *TempEst v1.5.1* (*Temporal Signal Investigation Tool*) [185].

### 3.7. Análisis estadístico.

Las trayectorias del nivel de ADN-HIV-1-total en CMT, en la fracción de células T CD4<sup>+</sup> y en sangre entera durante 4 años de SV se estimaron mediante modelos lineales mixtos con una pendiente aleatoria para cada individuo. Se incluyó en el modelado un cambio en la pendiente a los 2 años de SV para minimizar el criterio de información de *Akaike* y debido a los cambios en el recuento de las poblaciones de células inmunes que ocurren durante los primeros años de vida en los niños. Para la construcción del modelo final se estudió la inclusión de las siguientes variables fijas: edad al comienzo de la SV, presencia de rebote de la CVp, ambas expresadas en forma categórica; esquema de TARVc (INNTI o IP); y la CVp basal (pre-SV).

La frecuencia de círculos de 2-LTR a lo largo del estudio se analizó mediante modelos lineales generalizados (regresión logística de medidas repetidas) con la inclusión del nivel de ADN-HIV-1-total como variable cuantitativa continua.

Para la comparación de los niveles de CVp, ADN-HIV total, círculos de 2-LTR y ARN-HIV-1 no procesado entre dos y más de dos grupos se utilizaron los test Mann-Whitney y Kruskal-Wallis respectivamente. En varias ocasiones fue necesario realizar un post-test, a partir de los resultados del test de Kruskal-Wallis, para lo cual se utilizó el test de Dunn. La comparación de variables categóricas entre diferentes grupos de pacientes se llevó a cabo mediante el armado de tablas de contingencia y el posterior análisis de las mismas por el test de Fisher. Además, para determinar la asociación entre diferentes variables cuantitativas ADN-HIV-1- total, -2-LTR y ARN-HIV-1 se utilizó el coeficiente de correlación de Spearman. Mientras que para evaluar la correlación entre las diferentes formas de expresión de ADN-HIV de acuerdo al compartimento se usó el coeficiente de correlación de Pearson.

La totalidad de los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software *R Studio*, basado en el lenguaje *R v3.3.1* [186].

## **4. RESULTADOS**

#### **4.1. Diseño, desarrollo y validación de metodologías cuantitativas para la caracterización de los reservorios del HIV-1**

La mayoría de los marcadores de los reservorios del HIV-1 propuestos consisten en la cuantificación de diferentes formas del genoma del virus y, aportan diferentes evidencias acerca del tamaño y la actividad de los reservorios. Para la caracterización del reservorio del HIV-1 en sangre periférica de pacientes con SV sostenida, fue necesario el desarrollo de ensayos de cuantificación de ADN-HIV total, círculos de 2-LTR y ARN-HIV no procesado, con elevada sensibilidad y adaptados a las cepas circulantes en Argentina.

##### *4.1.1. Diseño del ensayo*

Para los propósitos del presente trabajo, se desarrollaron dos ensayos para cuantificar diferentes formas de ADN-HIV: círculos de 2-LTR y total (incluye las dos anteriores). Asimismo, se diseñó otro ensayo para cuantificar el nivel de ARN viral intracelular no procesado. Todos estos ensayos se diseñaron bajo el principio de PCR en tiempo real semi-anidada [187], ya que permite la cuantificación de un número de copias inferior al de los ensayos convencionales de PCR en tiempo real. La PCR en tiempo real semi-anidada, al igual que la PCR anidada, consiste en dos rondas de amplificación, pero con la salvedad de que en la primera ronda no se debe superar el ciclo donde inicia la fase exponencial de amplificación. Esto se debe a que superado dicho ciclo se pierde la linealidad en la cuantificación. Posteriormente, el producto de la primera ronda se utiliza en una segunda ronda de amplificación por PCR en tiempo real. El ciclo umbral (Ct por sus siglas en inglés) obtenido por PCR en tiempo real se extrapola a la curva estándar correspondiente, para la cuantificación absoluta de cada forma de genoma del HIV-1.

##### *4.1.2. Evaluación del desempeño de la metodología de PCR en tiempo real semi-anidada para la cuantificación de los reservorios del HIV-1 en circulación*

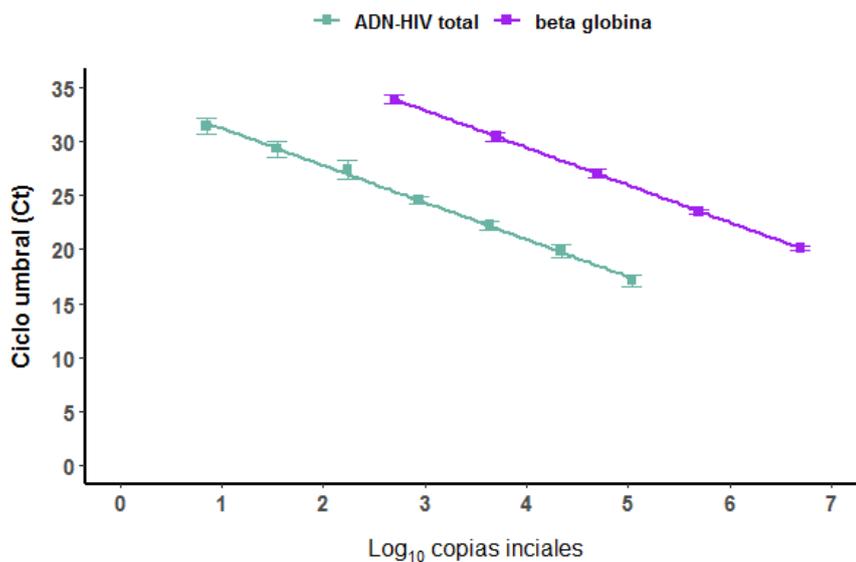
Con el objeto de estudiar el desempeño y la aplicabilidad del principio de la PCR en tiempo real semi-anidada en la cuantificación de los reservorios del HIV-1, se evaluaron diferentes parámetros del ensayo de cuantificación de ADN-HIV total, ya que fue el primer ensayo desarrollado utilizando dicho principio. Los parámetros que se estudiaron fueron el

rango dinámico, desvío estándar (DS) intra- e inter-ensayo y la eficiencia de la reacción. Para ello, se siguieron las recomendaciones reportadas por Burd *et al.* [188] para la validación de ensayos moleculares *in-house*. Por un lado, se estudió cada punto de la curva estándar por triplicado y en 5 ensayos independientes y, por otro lado, se estudiaron por triplicado y en 7 ensayos independientes dos muestras clínicas de pacientes HIV-1 positivos. Las muestras correspondían a un paciente que presentaba CVp detectable y a otro que era indetectable. Debido a que la cuantificación de los reservorios del HIV-1 involucra el estudio de pacientes con CVp muy bajas a indetectables durante largos periodos de tiempo, es importante que el LIC de los ensayos sea lo más bajo posible. Es por esto que, en primer lugar, se determinó el LIC del ensayo de ADN-HIV total, el cual fue de 7 copias por reacción. En segundo lugar, se definió arbitrariamente el límite superior de cuantificación en  $1,1 \times 10^5$  copias/reacción. Este último número surgió como consecuencia de que la media del nivel de ADN-HIV total reportada para pacientes que progresan a SIDA ronda las 10.000 copias de HIV-1 por millón de CMT [151]. Por lo tanto, para llegar al límite inferior de 7 copias mediante diluciones seriadas 1:5, se requiere partir de  $1,1 \times 10^5$  copias por reacción (Figura 4.1.). El DS intra- e inter-ensayo de los diferentes puntos de la curva estándar varió entre 0,10 y 0,21, y entre 0,37 y 0,89, respectivamente.

En cuanto a las muestras clínicas, el ensayo de cuantificación de ADN-HIV total presentó un mayor DS en la medición del paciente que tenía CVp indetectable respecto al paciente que era detectable: 0,28 vs 0,14 intra-ensayo y 0,56 vs 0,35 inter-ensayo, respectivamente. Esta diferencia observada era esperable, ya que generalmente las muestras con CVp indetectable presentan un menor nivel de ADN-HIV total con respecto a aquellas que son detectables, y por lo tanto, presentan un Ct más cercano al punto inferior de cuantificación de la curva estándar, que es donde hay más variabilidad (Figura 4.1.). La eficiencia media de la PCR en tiempo real semi-anidada para ADN-HIV total fue de 95,6%.

En paralelo a la evaluación de la curva estándar de ADN-HIV total, se estudió el desempeño de un ensayo de PCR en tiempo real para la cuantificación de  $\beta$ -globina humana, mediante el cual se determina el número de células por  $\mu\text{L}$  de las muestras a estudiar. Específicamente, se estudió la curva estándar de  $\beta$ -globina en simultáneo y durante el mismo número de ensayos que la curva estándar de ADN-HIV total. Es

importante aclarar, que el ensayo de cuantificación de  $\beta$ -globina consiste en una PCR en tiempo real convencional, por lo que sólo comparte la segunda ronda de amplificación con el ensayo de ADN-HIV total, como así también lo hace con el ensayo de círculos de 2-LTR. El rango de DS intra- e inter-ensayo de cada punto de la curva fue de 0,074 - 0,20 y 0,17 - 0,42, respectivamente; y la eficiencia de amplificación fue de 94,6%.



**Figura 4.1. Curvas estándar para el ensayo de cuantificación de ADN-HIV total.**

Cada punto de la curva corresponde al promedio de Ct obtenido en tres replicas durante 5 ensayos independientes, mientras que las barras asociadas representan el DS inter-ensayo. Para cada muestra problema se obtuvo el  $\log_{10}$  de copias iniciales de  $\beta$ -globina y ADN-HIV total mediante la extrapolación del Ct de cada reacción a la curva correspondiente. Luego, se determinó el nivel de ADN-HIV total, expresado en  $\log_{10}$  copias/millón de CMT, mediante la siguiente ecuación:  $\log_{10}$  copias (ADN-HIV total/ $\log_{10}$  copias  $\beta$ -globina)  $\times 2 \times 10^6$ .

Finalmente, una vez determinada la eficiencia, sensibilidad y robustez del ensayo de ADN-HIV total, se estudiaron un total de 72 muestras de pacientes HIV-positivos que presentaban diferentes CVp, para determinar la capacidad de cuantificación del ensayo en muestras clínicas. Del total de muestras, 42 presentaban CVp por debajo del LIC (en 26 muestras el LIC fue igual a 400 copias/mL y en 16 muestras fue igual a 50 copias/mL), mientras que en 30 muestras la CVp era superior a 400 copias/mL (ver Tabla 4-1). El nivel de ADN-HIV total se logró cuantificar en 63 (87,5%) muestras (nivel dentro del rango

dinámico). En 5 (6,9%) muestras el nivel estuvo entre el LIC y LD, y en otras 4 (5,6%) muestras donde el nivel estuvo por debajo del LD (ver Tabla 4-1).

Es importante mencionar que el ensayo de ADN-HIV total comparte con los ensayos de ARN-HIV no procesado, exceptuando la etapa de transcripción inversa, y de círculos de 2-LTR, las mismas condiciones de reacción. Al mismo tiempo, comparte los mismos cebadores con en el ensayo de ARN-HIV no procesado, y la región de unión de los cebadores, la cual es muy conservada, con el ensayo de círculos de 2-LTR. Es por esto que, para los ensayos de ARN-HIV no procesado y círculos de 2-LTR solo se corroboró el rango dinámico y la eficiencia de reacción en dos ensayos independientes. Ambos ensayos presentaron un comportamiento similar al ensayo de ADN-HIV total ( $DS < 1$ ).

**Tabla 4-1. Capacidad de cuantificación del ensayo de ADN-HIV total en muestras clínicas**

Nivel de cuantificación	CVp<50 <sup>a</sup> (n=16)	CVp<400 <sup>a</sup> (n=26)	CVp>400 (n=30)
Cuantificables <sup>b</sup> , nro. (%)	12 (75)	23 (88,5)	28 (93,3)
Inferior al LIC <sup>c</sup> , nro (%)	1 (6,3)	3 (11,5)	1 (3,3)
Indetectables <sup>d</sup> , nro (%)	3 (18,7)	0 (0)	1 (3,3)

<sup>a</sup> De acuerdo al período en que se recolectó la muestra del paciente el LIC del ensayo de CVp fue de 400 o 50 copias/mL.

<sup>b</sup> Nivel de ADN-HIV total dentro del rango dinámico.

<sup>c</sup> Nivel de ADN-HIV total detectable, esto es entre el LIC y el LD del ensayo.

<sup>d</sup> Nivel de ADN-HIV total inferior al límite de detección.

Una vez desarrollados los ensayos de cuantificación de los reservorios del HIV-1, como así también evaluados en cuanto a su desempeño, se prosiguió con la implementación de dichas metodologías para el estudio de las diferentes poblaciones de pacientes que tiene por objetivo abordar el presente trabajo.

#### **4.2. Impacto de la eficacia del TARVc en los niveles de ADN-HIV total**

La medición del nivel de ADN-HIV total podría ser un marcador de relevancia clínica para evaluar la progresión de la infección y el impacto del TARVc en el tamaño de los reservorios del HIV-1, principalmente en aquellos pacientes con CVp indetectables.

*4.2.1. Los pacientes respondedores al TARVc presentaron un mayor decaimiento en el tamaño del reservorio de HIV-1 respecto a los pacientes no respondedores*

Con el propósito de estudiar el impacto de la eficacia del TARVc en el tamaño de los reservorios del HIV-1, se estudiaron los niveles de ADN-HIV total en pacientes respondedores (R) y no respondedores (NR) al TARVc. Las principales características de los pacientes estudiados se encuentran en la

Finalmente, se analizó la reducción del nivel de ADN-HIV total entre el tiempo pre-TARVc y los tiempos pos-TARVc 1 y 2 en ambos grupos de pacientes. Para ello, se calculó la diferencia entre el nivel de ADN-HIV total obtenido pos-TARVc 1/2 y pre-

Tabla 4-2. En ambos grupos se midieron los niveles de ADN-HIV total previo al inicio de TARVc (pre-TARVc), y a dos tiempos posteriores al inicio del mismo (pos-TARVc 1 y 2). La edad de los pacientes a los distintos tiempos de estudio fue similar entre R y NR, siendo la mediana de edad de la totalidad de los pacientes igual a 4 meses a tiempo pre-TARVc, 22 a tiempo pos-TARVc 1 y 36 meses a tiempo pos-TARVc 2. Además, la mediana de edad de inicio de TARVc fue de 5 meses para ambos grupos (ver

Finalmente, se analizó la reducción del nivel de ADN-HIV total entre el tiempo pre-TARVc y los tiempos pos-TARVc 1 y 2 en ambos grupos de pacientes. Para ello, se calculó la diferencia entre el nivel de ADN-HIV total obtenido pos-TARVc 1/2 y pre-

Tabla 4-2).

Previo al inicio de TARVc, el nivel de ADN-HIV total, al igual que la CVp, fue similar en ambos grupos ( $p=0,091$ , respectivamente), con una mediana de ADN-HIV total de 3,11 [1<sup>er</sup> cuartil (C1) - 3<sup>er</sup> cuartil (C3): 3,05 - 3,34] y 2,56 (C1-C3: 2,37 - 3,18)  $\log_{10}$  copias/millón de CMT en R y NR, respectivamente. Sin embargo, luego de una mediana de 13 meses bajo TARVc (pos-TARVc 1) ambos grupos presentaron comportamientos diferentes. La totalidad de los pacientes R presentaron CVp indetectables, y un nivel de ADN-HIV total inferior al de los pacientes NR: mediana igual a 2,07 (C1-C3: 1,82 - 3,10) vs. 2,53 (C1-C3: 2,40 - 2,75)  $\log_{10}$  copias/millón de CMT, respectivamente. Sin embargo, dicha diferencia no fue estadísticamente significativa ( $p=0,315$ ). Luego de una mediana de 20 meses bajo TARVc (pos-TARVc 2) el nivel de ADN-HIV total en ambos grupos fue similar al observado en pos-TARVc 1, con una mediana de 2,51 (C1-C3: 2,19 - 3,17) y 2,03 (C1-C3: 1,80 - 2,76)  $\log_{10}$  copias/millón de CMT ( $p=0,162$ ) en pacientes NR y R, respectivamente.

Finalmente, se analizó la reducción del nivel de ADN-HIV total entre el tiempo pre-TARVc y los tiempos pos-TARVc 1 y 2 en ambos grupos de pacientes. Para ello, se calculó la diferencia entre el nivel de ADN-HIV total obtenido pos-TARVc 1/2 y pre-

**Tabla 4-2. Características descriptivas de la población de estudio I (ver Materiales y Métodos) de acuerdo al tipo de respuesta al TARVc.**

Característica	Total (n=18)	R (n=10)	NR (n=8)	p-valor
<b>Genero, nro. (%)</b>				0,520 <sup>†</sup>
Femenino	12 (66,7)	6 (60,0)	6 (75,0)	
Masculino	6 (33,3)	4 (40,0)	2 (25,0)	
<b>Tratamiento antirretroviral profiláctico, nro.<sup>a</sup></b>				0,168 <sup>†</sup>
Ninguno	5	4	1	
Parcial	3	0	3	
Completa	4	3	1	
Desconocido	6	3	3	
<b>Edad de inicio del TARVc en meses, mediana (C1-C3)</b>	5 (3 - 20)	5 (3 - 22)	5 (3 - 18)	0,474 <sup>‡</sup>
<b>TARVc inicial, nro.<sup>b</sup></b>				0,706 <sup>†</sup>
ABC + 3TC + LPV/r	2	1	1	
AZT + 3TC + LPV/r	15	9	6	
DDL + 3TC + LPV/r	1	0	1	
<b>Características por tiempo de muestreo, mediana (C1-C3)</b>				
<i>1<sup>er</sup> muestra: pre-TARVc</i>				
Edad en meses	4 (2 - 18)	5 (2 - 20)	3 (2 - 9)	0,342 <sup>‡</sup>
CVp, log <sub>10</sub> copias/mL	5,76 (5,40 - 6,02)	5,68 (5,47 - 5,96)	5,90 (5,34 - 6,32)	0,360 <sup>‡</sup>
Recuento de células T CD4 <sup>+</sup> , células/mm <sup>3</sup>	2518 (1346 - 2890)	2683 (2230 - 2891)	1287 (964 - 2757)	0,211 <sup>‡</sup>
% de células T CD4 <sup>+</sup>	41 (26 - 45)	45 (42 - 48)	30 (16 - 36)	0,018 <sup>‡</sup>
Relación CD4/CD8	1,7 (0,7 - 2,1)	1,8 (1,3 - 2,5)	1,0 (0,4 - 1,9)	0,138 <sup>‡</sup>
<i>2<sup>da</sup> muestra: pos-TARVc 1</i>				
Edad en meses	22 (11 - 36)	19 (9 - 32)	22 (15 - 38)	0,790 <sup>‡</sup>
CVp, log <sub>10</sub> copias/mL	2,04 (1,23 - 2,47)	1,23 (1,23 - 1,23)	2,57 (2,35 - 2,99)	<0,001 <sup>‡</sup>
Recuento de células T CD4 <sup>+</sup> , células/mm <sup>3</sup>	1986 (1592 - 2877)	1986 (1796 - 2873)	1924 (1295 - 2720)	0,450 <sup>‡</sup>
% de células T CD4 <sup>+</sup>	37 (28 - 44)	39 (35 - 46)	30 (23 - 39)	0,155 <sup>‡</sup>
Relación CD4/CD8	1,2 (0,7 - 2,2)	1,5 (1,1 - 2,6)	0,8 (0,5 - 1,5)	0,101 <sup>‡</sup>
<i>3<sup>era</sup> muestra: pos-TARVc 2</i>				
Edad en meses	36 (23 - 43)	28 (22 - 39)	45 (36 - 56)	0,082 <sup>‡</sup>
CVp, log <sub>10</sub> copias/mL	1,23 (1,23 - 2,09)	1,23 (1,23 - 1,23)	1,95 (1,23 - 3,41)	0,072 <sup>‡</sup>
Recuento de células T CD4 <sup>+</sup> , células/mm <sup>3</sup>	1731 (1290 - 2032)	1821 (1706 - 2032)	1168 (965 - 2020)	0,142 <sup>‡</sup>
% de células T CD4 <sup>+</sup>	36 (27 - 43)	37 (34 - 44)	29 (24 - 42)	0,230 <sup>‡</sup>
Relación CD4/CD8	1,2 (0,7 - 1,7)	1,4 (1,1 - 1,7)	0,7 (0,5 - 1,8)	0,237 <sup>‡</sup>

<sup>a</sup> Criterio de clasificación basado en el protocolo ACTG 076: Completo, administración de zidovudina a la madre durante el parto y al bebé durante las primeras 6 semanas de vida; Parcial, administración de zidovudina solo a uno de los anteriores; Ninguno, no administración de zidovudina, tanto a la madre como al bebé.

<sup>b</sup> ABC: abacavir; AZT: zidovudina; DDL: didanosina; LPV/r: lopinavir/ritonavir; 3TC: lamivudina.

<sup>†</sup> = test de Fisher.

<sup>‡</sup> = test de Mann-Whitney.

TARVc. A partir de dicho análisis, se observó que la reducción de ADN-HIV total en pos-TARVc 1 fue mayor en pacientes R con respecto a los NR, pues en tanto los primeros

presentaron una mediana igual a -0,83 (C1-C3: -1,29 y -0,12)  $\log_{10}$  copias por millón de CMT, los segundos presentaron una mediana igual a -0,03 (C1-C3: -0,31 y 0,06)  $\log_{10}$  copias por millón de CMT. Esta diferencia, sin embargo, no fue estadísticamente significativa ( $p=0,070$ ). En pos-TARVc 2, la brecha en la reducción de ADN-HIV entre pacientes R y NR se incrementó, de tal modo que los primeros alcanzaron una mediana de reducción igual a -1,21 (C1-C3: -1,49 y -0,58)  $\log_{10}$  copias por millón de CMT y los segundos una mediana de reducción igual a -0,12 (C1-C3: -0,44 y 0,19)  $\log_{10}$  copias por millón de CMT, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ( $p=0,008$ ). En conjunto, estos resultados muestran una reducción progresiva del nivel de ADN-HIV total bajo TARVc, tal que a los 2 años desde el inicio del mismo los pacientes que responden efectivamente a la terapia presentan una mayor reducción en comparación a quienes no responden efectivamente.

#### 4.2.2. Correlación entre el nivel de ADN-HIV total y marcadores de progresión de la infección

Con el objetivo de tener mayor conocimiento sobre el comportamiento del nivel de ADN-HIV total, se evaluó la asociación entre el mismo y determinados marcadores de progresión de la infección, como ser la edad de inicio del TARVc, el porcentaje de células T CD4<sup>+</sup> y la CVp pre-TARVc. Para este punto, se analizaron dichas variables en el primer y último tiempo de estudio (pre-TARVc y pos-TARVc 2, ver Tabla 4-3). No se encontró a-

**Tabla 4-3. Correlación de factores asociados a la progresión de la infección con el nivel de ADN-HIV total.**

Característica	Nivel de ADN-HIV total				Reducción del nivel de ADN-HIV total		
	N°	pre-TARVc		pos-TARVc 2		pos-TARVc 2	
		Spearman	p-valor	Spearman	p-valor	Spearman	p-valor
Edad de inicio de TARVc	18	0,13	0,618	0,17	0,495	0,12	0,628
CVp pre-TARVc	18	-0,31	0,203	-0,25	0,322	-0,16	0,530
% de células T CD4 <sup>+</sup>	18	0,12	0,635	-0,33	0,197	-0,48	0,040

sociación entre ninguno de los marcadores estudiados y el nivel de ADN-HIV total, a excepción de una relación inversamente proporcional entre el porcentaje de células T CD4<sup>+</sup> pre-TARVc y la reducción del nivel de ADN-HIV total pos-TARVc 2 ( $r=-0,50$ ,

p=0,040). Por otra parte, el nivel basal de ADN-HIV total pre-TARVc no tuvo correlación con el nivel de ADN-HIV total luego de aproximadamente uno pos-TARVc ( $r= 0,34$ ,  $p=0,164$ ) y ni tampoco luego de dos años pos-TARVc ( $r=0,34$  y  $p=0,162$ ).

#### **4.3. Dinámica del tamaño del reservorio circulante a lo largo de 4 años de SV sostenida e impacto de la edad de SV en la misma**

Un mayor conocimiento y entendimiento de la dinámica del tamaño de los reservorios del HIV-1 a lo largo de una SV sostenida y duradera, como así también de los factores que influyen en dicha dinámica, es de gran importancia al momento de evaluar a largo plazo la eficacia de los TARVc actuales. Si bien al respecto hay varios trabajos reportados, la mayoría corresponde a poblaciones adultas, siendo escasa la información correspondiente a poblaciones pediátricas. Y es importante mencionar que, a diferencia de los adultos, en donde el momento de la infección es generalmente desconocido o estimado de manera poco precisa, en niñas y niños HIV-positivos mediante TV el momento preciso de la infección ocurre en una brecha de tiempo considerablemente estrecha. Por lo tanto, existe un menor sesgo en el estudio de la dinámica de los reservorios en pediatría.

##### **4.3.1. Características de la población de estudio**

Se estudió la dinámica de decaimiento del tamaño del reservorio de HIV-1 circulante a partir de la medición longitudinal en CMT del nivel de ADN-HIV total y de la frecuencia de círculos de 2-LTR en 36 pacientes HIV-positivos por TV y que alcanzaron la SV a diferentes edades:  $\leq 1,5$  años (Grupo 1),  $>1,5 - 5$  años (Grupo 2) y  $>5$  años (Grupo 3). Las principales características de los pacientes se resumen en la Tabla 4-4. La mediana de inicio de TARVc de la población de estudio fue de 2 años y la mayoría de los pacientes (55,6%) no recibió tratamiento profiláctico de ningún tipo. Sólo 10 (27,8%) pacientes iniciaron TARVc antes de los 6 meses de infección, lo cual se considera como un inicio moderadamente temprano. Además, se observó que la mayoría de nuestra población pediátrica experimentó una respuesta efectiva al TARVc tardía, con una mediana de edad de 5,1 años. Del total de pacientes, solo 8 (22,2%) alcanzaron la SV antes de los 1,5 años, y otros 8 la alcanzaron desde los 1,5 años hasta los 5 años, mientras que 20 (55,6%), la gran mayoría, inicio la SV luego de 5 años. En cuanto al perfil inmunológico general de la

**Tabla 4-4. Características descriptivas de la población de estudio II (ver Materiales y Métodos) de acuerdo a la edad a la que alcanzaron la SV.**

Característica	Total (n=36)	Edad de inicio de la SV			p-valor
		≤1,5 años (Grupo 1; n=8)	>1,5 - 5 años (Grupo 2; n=8)	>5 años (Grupo 3; n=20)	
<b>Genero, nro.(%), femenino</b>	21 (58,3)	7 (87,5)	6 (75,0)	8 (40,0)	0,047 <sup>†</sup>
<b>Año de nacimiento, mediana (C1-C3)</b>	2000 (1999 - 2002)	2003 (2000 - 2007)	2002 (1999 - 2005)	2000 (1998 - 2000)	0,012 <sup>‡</sup>
<b>Tratamiento antirretroviral profiláctico, nro.<sup>a</sup></b>					0,018 <sup>†</sup>
Ninguno	20 (55,6)	1 (12,5)	6 (75,0)	13 (65,0)	
Parcial	6 (16,7)	4 (50,0)	1 (12,5)	1 (5,0)	
Completa	7 (19,4)	3 (37,5)	1 (12,5)	3 (15,0)	
Desconocido	3 (8,3)	0 (0,0)	0 (0,0)	3 (15,0)	
<b>Edad de inicio de TARVc en años, mediana (C1-C3)</b>	2,0 (0,5 - 3,9)	0,3 (0,3 - 0,7)	2,1 (1,5 - 2,8)	3,1 (1,0 - 7,6)	0,001 <sup>‡</sup>
<b>TARVc inicial, nro. (%)<sup>b</sup></b>					0,306 <sup>†</sup>
2 INTIs + INNTI	13 (36,1)	1 (12,5)	4 (50,0)	8 (40,0)	
2 INTIs + IP	23 (63,9)	7 (87,5)	4 (50,0)	12 (60,0)	
<b>Edad de inicio de SV en años, mediana (C1-C3)</b>	5,1 (2,4 - 8,9)	0,9 (0,8 - 1,2)	3,3 (2,6 - 4,3)	8,2 (5,7 - 11,0)	<0,001 <sup>‡</sup>
<b>TARVc al inicio de SV, nro.(%)<sup>b</sup></b>					0,042 <sup>†</sup>
2 INTIs + INNTI	19 (52,8)	1 (12,5)	5 (62,5)	13 (65,0)	
2 INTIs + IP	17 (47,2)	7 (87,5)	3 (37,5)	7 (35,0)	
<b>CVp pre-TARVc, log<sub>10</sub> copias/mL, mediana (C1-C3)</b>	5,89 (5,06 - 6,20)	5,87 (5,23 - 6,19)	6,28 (5,87 - 6,50)	5,73 (4,96 - 5,90)	0,129 <sup>‡</sup>
<b>Población inmune pre-TARVc, mediana (C1-C3)</b>					
Nro. de células T CD4 <sup>+</sup> , células/mm <sup>3</sup>	850 (306 - 1633)	2724 (2566 - 2768)	863 (426 - 1338)	561 (252 - 912)	0,002 <sup>‡</sup>
% de células T CD4 <sup>+</sup>	20,0 (13,0 - 28,0)	37,5 (26,0 - 47,5)	18,5 (13,8 - 22,5)	17,5 (12,25 - 22,5)	0,008 <sup>‡</sup>
Relación CD4/CD8	0,49 (0,35 - 1,13)	1,74 (1,27 - 2,09)	0,49 (0,45 - 0,73)	0,35 (0,13 - 0,47)	0,035 <sup>‡</sup>
<b>Población inmune al final del estudio, mediana (C1-C3)</b>					
Nro. de células T CD4 <sup>+</sup> , células/mm <sup>3</sup>	977 (815 - 1157)	1366 (1068 - 1689)	1094 (970 - 1318)	908 (654 - 1010)	0,038 <sup>‡</sup>
% de células T CD4 <sup>+</sup>	35,0 (30,8 - 39,3)	41,3 (39,5 - 42,8)	37,0 (34,0 - 38,5)	33,0 (28,0 - 37,0)	0,050 <sup>‡</sup>
Relación CD4/CD8	1,03 (0,82 - 1,31)	1,56 (1,33 - 1,71)	1,28 (1,13 - 1,31)	0,84 (0,74 - 1,06)	0,017 <sup>‡</sup>

<sup>a</sup> Criterio de clasificación basado en el protocolo ACTG 076: Completo, administración de zidovudina a la madre durante el parto y al bebé durante las primeras 6 semanas de vida; Parcial, administración de zidovudina solo a uno de los anteriores; Ninguno, no administración de zidovudina, tanto a la madre como al bebé.

<sup>b</sup> INTIs: inhibidores nucleosídicos de la transcriptasa inversa; INNTI: inhibidor no nucleosídico de la transcriptasa inversa; IP: inhibidor de proteasa.

<sup>†</sup>=test de Fisher

<sup>‡</sup>=test de Kruskal-Wallis

población al comienzo de la SV, este se caracterizó por un muy bajo recuento de células T CD4<sup>+</sup> y una relación CD4/CD8 invertida (ver Tabla 4-4), por lo que 16 (44,4%) y 11 (30,6%) presentaron un estadio inmunológico de infección por HIV-1 (ver Tabla 1-1) avanzado igual a 3 y 2, respectivamente, mientras que solamente 4 (11%) pacientes

presentaron un estadio igual a 1 (en 5 pacientes se desconocía el dato). Al final del periodo de estudio se observó una clara recuperación general del perfil inmunológico, con un incremento del recuento de células T CD4<sup>+</sup> y la normalización de la relación CD4/CD8 (ver Tabla 4-4), en donde 31 (86,1%) pacientes presentaron un estadio inmunológico 1, sólo uno (2,8%) presentó un estadio 2 y ninguno presentó un estadio 3 (en 4 pacientes se desconocía el dato). Finalmente, 20 (55,6%) pacientes experimentaron al menos un rebote transitorio de la CVp a lo largo de los 4 años de SV.

Entre las características más destacadas de los grupos definidos de acuerdo a la edad de SV, se observó que los pacientes del grupo 1 nacieron más recientemente y, a su vez, recibieron en mayor medida algún tipo de tratamiento antirretroviral profiláctico, con respecto a los del grupo 3 ( $p=0,02$  y  $p=0,005$ , respectivamente). Además, el grupo 1 tuvo un inicio de TARVc más temprano respecto a los grupos 2 ( $p=0,029$ ) y 3 ( $p=0,001$ ), mientras que entre estos últimos dos grupos no hubo diferencia ( $p=0,462$ ). Posiblemente, como consecuencia de ello, el grupo con SV más temprana presentó un mejor perfil inmunológico basal (pre-SV), que los otros dos grupos. Esto quedó evidenciado por un mayor recuento de células T CD4<sup>+</sup> en el grupo 1 respecto a los grupos 2 ( $p=0,015$ ) y 3 ( $p=0,002$ ). Al final del estudio, los diferentes grupos no evidenciaron una clara diferencia en cuanto al recuento de células T CD4<sup>+</sup> y a la relación T CD4/CD8 (ver Tabla 4-4).

#### ***4.3.2. El ADN-HIV total decae rápidamente durante los primeros dos años de SV y luego se estabiliza, independientemente de su forma de expresión***

A partir de los 36 pacientes estudiados, se observó que a lo largo de 4 años de SV el nivel de ADN-HIV siguió una dinámica de decaimiento bifásica. La media de ADN-HIV total al inicio de la SV fue de 3,29 log<sub>10</sub> copias/millón de CMT. A partir de ese momento y durante los primeros 2 años de SV, el nivel de ADN-HIV total decayó significativamente rápido ( $p<0,001$ ) con una pendiente de -0,57 log<sub>10</sub> copias/millón de CMT por año (ver Tabla 4-5 y Figura 4.2). Luego, entre los 2 a 4 años de SV el nivel de ADN-HIV experimentó una segunda fase de decaimiento más lenta respecto a la primera, con una pendiente de -0,13 log<sub>10</sub> copias/millón de CMT por año. Así, en la segunda fase el descenso neto de ADN-HIV total fue de 0,27 log<sub>10</sub> copias/millón de CMT en 2 años, y en la primera fase fue de 1,13 log<sub>10</sub> copias/millón de CMT.

**Tabla 4-5. Velocidades de decaimiento y valores medios del nivel de ADN-HIV total, estimados durante la SV y por compartimento.**

Variable	CMT	Células T CD4 <sup>+</sup>	Sangre entera	p-valor <sup>a</sup>
<b>N° de mediciones</b>	93	84	86	NA
<b>Primera pendiente (0-2 años)<sup>b</sup></b>				
Estimada (IC.95%)	-0,57 (-0,74 a -0,39)	-0,34 (-0,52 a -0,17)	-0,35 (-0,52 a -0,17)	0,020
p-valor <sup>c</sup>	<0,001	<0,001	<0,001	NA
<b>Segunda pendiente (2-4 años)<sup>b</sup></b>				
Estimada (IC.95%)	-0,13 (-0,66 a 0,39)	-0,16 (-0,69 a 0,37)	-0,16 (-0,68 a 0,37)	0,230
p-valor <sup>c</sup>	0,017	0,322	0,297	NA
<b>Nivel estimado de ADN-HIV total, media (IP. 95%)<sup>d</sup></b>				
A tiempo de SV igual a 0	3,29 (2,85 a 3,75)	3,40 (2,97 a 3,84)	3,35 (2,94 a 3,809)	0,804
A tiempo de SV igual a 2	2,16 (1,77 a 2,54)	2,61 (2,22 a 3,00)	2,60 (2,21 a 2,99)	0,058
A tiempo de SV igual a 4	1,89 (1,58 a 2,21)	2,29 (1,96 a 2,61)	2,29 (1,97 a 2,61)	0,007

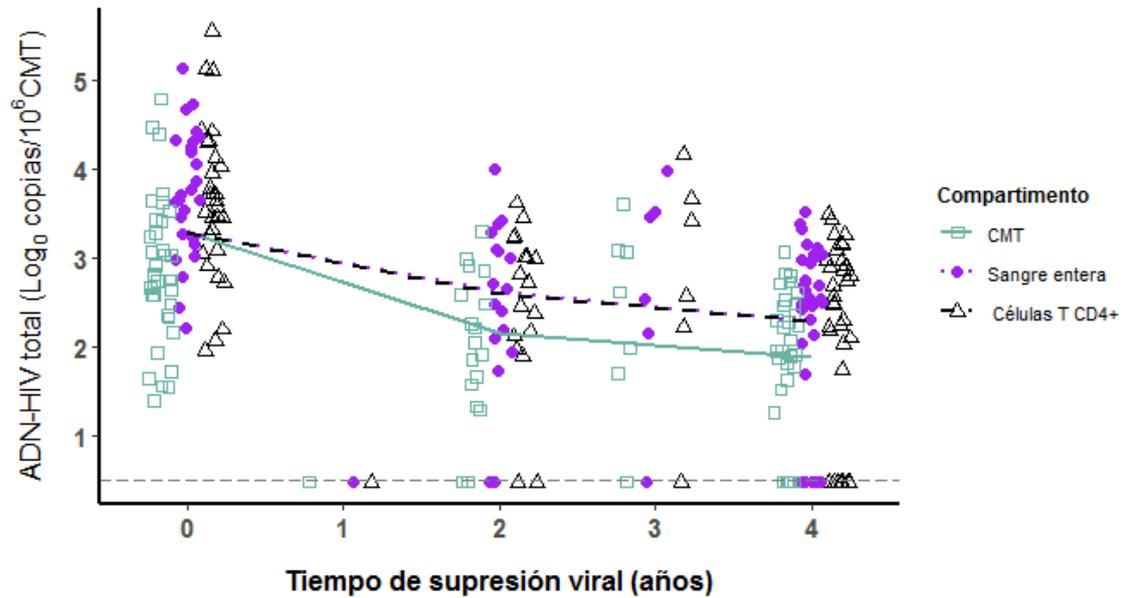
<sup>a</sup> P-valor representa la significancia estadística resultante de la comparación entre CMT, células T CD4<sup>+</sup> y sangre entera mediante modelos lineales mixtos. NA: no aplicable.

<sup>b</sup> La pendiente representa la velocidad de decaimiento del nivel de ADN-HIV total por período de SV y estimada de acuerdo al compartimento: CMT, log<sub>10</sub> copias/10<sup>6</sup> CMT por año; células T CD4<sup>+</sup>, log<sub>10</sub> copias/10<sup>6</sup> células T CD4<sup>+</sup> por año; y sangre entera, log<sub>10</sub> copias/mL de sangre entera por año. IC 95%: intervalo de confianza 0,95.

<sup>c</sup> P-valor representa la significancia estadística de la pendiente de cada compartimento obtenida mediante modelos lineales mixtos. Esto es, cuan diferente de 0 es la pendiente.

<sup>d</sup> Los niveles de ADN-HIV total están expresados en diferentes unidades de acuerdo al compartimento: CMT, log<sub>10</sub> copias/10<sup>6</sup> CMT; células T CD4<sup>+</sup>, log<sub>10</sub> copias/10<sup>6</sup> células T CD4<sup>+</sup>; y sangre entera, log<sub>10</sub> copias/mL de sangre entera. IP. 95%: intervalo predictivo 0,95.

La reconstitución del perfil inmunológico durante la SV, evidenciado por un incremento en el recuento de células T CD4<sup>+</sup> hasta valores normales, podría influir en la concentración de ADN-HIV total [189]. Por ello, se evaluó el efecto de normalizar el nivel de ADN-HIV total tanto al recuento de células T CD4<sup>+</sup>, como a la sumatoria de linfocitos y monocitos (sangre entera), a los efectos de estimar el decaimiento de ADN-HIV total. En términos generales, la dinámica de ADN-HIV total normalizada al recuento de células T CD4<sup>+</sup> o sangre entera fue similar a lo observado en CMT (ver Tabla 4-5 y Figura 4.2). En este sentido, el nivel de ADN-HIV total en CMT a lo largo del estudio correlaciona de manera positiva y significativa con el nivel normalizado al recuento de células T CD4<sup>+</sup> (<0,001) y sangre entera (p<0,001). En cuanto a la velocidad de decaimiento y el nivel medio de ADN-HIV total, estos fueron muy similares entre células T CD4<sup>+</sup> y sangre entera a lo largo de 4 años de SV. En estos dos compartimentos, el decaimiento inicial fue 1,7 veces más lento (p=0,02) que en CMT, por lo que el nivel medio a los 4 años de SV fue 0,40 log<sub>10</sub> superior a CMT (p=0,007).



**Figura 4.2. Velocidades de decaimiento del nivel de ADN-HIV total en diferentes compartimentos a lo largo de 4 años de SV sostenida.**

Las líneas en color negro, violeta y verde representan las trayectorias del nivel de ADN-HIV total para cada compartimento (de acuerdo a la leyenda), estimadas mediante modelos lineales mixtos, y la línea discontinua inferior en color gris representa el LIC del ensayo. Los puntos representan mediciones individuales del nivel de ADN-HIV total en tiempos específicos a lo largo de 4 años de SV. Los compartimentos analizados fueron CMT, células T CD4<sup>+</sup> y sangre entera, por lo que el nivel de ADN-HIV total se expresó en log<sub>10</sub> copias/10<sup>6</sup> CMT, log<sub>10</sub> copias/10<sup>6</sup> células T CD4<sup>+</sup> y log<sub>10</sub> copias/ mL de sangre entera.

Por otra parte, se evaluó la influencia de la edad de inicio de TARVc y del rebote transitorio de la CVp durante SV en la dinámica de ADN-HIV total en CMT. Para ello, se modeló la dinámica correspondiente al grupo de pacientes que inició el TARVc en un periodo menor o igual a 6 meses y se la comparó con la dinámica de aquellos pacientes que iniciaron TARVc luego de los 6 meses. Mientras que, para evaluar el impacto del rebote de la CVp durante SV, se agruparon los pacientes en dos grupos, los que experimentaron al menos un rebote y los que no. No se hallaron diferencias de acuerdo a la edad de inicio de TARVc ( $p=0,523$ ), ni tampoco por el rebote de la CVp durante SV ( $p=0,991$ ).

#### **4.3.3. Pacientes con inicio de SV durante el primer año y medio de vida tienden a un mayor decaimiento en el nivel de ADN-HIV total**

Dado que nuestra población de estudio se caracterizó por una edad de SV tardía, se definieron puntos de corte arbitrarios en la estratificación de la población de estudio de acuerdo a la edad de SV, buscando el mayor balance posible entre el número de pacientes

en cada grupo. A partir de ello, se evaluó el impacto de una respuesta moderadamente temprana (edad de SV  $\leq 1,5$  años, Grupo 1), tardía (edad de SV  $>1,5 - 5$  años, Grupo 2) y muy tardía ( $>5$  años, Grupo 3) en la dinámica del tamaño del reservorio circulante.

Al inicio de la SV no hubo diferencia en el nivel de ADN-HIV total entre los grupos, siendo el mismo igual a 3,02, 2,92 y 2,74  $\log_{10}$  copias/millón de CMT para el grupo 1, 2 y 3, respectivamente ( $p=0,265$ ) (ver Tabla 4-6 y Figura 4.3). El decaimiento inicial durante los primeros 2 años de SV fue 2,1 veces más rápido en el grupo 1, respecto a los grupos 2 y 3 que presentaron una pendiente muy similar entre ellos: -0,68 vs -0,33 y -0,29  $\log_{10}$  copias/millón de CMT por año, respectivamente. Asimismo, este descenso inicial fue claramente significativo sólo para el grupo 1 ( $p=0,002$ ), que experimentó durante los primeros 2 años de SV una reducción media de ADN-HIV total de 1,54  $\log_{10}$  copias/millón de CMT, mientras que el descenso en los grupos 2 y 3 fue de 0,73 y 0,48  $\log_{10}$  copias/millón de CMT, respectivamente. Sin embargo, la diferencia entre las pendientes de los tres grupos no fue significativa ( $p=0,116$ ). Esto podría deberse principalmente a la baja cantidad de pacientes en los grupos con SV temprana, y en menor medida, a la distribución de los tiempos de muestreo en los diferentes grupos. Tanto es así que, aunque el grupo 2 presentó una pendiente más pronunciada que el grupo 3 durante los primeros 2 años de SV, el decaimiento no fue significativo para el primero ( $p=0,142$ ), mientras que sí lo fue para el segundo ( $p=0,014$ ) (ver Tabla 4-6).

**Tabla 4-6. Velocidades de decaimiento y valores medios del nivel de ADN-HIV total, estimados durante la SV y por de acuerdo a la edad de inicio de la SV.**

Variable	Edad de inicio de la SV			p-valor <sup>a</sup>
	$\leq 1,5$ años (Grupo 1; n=8)	$>1,5 - 5$ años (Grupo 2; n=8)	$>5$ años (Grupo 3; n=20)	
<b>Primera pendiente (0-2 años)<sup>b</sup></b>				
Estimada (IC.95%)	-0,68 (-1,10 a -0,26)	-0,33 (-0,76 a 0,11)	-0,29 (-0,52 a -0,06)	0,116
P-valor <sup>c</sup>	0,002	0,142	0,014	NA
<b>Segunda pendiente (2-4 años)<sup>b</sup></b>				
Estimada (IC.95%)	0,13 (-1,21 a 1,46)	-0,11 (-1,41 a 1,19)	-0,15 (-0,82 a 0,51)	0,217
P-valor <sup>c</sup>	0,081	0,617	0,533	NA
<b>Nivel estimado de ADN-HIV total, media (IP. 95%)<sup>d</sup></b>				
A tiempo de SV igual a 0	3,02 (2,647 a 3,29)	2,92 (2,74 a 3,17)	2,74 (2,45 a 3,00)	0,265
A tiempo de SV igual a 2	1,48 (0,67 a 2,29)	2,19 (1,33 a 3,04)	2,26 (1,83 a 2,70)	0,072
A tiempo de SV igual a 4	1,74 (1,07 a 2,42)	1,97 (1,42 a 2,51)	1,95 (1,60 a 2,31)	0,159

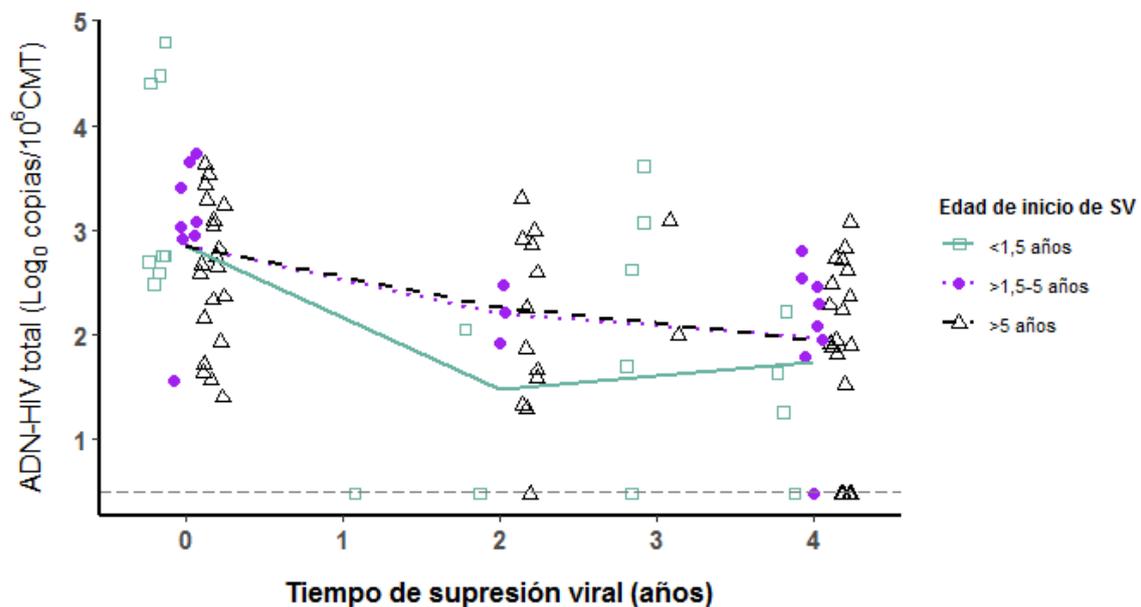
<sup>a</sup> P-valor representa la significancia estadística resultante de la comparación entre los grupos de pacientes con diferente edad de SV mediante modelos lineales mixtos. NA: no aplicable.

<sup>b</sup> La pendiente representa la velocidad de decaimiento del nivel de ADN-HIV total en CMT, expresada en  $\log_{10}$  copias/ $10^6$  CMT por año. IC 95%: intervalo de confianza 0,95.

<sup>c</sup> P-valor representa la significancia estadística de la pendiente de cada grupo mediante modelos lineales mixtos. Esto es, cuan diferente de 0 es la pendiente.

<sup>d</sup> Los niveles de ADN-HIV total en CMT están expresados en  $\log_{10}$  copias/ $10^6$  CMT. IP. 95%: intervalo predictivo 0,95.

A los dos años de SV el nivel de ADN-HIV total alcanzó un *plateau* en todos los grupos, por lo que su decaimiento fue muy leve hasta los 4 años de SV (ver Tabla 4-6 y Figura 4.3). Durante ese periodo, la disminución media del nivel de ADN-HIV total fue de 0,22  $\log_{10}$  copias/millón de CMT para el grupo 2 y de 0,31  $\log_{10}$  copias/millón de CMT para el grupo 3, en tanto el grupo 1 presentó un pequeño incremento de 0,26  $\log_{10}$  copias/millón de CMT. En consecuencia, al final del estudio -4 años de SV- el grupo 1 alcanzó un nivel de ADN-HIV ligeramente inferior a los grupos 2 y 3 ( $p=0,159$ ), siendo la media igual a 1,74  $\log_{10}$  copias/millón de CMT para el primero, 1,97  $\log_{10}$  copias/millón de CMT para el segundo y 1,95  $\log_{10}$  copias/millón de CMT para el tercero.



**Figura 4.3. Velocidades de decaimiento del nivel de ADN-HIV total de acuerdo a la edad de inicio de la SV y a lo largo de 4 años de SV sostenida.**

Las líneas en color negro, violeta y verde representan la trayectoria del nivel de ADN-HIV total de acuerdo a la edad de inicio de la SV (según leyenda), estimadas mediante modelos lineales mixtos, y la línea discontinua inferior en color gris representa el LIC del ensayo. Los puntos representan mediciones individuales del nivel de ADN-HIV total en tiempos específicos a lo largo de 4 años de SV y el color de los mismos refleja la edad de inicio de la SV del correspondiente paciente.

#### *4.3.4. La frecuencia de círculos de 2-LTR decaen en el tiempo independientemente del nivel de ADN-HIV total*

La frecuencia de círculos de 2-LTR al momento de la SV fue de 72,2%. Dicha frecuencia disminuyó significativamente a lo largo de 4 años de SV ( $p=0,001$ ), pero sin influencia alguna por parte del nivel de ADN-HIV total ( $p=0,904$ ), de la edad de SV ( $p=0,113$ ) y del rebote transitorio de la CVp en dicho periodo ( $p=0,198$ ). A pesar de que el nivel de ADN-HIV total no influyó en la dinámica de decaimiento de la frecuencia de círculos de 2-LTR, se observó que la mediana de ADN-HIV total en las muestras con círculos de 2-LTR detectables fue mayor en comparación con aquellas que no presentaban círculos de 2-LTR: 2,64 (C1-C3: 1,95 - 3,06) vs. 1,95 (C1-C3: 1,57 - 2,68)  $\log_{10}$  copias/millón de CMT, respectivamente ( $p=0,021$ ). Durante los primeros 2 años de SV, la frecuencia disminuyó al 35,3%, mientras que a los 4 años de SV alcanzó una frecuencia de 21,9%.

#### **4.4. Dinámica de establecimiento y mantenimiento de los reservorios del HIV-1 en niños con SV temprana y prolongada**

Un mayor conocimiento y entendimiento de la dinámica de establecimiento y mantenimiento de los reservorios a lo largo de una SV sostenida y prolongada bajo los esquemas de TARVc actuales, permitiría evaluar el impacto de nuevas terapias antirretrovirales. Además, podría contribuir en la búsqueda de biomarcadores asociados al rebote de la CVp ante la suspensión del TARVc y, en consecuencia, identificar posibles pacientes candidatos a una remisión virológica en ausencia de TARVc.

##### *4.4.1. Características de la población de estudio*

A los fines de esta sección, se ahondó en el estudio de 5 de los 36 pacientes de la sección 4.3, dado que fueron los únicos que alcanzaron la SV antes del año de vida y perduraron bajo dicha condición de forma prolongada (6 a 15 años). La totalidad de los mismos recibieron tratamiento antirretroviral profiláctico en forma parcial o completa y presentaron un perfil inmunológico normal a lo largo de todo el estudio (ver Tabla 4-7).

**Tabla 4-7. Características descriptivas de los pacientes de la población de estudio III (ver Materiales y Métodos).**

Característica	Paciente 1	Paciente 2	Paciente 3	Paciente 4	Paciente 5
Genero	Femenino	Femenino	Femenino	Femenino	Femenino
Año de nacimiento	2009	2007	2000	2000	2004
Tratamiento antirretroviral profiláctico <sup>a</sup>	Completo	Parcial	Completo	Completo	Completo
Edad de inicio de TARVc (meses)	4	4	2	4	7
TARVc inicial <sup>b</sup>	AZT + 3TC + LPV/r	AZT + 3TC + LPV/r	AZT + 3TC + NFV	AZT + 3TC + NFV	AZT + 3TC + NVP
CVp pre-TARVc (Log <sub>10</sub> copias/mL)	6,06	5,45	5,90	N/A	5,00
Edad de inicio de SV (meses)	8	10	11	8	11
Edad de última visita (años)	6,4	9,8	16,7	16,4	14,4
Recuento de células T CD4 <sup>+</sup> pre-TARVc, células/mm <sup>3</sup> (%)	2765 (50)	2891 (49)	N/A	2527 (24)	2058 (25)
Recuento de células T CD4 <sup>+</sup> en la última visita, células/mm <sup>3</sup> (%)	1701 (47)	1471 (43)	857 (36)	684 (36)	1136 (41)

<sup>a</sup> Criterio de clasificación basado en el protocolo ACTG 076: Completo, administración de zidovudina a la madre durante el parto y al bebé durante las primeras 6 semanas de vida; Parcial, administración de zidovudina solo a uno de los anteriores; Ninguno, no administración de zidovudina, tanto a la madre como al bebé.

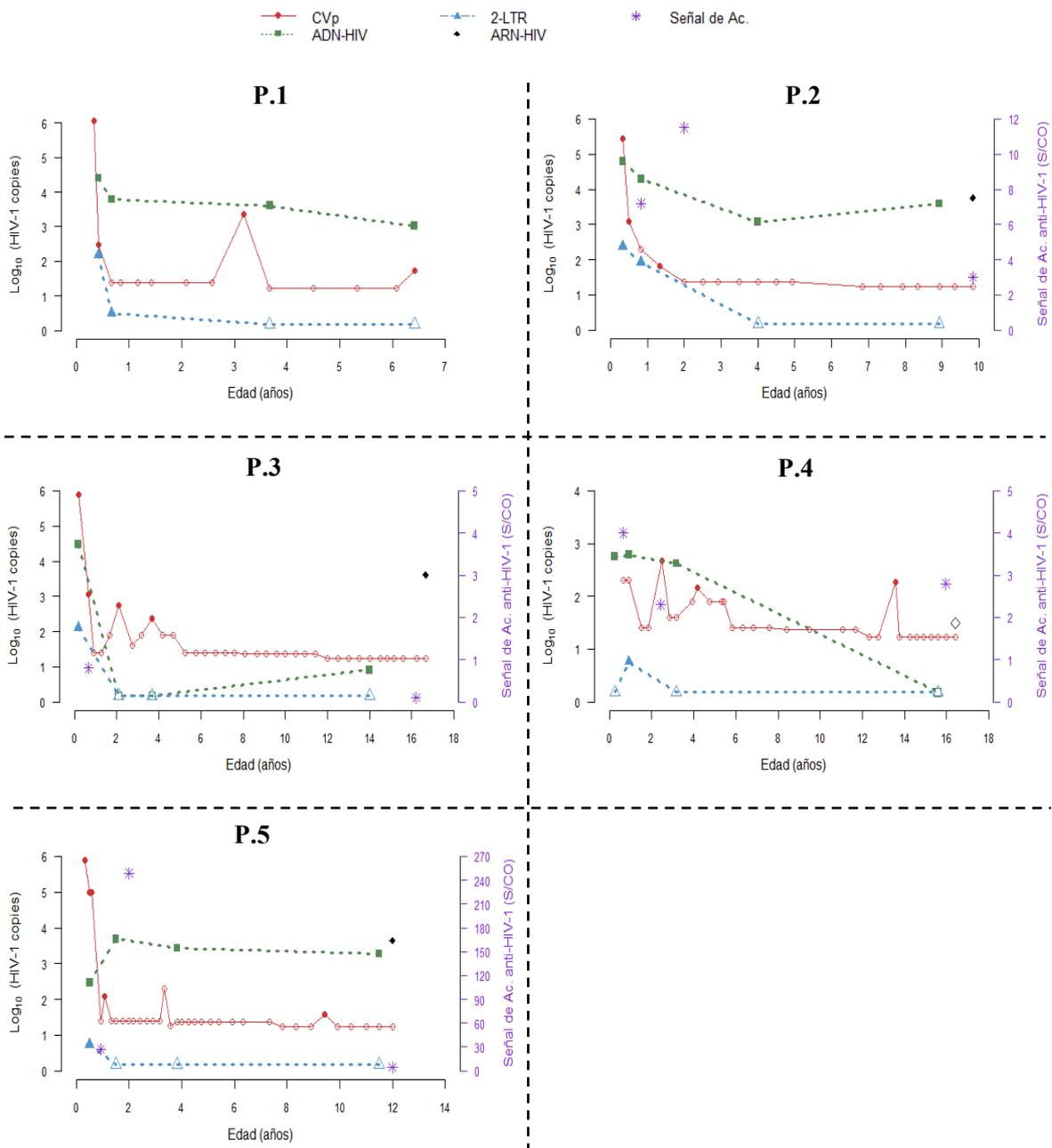
<sup>b</sup> AZT: zidovudina; LPV/r: lopinavir/ritonavir; NVP: nevirapina; 3TC: lamivudina.

#### 4.4.2. El reservorio de HIV-1 en circulación permanece estable a lo largo de 6 a 15 años de SV sostenida, a pesar de un inicio de SV temprano

En la totalidad de los pacientes, se estimó el tamaño del reservorio en circulación a partir de la medición longitudinal (pre-SV y durante 6-15 años de SV, dependiendo del paciente) de los niveles de ADN-HIV total y de círculos de 2-LTR, mientras que en 4 de ellos se midió también el nivel de ARN-HIV no procesado en la última visita (ver Figura 4.4). La mediana de ADN-HIV total basal -pre-SV- fue igual a 4,40 (C1-C3: 2,75 - 4,47) log<sub>10</sub> copias/millón de CMT, en tanto que la mediana de círculos de 2-LTR en dicho punto fue de 2,11 (C1-C3: 0,74 - 2,18) log<sub>10</sub> copias/millón de CMT. Luego, si bien, la dinámica del nivel de ADN-HIV total fue variable entre los pacientes, en 3 de ellos (pacientes 1, 2 y 5) se mantuvo detectable a lo largo de todo el periodo de estudio (6 a 10 años de SV, dependiendo del paciente). Por el contrario, el nivel de círculos de 2-LTR sólo fue detectable hasta antes o en el momento justo que inició la SV en la totalidad de los pacientes. Sorprendentemente, en todos los pacientes a los que se le realizó la medición el nivel de ARN-HIV total no procesado (pacientes 2-5) durante la última visita, este fue detectable, siendo la mediana igual a 3,64 (C1-C3: 3,61 - 3,64) log<sub>10</sub> copias/μg de ARN.

En los pacientes 2 a 5 se monitoreó la señal de anticuerpos específicos anti-HIV-1 basal (al inicio de la SV, periodo donde aún hay presencia de anticuerpos maternos), entre

los 1,1 y 1,8 años de SV (lo que equivale a una edad >1,5 años, pérdida de anticuerpos maternos), y entre los 9,0 y 15,8 años de SV. En todos los pacientes se observó un descenso en la señal S/CO (del inglés *sample/cut-off*), que es una medida indirecta del título de anticuerpos anti-HIV-1, entre el segundo y tercer/último tiempo de medición (ver Figura 4.4). En los pacientes 2, 4 y 5 los valores de S/CO alcanzados en el último tiempo de medición manifestaron la presencia de anticuerpos específicos contra el HIV-1, en cambio en el paciente 3 dicho valor se correspondió con la ausencia de anticuerpos anti-HIV-1, tratándose de un caso de seroreversión.



#### **Figura 4.4. Evolución del tamaño del reservorio de HIV-1 durante la SV.**

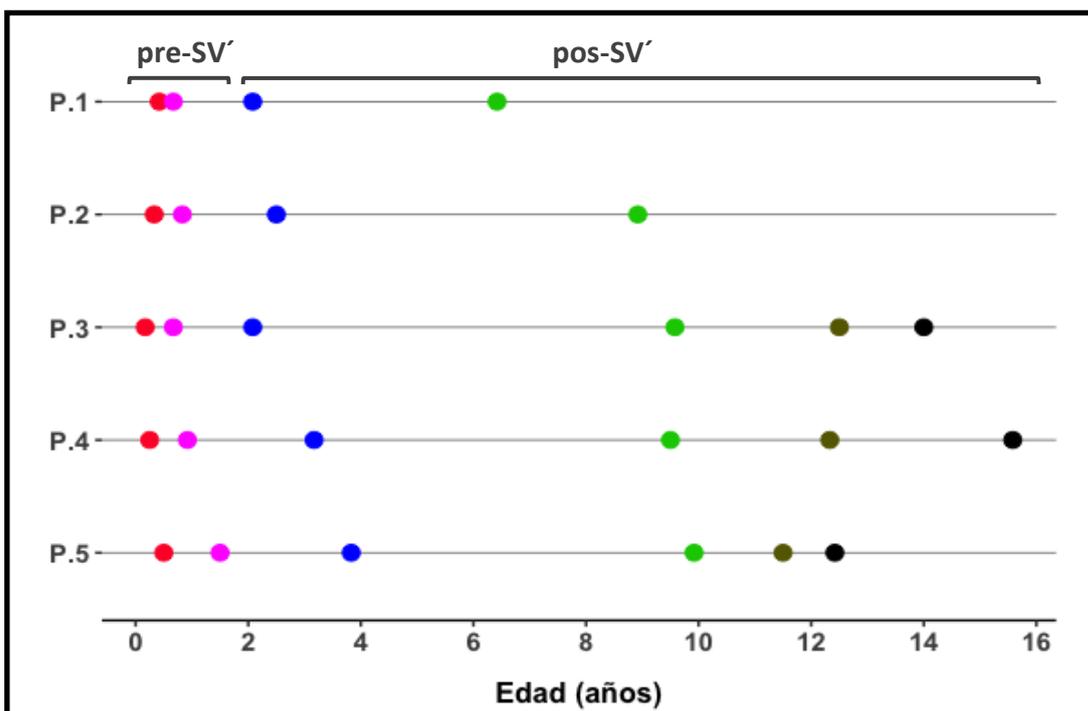
Cada panel delimitado por líneas punteadas muestra la evolución de los niveles de CVp ( $\log_{10}$  copias/mL), ADN-HIV total ( $\log_{10}$  copias/ $10^6$  CMT), círculos de 2-LTR ( $\log_{10}$  copias/ $10^6$  CMT) y ARN-HIV no procesado ( $\log_{10}$  copias/ $\mu$ g ARN), para cada paciente. Los símbolos sólidos indican niveles cuantificables, mientras que los vacíos representan mediciones que estuvieron por debajo del LIC del correspondiente ensayo. La señal de anticuerpos anti HIV-1 (S/CO) fue representada con símbolos en color violeta y su escala de nivel se encuentra en el eje y de la derecha.

#### **4.4.3. Métricas del proceso de obtención y caracterización de los haplotipos de HIV-1 en CMT**

Se obtuvieron de forma longitudinal los haplotipos de los 5 pacientes estudiados en las secciones 4.4.1 y 4.4.2, mediante secuenciación por NGS de un fragmento del gen *gag* del HIV-1. En un análisis global de todos los pacientes, se obtuvo un rango de 9.548 a 235.926 lecturas pareadas por muestra (media igual a 145.698). La tasa de error de todo el proceso de secuenciación se calculó en base al promedio de bases erróneas presentes en tres réplicas del plásmido pNL4-3, que fueron secuenciados en simultáneo con las muestras de interés. Dicha tasa de error total fue de 0,3%, por lo que se encontró dentro del rango reportado para este tipo de procedimientos [190,191]. La mediana de haplotipos por debajo de dicha tasa de error y que en consecuencia se descartaron del análisis, fue de 21 (C1-C3: 2 – 35). Es importante mencionar que, tanto el número de lecturas como el número de haplotipos obtenidos, no presentaron asociación con el nivel de ADN-HIV total ( $p=0,392$ ,  $p=0,228$ , respectivamente).

Se entiende que los haplotipos defectivos -con codones de terminación prematuros e hipermutaciones- presentes durante la SV no forman parte del reservorio del HIV-1. Asimismo, que hasta los primeros dos años de SV el nivel de ADN puede decaer significativamente. Por lo tanto, se consideraron a los haplotipos no defectivos obtenidos luego de los primeros 2 años de SV como parte del reservorio circulante. Considerando todo ello, se evaluaron las características y la dinámica de los haplotipos no defectivos de cada paciente en dos periodos: i) **pre-SV'**: desde el inicio del estudio, el cual coincide con el inicio del TARVc, hasta el segundo año de SV; y ii) **pos-SV'**: luego del segundo año de SV hasta los 6 a 15 años de SV, dependiendo del paciente (ver Figura 4.5). De acuerdo con esta clasificación, se observó que, la mediana de haplotipos defectivos por muestra y que, en consecuencia, fueron eliminados del análisis fue igual a 1 (rango: 0 - 11) pre-SV' y 0

(rango: 0 - 16) pos-SV'. La mediana de abundancia de estos haplotipos defectivos sobre el total obtenido por muestra fue de 4,2% (C1-C3: 0,0 - 6,3) pre-SV' y 0,0% (C1-C3: 0,0 - 29,6) pos-SV' ( $p=0,752$ ). En cambio, la mediana de haplotipos no defectivos, que por lo tanto fueron incluidos en el análisis, fue de 17 (C1-C3: 14 - 24) pre-SV' e igual a 10 (C1-C3: 6 - 17) pos-SV' ( $p=0,214$ ).



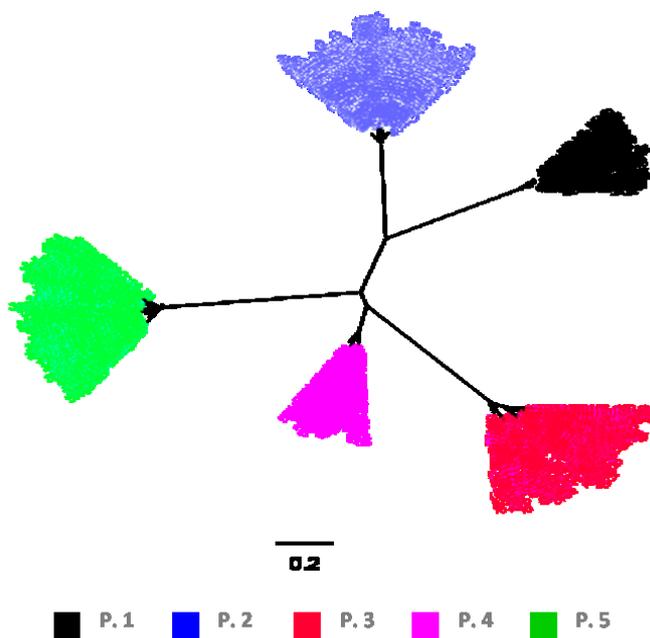
**Figura 4.5. Tiempos de muestreo para cada paciente.**

Cada línea horizontal representa el tiempo de estudio para cada paciente, en donde se puede observar, mediante un círculo de color, la edad del paciente en cada tiempo de muestreo. El color del círculo representa el orden de la toma de muestra, por lo que los círculos rojos corresponden a las primeras muestras, los rosados a las segundas y así sucesivamente. En todos los pacientes, la primera muestra fue tomada previo al inicio del TARVc. Asimismo, los haplotipos obtenidos a partir de la tercera muestra (pos-SV') fueron considerados como parte del reservorio del HIV-1 en circulación.

#### 4.4.4. Ausencia de evidencia de evolución genética del reservorio de HIV-1 en circulación

El procedimiento para la obtención de los haplotipos mediante NGS fue compleja y requirió de la manipulación en simultáneo y de forma reiterada de los amplicones obtenidos para todos los pacientes. Esto puede ocasionar la contaminación y el

entrecruzamiento de muestras entre pacientes. Por ello, previo al análisis de las relaciones filogenéticas entre los haplotipos obtenidos para cada paciente, se evaluaron todos los haplotipos de los 5 pacientes en un único análisis y se determinó si hubo eventos de contaminación cruzada. En el árbol de la Figura 4.6 se puede observar que todos los haplotipos de cada paciente se agrupan entre sí y no con los de otro paciente, con un valor de *bootstrap* mayor a 98, descartando cualquier evento de contaminación o entrecruzamiento de muestras entre distintos pacientes. De esta manera, posteriormente, se procedió al análisis de cada paciente por separado.

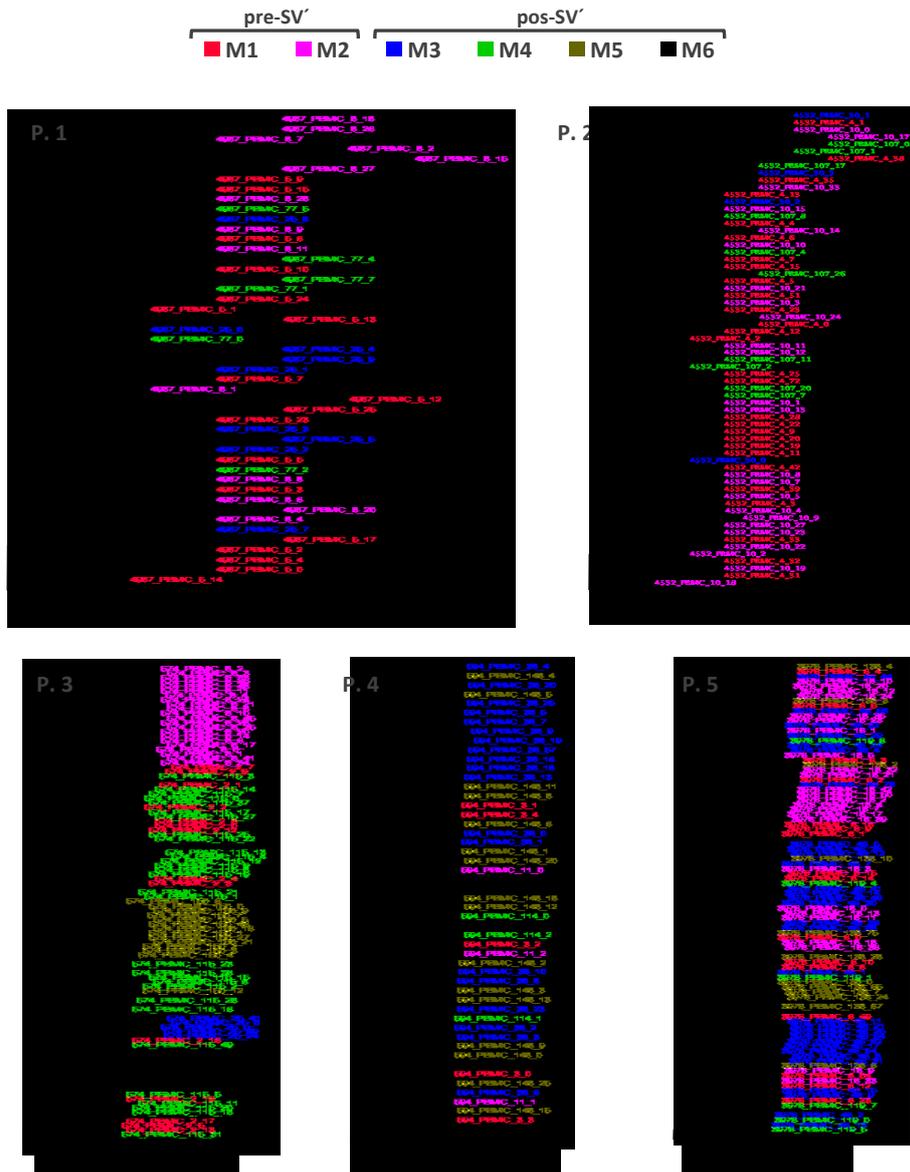


**Figura 4.6.** . Árbol filogenético obtenido por *maximum likelihood* a partir de los haplotipos de todos los pacientes.

Los haplotipos de cada paciente se marcaron con distintos colores de acuerdo a la leyenda.

Para buscar evidencia de replicación viral durante la SV sostenida, se compararon los haplotipos de las muestras cercanas al inicio del TARVc con los haplotipos de los distintos tiempos de SV sostenida. Si el virus replica durante la SV, es esperable que los haplotipos aislados a distintos tiempos tengan un vínculo genético cercano en cada tiempo de muestreo. Cuando se evaluaron las relaciones filogenéticas por *maximum likelihood*, se observó en todos los pacientes, a excepción del paciente 3, que los haplotipos de las muestras tomadas a distintos tiempos se entremezclaron entre sí (ver Figura 4.7). A modo general, se puede observar que los haplotipos al momento del inicio de TARVc (M1) se

distribuyen a lo largo de todo el árbol filogenético. Sin embargo, se observan agrupamientos particulares, como en el caso del paciente 3, donde se observó que todos los haplotipos del tiempo M2 y M3 se agruparon en un solo clado monofilético para cada tiempo.



**Figura 4.7. Árbol filogenético de los haplotipos de cada paciente obtenido por maximum likelihood.**

Los haplotipos obtenidos por cada tiempo del estudio se distinguieron con distintos colores de acuerdo a la leyenda. La primera muestra (M1) de cada paciente se representan en color rojo, la segunda muestra (M2) en rosado y así sucesivamente.

La estrecha vinculación genética de los haplotipos en SV no implica, directamente,

evolución. Para evidenciar la evolución, además debe demostrarse que los cambios genéticos se acumulan de manera temporal. En el análisis de *root-to-tip distance*, que evalúa sobre el árbol filogenético la distancia genética de los haplotipos con respecto a los distintos tiempos de muestreo, se observó que la regresión lineal obtenida para cada paciente varió tan solo en un rango de  $R^2$  de 0,001 a 0,198. Estos valores tan bajos dan indicio de una carencia de estructura temporal, por tanto, esto muestra que en ningún paciente se encontró evidencia consistente de evolución genética durante la SV, sugiriendo que el virus no replica bajo TARVc efectivo.

#### 4.4.5. La proliferación de células infectadas antes del inicio del TARVc es el principal mecanismo de persistencia del reservorio de HIV-1 en circulación

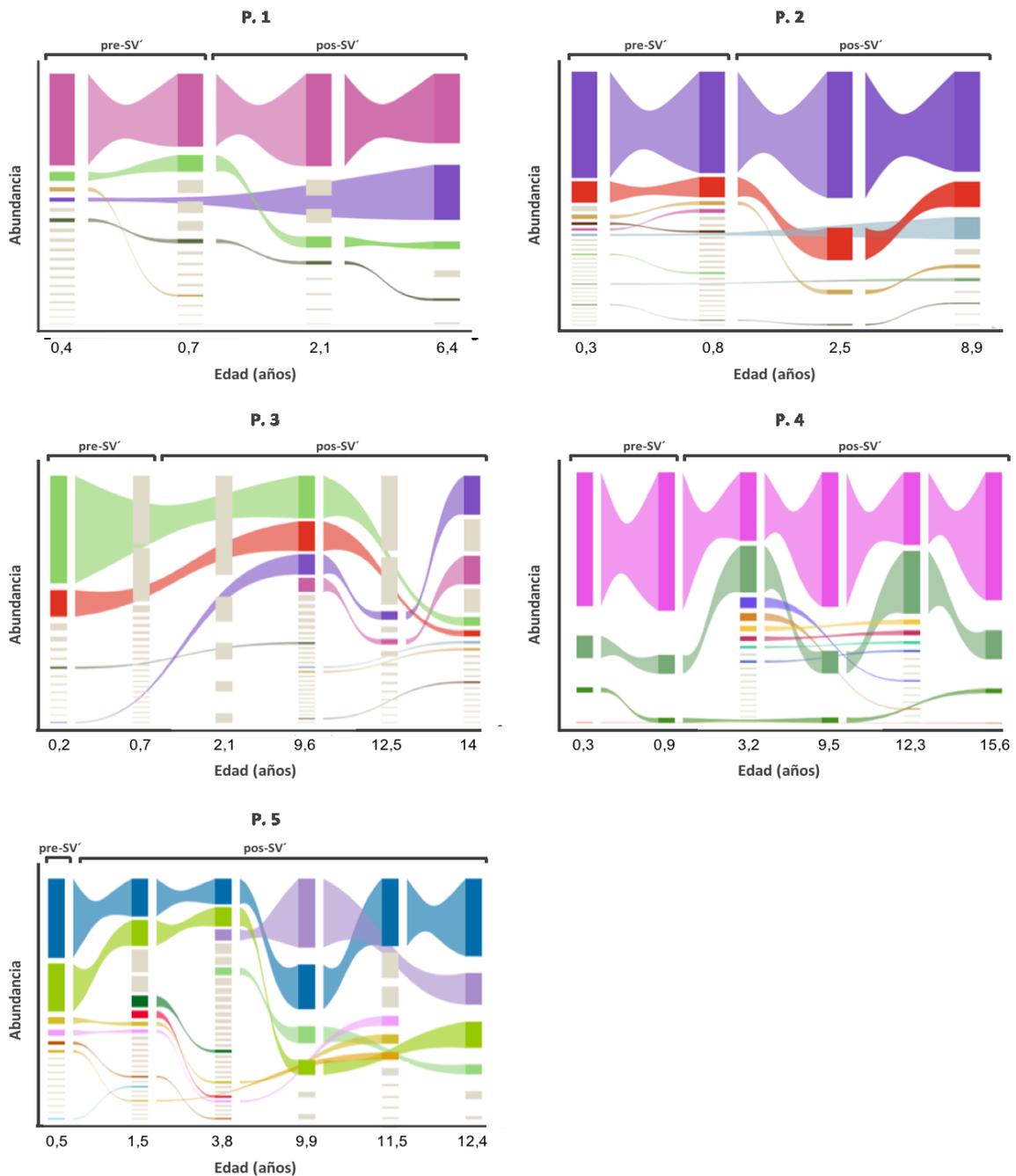
En la Figura 4.8 se representa la dinámica de los haplotipos no defectivos obtenidos para cada paciente. Para un mejor análisis, los haplotipos se clasificaron en 2 grupos: i) **haplotipos únicos**, son aquellos que aparecieron solo en un tiempo de muestreo; y ii) **haplotipos repetidos**, son aquellos que aparecieron en más de un tiempo de muestreo. En la Tabla 4-8 se evalúan las principales características de ambos grupos de haplotipos en pre- y pos-SV'.

**Tabla 4-8. Composición de haplotipos únicos y repetidos por muestra.**

Variable, mediana (C1-C3)	pre-SV'			pos-SV'		
	Únicos	Repetidos	p-valor	Únicos	Repetidos	p-valor
Nº de haplotipos	14 (10 - 16)	6 (4 - 9)	0,009	7 (3 - 12)	4 (4 - 8)	0,364
Abundancia individual, (%)	0,93 (0,58 - 1,58)	2,68 (1,17 - 12,16)	<0,001	1,25 (0,81 - 2,69)	5,33 (1,69 - 18,06)	<0,001
Abundancia total, (%)	18,52 (13,46 - 34,53)	85,37 (81,47 - 92,59)	0,015	25,05 (6,73 - 43,81)	92,91 (60,48 - 95,12)	<0,001

El número de haplotipos únicos por muestra fue considerablemente mayor al de haplotipos repetidos durante pre-SV' (mediana igual a 14 vs 6, respectivamente), mientras que estos fueron similares durante pos-SV' (mediana igual a 7 vs 4, respectivamente). Sin embargo, los haplotipos repetidos presentaron una abundancia individual por muestra significativamente mayor que los haplotipos únicos, tanto en pre-SV' (mediana de

abundancia de cada haplotipo igual a 2,68% vs. 0,93%, respectivamente), como en pos-SV' (mediana de abundancia de cada haplotipo igual a 5,33% vs. 1,25%, respectivamente). Al estudiar la proporción que representan la totalidad de haplotipos repetidos y únicos por muestra, se observó que una proporción significativamente mayor de los haplotipos obtenidos eran repetidos, tanto durante pre-SV' (mediana igual al 85,37% y 18,52% para haplotipos repetidos y únicos, respectivamente), como durante pos-SV' (mediana del 92,91% y 25,05% para haplotipos repetidos y únicos, respectivamente).



**Figura 4.8. Dinámica de los haplotipos no defectivos obtenidos para cada paciente, antes del inicio del TARVc y durante la SV.**

Se realizó un diagrama de Sankey por paciente para representar la dinámica de los haplotipos. En cada diagrama, se representa en el eje x el tiempo de SV, mientras que cada haplotipo obtenido por tiempo se representa mediante un rectángulo, en donde la altura del mismo es proporcional a la abundancia (frecuencia) de dicho haplotipo. Los rectángulos en color representan a los haplotipos que aparecieron en más de un tiempo del estudio (haplotipos repetidos), mientras que aquellos en gris representan a los haplotipos que solo aparecieron en una muestra (haplotipos únicos). Los haplotipos repetidos están conectados de tal manera que se puede observar la progresión de dicho haplotipo a lo largo del estudio.

Resulta interesante que los haplotipos más abundantes luego del primer año de SV también se encontraban presentes previo al inicio del TARVc (ver Figura 4.8), y que representaron una mediana de abundancia total igual al 70,82% (C1-C3: 48,21 – 94,58) por muestra. Por lo tanto, la permanencia de esta gran abundancia de haplotipos, sin la acumulación de mutaciones desde el inicio del TARVc hasta los 6 a 15 años de SV, dependiendo el paciente, evidencia que el principal mecanismo de mantenimiento del reservorio durante el TARVc efectivo es la proliferación de células infectadas previo al inicio del mismo.

Finalmente, se observó que los pacientes 3 y 5 presentaron una mayor fluctuación en la abundancia de haplotipos repetidos y mayoritarios, por lo que mostraron una dinámica general más estocástica que el resto de los pacientes. Asimismo, estos dos pacientes fueron los que presentaron una mayor abundancia de haplotipos únicos por muestra, con un rango de 29,47% a 100% en el paciente 3 y de 6,73% a 52,74% en el paciente 5. De hecho, el paciente 3 fue el único en presentar en una misma muestra haplotipos únicos solamente, hecho que se observó en la muestra al momento del inicio de la SV (2,1 años de vida) y en la siguiente (9,6 años de vida). Es importante destacar que los haplotipos de esas dos muestras se agruparon con el resto de los haplotipos obtenidos para dicho paciente (ver Figura 4.6). En contraste a los pacientes 3 y 5, los pacientes 2 y 4 presentaron una abundancia de haplotipos únicos por muestra inferior al 10%.

## **5. DISCUSIÓN**

Luego de más de tres décadas desde el surgimiento de la pandemia del HIV-1 en 1981, la búsqueda de una cura continúa siendo el principal desafío. No obstante, en las últimas dos décadas se ha mejorado notablemente la eficacia de las drogas antirretrovirales y disminuido su toxicidad. En paralelo, se mejoró sustancialmente el acceso al TARVc a nivel global, pasando de un total de 7,7 millones de personas que vive con el HIV-1 bajo TARVc en 2010 a 23,3 millones en 2018 [17]. También, hubo avances significativos en el tiempo de respuesta entre la confirmación del diagnóstico y el inicio de TARVc. Esto conllevó a que una gran parte de los individuos con buena adherencia al TARVc logre una SV sostenida, y de esta manera se reduzca significativamente la morbilidad y mortalidad asociada a la infección por HIV-1, mejorando la calidad de dichos individuos. Inclusive, surgieron casos prometedores en adultos, niños, niñas y adolescentes que iniciaron el TARVc en forma temprana (etapa aguda) y efectiva, y que luego de interrumpir el mismo presentaron un inusual control inmuno-virológico sostenido [192]. Estos casos aportan evidencias únicas acerca de cómo el inicio de TARVc en forma temprana y efectiva puede influir en la permanencia y manifestación del reservorio de HIV-1.

En este contexto, este trabajo de tesis tuvo como principal objetivo estudiar el impacto del tiempo de inicio del TARVc, así como el tiempo de respuesta al mismo, en la evolución del tamaño y la genética del reservorio viral en niñas y niños HIV-positivos por TV. Para ello, se desarrollaron ensayos para la cuantificación de distintos marcadores del reservorio de HIV-1, mediante los cuales se estudiaron poblaciones de pacientes con diferente tipo y tiempo de respuesta al TARVc. Nuestros resultados mostraron que el tiempo que demora el paciente en alcanzar la SV impacta en la dinámica del tamaño del reservorio en circulación, mientras que el tiempo de inicio del TARVc, en nuestra población de estudio, no influyó en dicha dinámica. Más importante aún, se hallaron niveles cuantificables de ADN-HIV total y ARN-HIV no procesado luego de 6 a 15 años de SV, a pesar de que los pacientes iniciaron el TARVc tempranamente y alcanzaron dicha supresión antes del año de vida. Al estudiar el mecanismo de persistencia de este reservorio circulante, se hallaron claras evidencias de que el mismo se debe, principalmente, a la proliferación homeostática de células latentemente infectadas previo al inicio del TARVc. Sin embargo, y a pesar de que no se halló señal de evolución genética del reservorio durante la SV, no se puede descartar

la posibilidad de que la replicación viral residual sea también una vía para el mantenimiento del reservorio.

### **5.1. Desarrollo, evaluación e implementación de ensayos para el monitoreo del reservorio circulante en nuestra región**

Desde la identificación de los reservorios del HIV-1 en pacientes bajo TARVc, la medición de la persistencia del virus ha sido y continúa siendo uno de los mayores desafíos dentro del campo de investigación en HIV-1. En el presente trabajo se desarrollaron tres ensayos para la cuantificación de ADN-HIV total, círculos de 2-LTR y ARN-HIV no procesado. Todos estos ensayos comparten el principio de PCR en tiempo real semi-anidada y además los ensayos de ADN-HIV total y ARN-HIV no procesado utilizan los mismos cebadores en su totalidad, que a su vez, son parcialmente los mismos a los del ensayo de círculos de 2-LTR. Es por ello que se decidió evaluar el desempeño en solo unos de los ensayos, que fue el ADN-HIV total, y luego corroborar dichos parámetros en los otros dos. Los ensayos presentaron un desempeño satisfactorio con una elevada sensibilidad (LIC de 3 a 7 copias por reacción) y precisión (rango de DS inter-ensayo no mayor a 0,9), así como una adecuada eficiencia de amplificación (>95%). Resulta importante destacar, que la sensibilidad alcanzada para los ensayos desarrollados utilizando el principio de PCR en tiempo real semi-anidada fue superior a la reportada para los métodos de PCR en tiempo real convencional [193], los cuales tienen dificultades para la cuantificación de niveles inferiores a 100 copias por reacción [194]. Pasternak *et al.* reportaron una sensibilidad similar (4 copias por reacción) también mediante el uso de PCR en tiempo real semi-anidada [187]. Sin embargo, dichos ensayos presentaron una menor precisión con respecto a los desarrollados en este trabajo (DS>1,5). Por otro lado, la mayoría de los ensayos de PCR desarrollados para la cuantificación de las diferentes formas de ADN-HIV son altamente específicos para las cepas de subtipo B [195–197], los cuales predominan en América Central y del Norte, junto con Australia y gran parte de Europa [198]. No obstante, en gran parte de América del Sur, incluida Argentina, las cepas circulantes son predominantemente recombinantes BF. Por este motivo, cabe destacar que las metodologías desarrolladas en el presente trabajo permiten la cuantificación de ADN-HIV total y episomal, y de ARN-HIV no procesado de cepas B, incluidas las cepas recombinantes BF de circulación local. Este

hecho fue demostrado tras el estudio de muestras clínicas, en donde fue posible detectar ADN-HIV total en casi todas las muestras con CVp detectable (96%, 29/30), como así también en aquellas con CVp no detectable (92,8%, 39/42). De hecho, este nivel de detección en pacientes con CVp no detectables se encuentra entre los máximos reportados [199–201].

Los ensayos desarrollados constituyen una importante herramienta para el estudio de los reservorios del HIV-1 en nuestra región, donde han sido escasamente abordados y menos aún en poblaciones pediátricas hasta el desarrollo del presente trabajo.

## **5.2. Impacto del TARVc efectivo sobre el tamaño del reservorio: evaluación del tiempo del inicio de tratamiento y supresión viral**

A partir del desarrollo de los ensayos para la medición de diferentes marcadores de reservorio de HIV-1, se evaluó en primera instancia, el comportamiento del nivel de ADN-HIV total en pacientes con respuesta efectiva y no efectiva al TARVc. La cuantificación del nivel de ADN-HIV es de gran utilidad para el monitoreo de la infección y recobra más valor aún en la evaluación de diferentes terapias cuando la CVp se vuelve indetectable. Se ha reportado en adultos que el nivel de ADN-HIV es un predictor del éxito del TARVc a largo plazo [202]. En dicho estudio los pacientes con bajo nivel de ADN-HIV al momento de inicio del TARVc presentaron mejor respuesta virológica e inmunológica al tratamiento y mayor sobrevida. En poblaciones pediátricas existen escasos datos acerca del nivel de ADN-HIV. Nuestros resultados mostraron que los niveles basales (pre-TARVc) de ADN-HIV total fueron similares entre pacientes pediátricos respondedores y no respondedores al TARVc, en concordancia con lo reportado por Tierney *et al.* [203]. Durante el TARVc, los pacientes respondedores alcanzaron niveles más bajos que los no respondedores, que mantuvieron los niveles basales, aunque dicha diferencia no fue significativa. Sin embargo, la reducción del nivel de ADN-HIV total luego de aproximadamente dos años de TARVc fue significativamente superior en pacientes respondedores. Avettand-Fènoël *et al.* a partir de una revisión bibliográfica sobre el comportamiento del nivel de ADN-HIV total, reportaron resultados similares, aunque principalmente basado en el estudio de poblaciones adultas [151]. Además, en ese mismo trabajo se observó que el ADN-HIV total durante el TARVc se correlaciona directamente con el nivel ADN-HIV total y la

CVp basal, lo cual se encuentra en línea con lo reportado por Boullé *et al.* [204] en población pediátrica. En contraste a estos dos trabajos, en nuestra cohorte no se observaron dichas asociaciones, al igual que lo reportado por Désiré *et al.* [197], aunque, es importante considerar que por el bajo número de pacientes de nuestra cohorte, no se pueden desestimar las correlaciones antes mencionadas.

El inicio temprano del TARVc está asociado no solo a una mejora en la morbi-mortalidad de los individuos, tanto adultos como niños, que viven con el HIV, sino también a un menor tamaño del reservorio [148]. Sin embargo, existen resultados disímiles acerca de cuan temprano debe ser el inicio de TARVc como para limitar el tamaño del reservorio [205–208]. Esto se debe en gran parte a que dichos estudios evaluaron diferentes poblaciones celulares que conforman el reservorio, por lo que el impacto del TARVc sobre las mismas puede no ser el mismo. Sumado a esta discrepancia, la dinámica del reservorio del HIV-1 ha sido escasamente estudiada en pediatría [151] en comparación con adultos. Los principales estudios en pediatría se enfocaron principalmente en el efecto inmediato del TARVc (primeras 24 semanas de vida) sobre el tamaño del reservorio [83]. No obstante, aún no se ha determinado claramente el efecto del TARVc efectivo y duradero sobre el tamaño del reservorio circulante en niños y, al mismo tiempo, cómo este se ve afectado por la edad de inicio de la SV. Es por ello, que en este trabajo nos propusimos determinar la dinámica del tamaño del reservorio circulante, estimada mediante modelos lineales mixtos usando la medición longitudinal de ADN-HIV total, a lo largo de 4 años de SV en pacientes HIV-positivos por TV y que alcanzaron dicha supresión de forma temprana ( $\leq 1,5$  años de edad), tardía ( $> 1,5 - 5$  años de edad) y muy tardía ( $> 5$  años de edad). Es relevante mencionar que, debido a los criterios de inclusión, entre los cuales la disponibilidad de muestras al momento de la SV fue uno de los principales determinantes, se seleccionaron de forma retrospectiva pacientes que nacieron mayoritariamente en el año 2000. En aquel entonces, el inicio de TARVc solo era recomendado en poblaciones adultas y pediátricas HIV-positivas que presentaban síntomas asociados a SIDA o una inmunosupresión severa [121], en tanto que hoy se recomienda iniciar el TARVc tan pronto se confirma la infección por HIV-1 [133,134]. Por ello, la mayor parte de nuestra cohorte presentó un inicio de TARVc tardío. Si bien actualmente los pacientes que inician TARVc tardíamente no son candidatos para estudios de cura y por ende no resulta atractivo con ese fin estudiar los reservorios, estos pueden aportar información

fundamental para comprender la dinámica del reservorio a largo plazo en infecciones bien establecidas. Además, es importante mencionar que el inicio tardío de TARVc continua siendo uno de los principales desafíos en una gran parte de los países subdesarrollados o en vías de desarrollo [17].

De acuerdo a nuestros resultados, el nivel de ADN-HIV total presenta un decaimiento bifásico durante la SV. En la primera etapa, durante los primeros 2 años de SV, el decaimiento es marcadamente significativo, mientras que luego de ese periodo el nivel de ADN-HIV total alcanza un *plateau* y permanece constante. Un comportamiento bifásico similar ha sido reportado por Besson *et al.* [209] en adultos, pero con la diferencia de que la primera etapa de declive significativo luego del inicio del TARVc fue de 4 años y no de 2 como encontramos en nuestro trabajo. Sin embargo, en otro estudio en adultos se observó una dinámica de decaimiento en tres fases, donde la mayor caída se observó durante los primeros 8 meses de TARVc [205]. Una de las principales diferencias de nuestro trabajo respecto a lo observado en adultos fue que el nivel de ADN-HIV total alcanzado a los 4 años de SV fue considerablemente bajo (media de  $1,89 \log_{10}$  copias/ $10^6$  CMT), siendo necesario en adultos aproximadamente 10 años de SV para llegar a dicho nivel [209]. Asimismo, este nivel alcanzado fue independiente de la edad a la cual los niños y niñas alcanzaron la SV. Sin embargo, encontramos que el grupo que alcanzó la SV más temprano ( $\leq 1,5$  años) tendió a un mayor descenso de nivel de ADN-HIV total durante los primeros 2 años de SV respecto a los grupos que alcanzaron dicha supresión más tarde ( $>1,5 - 5$  años y  $>5$  años; media de velocidad de decaimiento estimada igual a  $-0,68 \log_{10}$  copias/ $10^6$  CMT por año, comparada con  $-0,33$  y  $-0,29 \log_{10}$  copias/ $10^6$  CMT por año, respectivamente). Esta diferencia no fue significativa, posiblemente debido al bajo número de muestras en los dos grupos que alcanzaron la SV más temprano respecto al grupo que alcanzo la SV más tarde (8 pacientes en los primeros dos grupos vs. 20 en el último grupo). Resultados similares, fueron reportados por Uprety *et al.* [210] en simultáneo a los nuestros [211]. En dicho trabajo no solo se observó una dinámica bifásica en el nivel de ADN-HIV total en niñas y niños HIV-positivos por TV, sino también que cuanto más temprano se alcanza la SV ( $<1$  año vs. 1-5 años) mayor es el descenso de ADN-HIV total durante los primeros 2 años de SV. En conjunto, nuestros hallazgos remarcan la importancia del inicio temprano y efectivo del TARVc en el control del tamaño del reservorio e,

hipotéticamente, en la capacidad de control virológico (remisión virológica) ante una suspensión del tratamiento.

El rápido descenso del nivel de ADN-HIV total observado al inicio del TARVc puede entenderse como el impacto inmediato de dicho tratamiento en la limitación de la replicación del virus en distintas sub-poblaciones celulares, en conjunto con la muerte de células T infectadas y activadas que son de baja vida media. De hecho, las células T transicionales y efectoras de memoria que tienen una vida media más corta son las primeras en infectarse, con respecto a las células T *naive* y centrales de memoria [212]. Este efecto inmediato del TARVc, asimismo, contribuye con la preservación del sistema inmune y retroalimenta una mejor respuesta contra la infección por HIV-1. Luego, durante la fase de equilibrio del nivel del ADN-HIV total es posible que el reservorio esté replicando de manera residual [213–215] o bien que se produzcan ciclos de expansión clonal de células latentemente infectadas [148,216]. La supervivencia de células de memoria de larga vida infectadas tempranamente podría ser otro factor importante en la estabilidad del reservorio, aunque su persistencia durante 4 años es poco probable.

En términos generales, está bien establecido que cuanto más temprano es el inicio del TARVc menor es el tamaño de reservorio [146,147,217]. No obstante, en nuestro estudio no se encontró diferencia al comparar el decaimiento de ADN-HIV total en pacientes que iniciaron el TARVc antes y después de los 6 meses de vida. Esto podría deberse a una característica propia de nuestra cohorte, en donde la mayoría de los pacientes que iniciaron TARVc tempranamente ( $\leq 6$  meses de vida) mostraron un retraso para alcanzar la SV y, por ende, dicho tiempo terminó por ser similar al de pacientes que iniciaron el tratamiento más tarde ( $>6$  meses de vida). Es probable que esto se deba principalmente a una irregular o mala adherencia al TARVc. En línea con nuestros resultados, un estudio relativamente reciente no encontró diferencia en el nivel de ADN-HIV total durante 96 semanas de TARVc entre niños que iniciaron el TARVc antes y después de los 6 meses de vida [218]. Esto refleja que el tiempo de inicio del TARVc no siempre está asociado al tiempo de inicio de la SV, por lo que este último sería un predictor más preciso del tamaño del reservorio.

Se halló una influencia moderada ( $p=0,020$ ) por parte del nivel de células T CD4<sup>+</sup> en el decaimiento del nivel de ADN-HIV total durante los primeros 2 años de SV

(media de velocidad de decaimiento en CMT ajustada al recuento de células T CD4<sup>+</sup> igual a  $-0,34 \log_{10}$  copias/ $10^6$  células T CD4<sup>+</sup>, mientras que sin ajustar es igual a  $-0,57 \log_{10}$  copias/ $10^6$  CMT). Sin embargo, los niveles de ADN-HIV total ajustados y no ajustados al recuento de células T CD4<sup>+</sup> correlacionaron significativamente ( $p < 0,001$ ), tal como lo reportado también por Avettand-Fènoël *et al.* [189].

En los últimos años, ha surgido un especial interés por determinar la procedencia del virus que emerge luego de producirse un rebote de la CVp tras suspender el TARVc, así como en dilucidar posibles marcadores que permitan predecir el tiempo de rebote de la CVp luego de suspender el tratamiento [156,219–221]. A partir de estas líneas de investigación y del hecho de que aproximadamente la mitad (55,6%) de nuestra cohorte bajo SV experimentó en una o más ocasiones un rebote transitorio de la CVp, nos surgió el interés por determinar el efecto de dichos picos de viremia sobre el tamaño del reservorio de HIV-1 en circulación. De este modo, se modelaron las curvas de decaimiento de ADN-HIV total en CMT para los pacientes con y sin rebotes de la CVp. A partir de las cuales se determinó que el rebote de la viremia plasmática, por debajo de 1000 copias/mL, no tiene impacto en ninguna de las dos etapas de decaimiento del nivel de ADN-HIV total en CMT. En otras palabras, nuestros resultados sugieren que el rebote transitorio de la viremia plasmática bajo TARVc efectivo no sería suficiente como para modificar el tamaño del reservorio circulante. Sin embargo, Ramratnam *et al.* observaron que en adultos la velocidad de decaimiento del reservorio de HIV-1, estimado mediante QVOA, durante TARVc efectivo y prolongado se ve significativamente afectado por el rebote transitorio de la CVp [222]. Por lo tanto, se requieren futuras investigaciones para evaluar si el contraste con nuestros resultados responde a diferencias entre el comportamiento del reservorio estimado mediante QVOA y ADN-HIV total, o bien a que la cinética del reservorio sería diferente entre adultos y niños.

Curiosamente, si bien encontramos que la frecuencia de círculos de 2-LTR disminuyó significativamente durante la SV, esta continuó siendo elevada luego de 2 y 4 años de SV, manteniéndose arriba del 20%. Algunos estudios demostraron que los círculos de 2-LTR son formas lábiles con una vida media muy corta y, por lo tanto, es un marcador del nivel de replicación viral residual bajo TARVc efectivo [223,224]. Por el contrario, otros estudios señalan que los círculos de 2-LTR son estables in vitro, y que podrían permanecer de forma prolongada en células infectadas, de alta vida media y

que no se encuentren en división [225,226]. Estos trabajos nos sugieren que la permanencia de niveles detectables de círculos de 2-LTR durante una SV prolongada, podría deberse a la replicación residual del virus o a la persistencia de estas formas episomales, generadas previo al inicio del TARVc, en células de larga vida.

Durante esta parte del estudio se presentaron varias limitaciones. La primera y más relevante fue la predominancia de pacientes con respuesta efectiva pero tardía al TARVc, lo cual generó que el análisis comparativo entre grupos con diferente tiempo de respuesta al TARVc no fuera balanceado y que los resultados posiblemente no tengan la suficiente potencia estadística. Segundo, la imposibilidad de contar con registros de adherencia al TARVc para nuestra cohorte pudo haber subestimado el impacto del tiempo de inicio de TARVc en la dinámica de los reservorios. Por último, el hecho de no contar con muestras para la medición del tamaño del reservorio mediante QVOA no permitió contrastar el nivel de sobrestimación del tamaño del reservorio que es sabido que presenta el ensayo de ADN-HIV total [193].

### **5.3. Estudio del mecanismo de mantenimiento del reservorio circulante: expansión clonal vs. replicación viral residual**

En la actualidad, no se ha determinado ningún marcador que permita predecir con precisión el éxito de una remisión virológica luego de suspender el TARVc efectivo. Una mejor comprensión de los mecanismos de persistencia del reservorio es necesaria para determinar los factores implicados en el éxito o la falla de la remisión virológica posterior a la suspensión del TARVc efectivo. Tanto es así, que actualmente se encuentra en discusión la existencia o no de replicación viral continua bajo TARVc efectivo y, en consecuencia, si esta constituye un mecanismo de persistencia del reservorio. Con el objetivo de investigar dicha controversia, estudiamos la dinámica del tamaño y la genética del reservorio circulante, durante al menos 6 años de TARVc en los pacientes que alcanzaron la SV más tempranamente en nuestra cohorte (<1 año de vida).

Nuestros resultados mostraron una persistencia sostenida del nivel de ADN-HIV total en 3 de 5 pacientes a lo largo de 6 a 15 años de SV. Sorprendentemente, en estos 3 pacientes el nivel de ADN-HIV total encontrado al final del estudio fue considerablemente elevado, tal que fue similar al nivel presente al momento de la SV

(>3 log<sub>10</sub> copias/10<sup>6</sup> CMT). Mientras que los otros 2 pacientes, a pesar de haber tenido similar profilaxis, esquema y edad de inicio de TARVc al de los 3 anteriores, presentaron niveles de ADN-HIV total por debajo del LIC del ensayo en algún momento de la SV.

En contraste al comportamiento dispar entre pacientes observado para ADN-HIV total, el nivel de círculos de 2-LTR fue indetectable más allá del inicio de la SV en la totalidad de los mismos. En los 5 pacientes estudiados, la discusión acerca de la estabilidad de las formas episomales del HIV-1 en células infectadas previo al TARVc efectivo queda prácticamente descartada, dada la cantidad de años bajo SV (>6 años) de los mismos. Por ello, la ausencia de círculos de 2-LTR en al menos 3 ocasiones durante el TARVc efectivo estaría evidenciando que los eventos de transcripción inversa son muy escasos a nulos y, por ende, que es poco probable la generación de nuevos ciclos de infección durante la SV. Igualmente, para confirmar nuestros resultados resulta necesario el estudio de un mayor número de muestras y con mayor proximidad de tiempo entre las mismas, ya que esto permitirá incrementar las chances de detección de los productos tempranos del proceso de transcripción inversa. Además, sería interesante incluir en dicho estudio a pacientes bajo tratamiento con IN, ya que se ha reportado que el nivel de círculos de 2-LTR podría ser más elevado en dichos pacientes [225].

En 3 de 4 pacientes estudiados se detectó, inesperadamente, un alto nivel de ARN-HIV no procesado (>3 log<sub>10</sub> copias/μg de ARN) en la última visita (6 a 15 años de SV). Este resultado constituye uno de los primeros en reportar una considerable actividad transcripcional del HIV-1 luego de más de 6 años de SV y a pesar de un control virológico temprano (<1 año), en adolescentes infectados por TV. Uprety *et al.* [218] reportaron niveles muy bajos (alrededor de 1 log<sub>10</sub> copias/μg de ARN) a no detectables de ARN-HIV no procesado luego de 2 años TARVc efectivo y temprano (mediana de 2 meses) en niñas y niños. De forma similar, Li *et al.* encontraron niveles muy bajos de ARN-HIV no procesado (mediana inferior a 200 copias/10<sup>6</sup> células T CD4<sup>+</sup>) luego de 52 semanas de TARVc efectivo en adultos con inicio de TARVc, tanto durante la etapa aguda como crónica de la infección [156].

La medición de los niveles de ARN-HIV procesado y no procesado es muy variable, debido a que el proceso se encuentra altamente influenciado por el método de extracción de ARN intracelular, la integridad de la muestra y las altas chances de que el

ARN extraído presente trazas de ADN genómico [227]. Es importante remarcar que en nuestro trabajo se corroboraron la concentración e integridad del ARN extraído mediante espectrofotometría de micro gota y geles de agarosa, respectivamente, y que ambas fueron adecuadas en todas las muestras estudiadas. Asimismo, se cuantificó cada muestra de ARN por quintuplicado en ausencia de RT como control de amplificación no deseada de ADN. En ninguna replica de todas las muestras estudiadas hubo amplificación, lo cual descarta la presencia de trazas significativas de ADN y su influencia en el nivel de ARN-HIV no procesado que se obtuvo en los pacientes.

De acuerdo a varios reportes, el nivel de ARN-HIV no procesado previo a la suspensión del TARVc efectivo es uno de los pocos marcadores que ha mostrado un comportamiento diferencial entre pacientes que experimentan un rebote temprano y tardío de la CVp luego de interrumpir dicho tratamiento [219,228]. En base a esto y al elevado nivel de ARN-HIV no procesado encontrado en nuestra cohorte, sería poco probable el éxito de la remisión virológica tras suspender el TARVc, en pos de disminuir los efectos adversos asociados al mantenimiento de dicho tratamiento a largo plazo.

Es importante mencionar que durante nuestro estudio se halló un paciente que perdió la respuesta humoral específica contra el HIV-1 -seroreversión- (paciente 3 de la cohorte III, ver materiales y métodos, y resultados). La pérdida de anticuerpos específicos contra HIV-1, como la experimentada por este paciente, ha sido reportada en un muy bajo número de individuos y ha sido asociada principalmente al inicio de TARVc efectivo temprano [229] y a algunos determinantes genéticos [230], aunque los mecanismos detrás los mismos se desconocen. En el paciente con seroreversión se observó un declive muy significativo del nivel de ADN-HIV total al momento de la SV (desde 4,47 log<sub>10</sub> copias/10<sup>6</sup> CMT previo al TARVc hasta <LIC al comienzo de la SV), y mantuvo niveles cercanos o inferiores al LIC durante 15 años de SV. Resulta importante destacar, que pese a que el nivel de ADN-HIV total se mantuvo bajo desde el inicio de la SV, fue posible amplificarlo y detectarlo en todas las muestras al momento de construir las librerías de NGS, para el estudio de las variantes genéticas del virus. Aún así se haya detectado al virus por medio de esta metodología de elevada sensibilidad, pero considerablemente compleja, este paciente, junto a otros en donde la CVp y el resultado de los test serológicos son negativos, podrían no ser identificados como HIV-positivos durante el proceso de donación de sangre u órganos. No obstante,

esto solo podría ocurrir si la persona no revelase que vive con el HIV-1 durante la entrevista previa a la donación, o en el caso de un donante cadavérico HIV-1 positivo del cual se desconozca dicho antecedente [231]. Esta situación manifiesta la importancia que tiene el uso de técnicas de *screening* altamente sensibles en donantes de sangre u órganos. Al respecto pudimos observar que en el paciente con seroreversión de nuestro estudio, el único marcador de HIV-1 que presentó un nivel elevado fue el ARN-HIV no procesado. A esto se suma que el resto de los pacientes con SV prolongada, también presentaron niveles detectables de ARN-HIV no procesado, y que además este marcador tiene la singularidad de predecir el comportamiento del virus libre en plasma de pacientes con SV [156,227]. Todo esto sugiere que la medición del ARN-HIV no procesado podría ser de gran utilidad para el monitoreo de la infección en pacientes avirémicos.

Con el objetivo de determinar si el HIV-1 replica durante el TARVc efectivo, se estudió mediante NGS la composición genética del reservorio de ADN en circulación, desde el inicio del TARVc hasta los 6 -15 años de SV. Nuestros resultados mostraron la ausencia de acumulación de cambios nucleotídicos durante el TARVc efectivo y sostenido en la totalidad de los pacientes estudiados, lo que resalta la estabilidad genética del reservorio. En consecuencia, este hallazgo apoya la hipótesis que sostiene que el HIV-1 no replica de forma residual durante el TARVc efectivo. Resultados similares fueron reportados en adolescentes por Van Zyl *et al.* [169], y en adultos por Brodin *et al.* [232], Josefsson *et al.* [233] y von Stockenstrom *et al.* [166]. Asimismo, se halló en todos los pacientes a lo largo de 6 a 15 años de SV que la mayor parte de la abundancia de haplotipos (mediana igual a 70%) se encontraba previo al inicio del TARVc. La persistencia de estos haplotipos podría estar representando muy posiblemente a la progenie de clones de células infectadas previo al inicio de TARVc. Imamichi *et al.* mediante el mapeo de los sitios de integración del HIV-1, hallaron que un clon de célula T CD4<sup>+</sup> de memoria infectada con una variante defectiva, como su progenie, puede persistir por más de 17 años [234]. Por lo tanto, nuestros resultados sugieren fuertemente que la expansión clonal de células infectadas previo al inicio del TARVc es el principal mecanismo de mantenimiento del reservorio.

Para determinar si hay replicación viral en curso durante el TARVc efectivo, es importante evitar el submuestreo y, por lo tanto, estudiar las poblaciones provirales en diferentes muestras a lo largo de varios años de SV y compararlas con aquellas

presentes antes del inicio del TARVc (o bien luego de un periodo muy cercano al mismo). En el presente trabajo, con el objetivo de incrementar el soporte de nuestros resultados, se analizaron 3 a 5 muestras durante al menos 6 años de TARVc efectivo y una al momento del inicio de dicho tratamiento, de forma similar al destacado trabajo de Brodin *et al.* [232]. En contraste con esto, en el resonante trabajo publicado por Lorenzo-Redondo *et al.* [163] se estudiaron las variantes provirales de tres pacientes durante tan solo los primeros 6 meses de TARVc efectivo (dos muestras), y se concluyó que hubo evolución viral bajo TARVc efectivo. A nuestro entender, esta señal de evolución puede tratarse, muy probablemente, de un artefacto generado por el evidente submuestreo. Al mismo tiempo, durante el corto periodo de TARVc que abarca el estudio se produce un rápido decaimiento del número de células infectadas [235] y, en consecuencia, un recambio de la población proviral que puede generar una falsa señal de evolución viral. Este comportamiento se asemeja al observado en el paciente 3 de nuestra cohorte, quién presentó señal de evolución durante los primeros dos años de SV (M2= 0,7 años y M3= 2,1 años, ver Figuras Figura 4.7 y Figura 4.8) y que luego de dicho periodo (>2 – 15 años de SV) dejó de mostrar dicha señal de evolución. Además, resultó interesante observar que en el periodo de SV que el paciente 3 tuvo señal de evolución viral, solamente se presentaron haplotipos únicos y agrupados en clados monofiléticos, lo cual no ocurrió en ningún otro paciente.

Debido a la complejidad y el tamaño de las poblaciones provirales durante el TARVc efectivo, la profundidad de secuenciación (definida como el número de veces que se secuencia una base dentro de un fragmento o genoma de interés) puede afectar sustancialmente el resultado de la inferencia filogenética [236]. En otras palabras, cuanto mayor es el número de secuencias obtenidas, mayor es la posibilidad de encontrar nuevas variantes virales. En este sentido, es importante destacar que la profundidad de secuenciación en nuestro trabajo fue considerablemente mayor (media de lecturas obtenida igual a 145.698) respecto a los trabajos mencionados con anterioridad (media de lecturas varió entre 20 y 35.000, dependiendo el trabajo) [163,169,232]. Otro aspecto relevante de nuestro trabajo es que para el análisis de RTT elegimos enraizar con la secuencia consenso B, que fue obtenida a partir de la base de datos de *Los Alamos National Laboratory*. Esta elección se basó en el trabajo reportado por Kearney *et al.* [237] donde se demostró que la ocurrencia de evolución depende, claramente, de la elección del método de enraizamiento para el análisis.

Este trabajo es hasta el presente uno de los pocos, sino el único, en evaluar en profundidad la dinámica de cada uno de los haplotipos encontrados desde el inicio del TARVc hasta 6 a 15 años de SV. En los 5 pacientes estudiados la dinámica de los haplotipos fue compleja, observándose la emergencia de nuevos haplotipos y la desaparición de algunos pre-existentes en periodos de tiempos muy variables. Este hecho fue particularmente notorio en los pacientes 3 y 5, quienes experimentaron fluctuaciones muy pronunciadas en la frecuencia de sus distintos haplotipos a lo largo del estudio. En el paciente 3, por ejemplo, se observó que el haplotipo minoritario previo al inicio del TARVc terminó siendo el más abundante al final del estudio (>15 años de SV). En cuanto al paciente 5, los haplotipos mayoritarios fluctuaron constantemente durante la SV, disminuyendo y aumentando considerablemente sus frecuencias entre muestras consecutivas. Estas fluctuaciones pueden ser el reflejo de la dinámica global de las células T CD4<sup>+</sup>, que se caracteriza por fases de expansión y contracción mediadas por la exposición a antígenos [238]. En cambio, en los pacientes 1, 2, y 4 los haplotipos mayoritarios presentaron una mayor estabilidad, de tal modo que a lo largo de todo el estudio tuvieron un mismo haplotipo mayoritario. Por otra parte, en todos los pacientes se halló un considerable número de haplotipos únicos durante la SV, pero que representaban una abundancia minoritaria; y en menor medida se observó la emergencia de nuevos haplotipos repetidos que no se encontraban previo al inicio de TARVc. Si bien esto podría estar reflejando el surgimiento de nuevas variantes virales, como consecuencia de una posible replicación continua del virus bajo TARVc efectivo, esto es poco probable. Esto se debe a que tal como se mencionó anteriormente, los haplotipos únicos presentaron una baja abundancia en todas las muestras (mediana igual a 1,25%) y, por lo tanto, pudieron haber estado presentes en otras muestras durante el estudio, pero en niveles inferiores a la sensibilidad del método. O bien, debido a que parte de estos haplotipos únicos presentaron frecuencias muy próximas a la tasa de error del proceso podrían tratarse de artefactos del mismo.

Nuestro trabajo, al igual que los estudios de Brodin *et al.* [232], Lorenzo-Redondo *et al.* [163] y Van Zyl *et al.* [169], presenta la limitación de estudiar solamente el comportamiento de una pequeña región del HIV-1. Por ende, el comportamiento de la región estudiada puede ser diferente al de otras regiones del genoma de HIV-1 para una misma variante, o haplotipo en el caso de nuestro trabajo. Sin embargo, es importante aclarar, por un lado, que durante el TARVc efectivo el ADN proviral alcanza su menor

nivel, por lo cual resulta muy difícil lograr una buena cobertura y profundidad de amplificación en distintas partes del genoma del HIV-1 y menos aún a lo largo de todo el mismo. Por otro lado, en el presente trabajo se analizó una región dentro del gen *gag* que presenta suficiente diversidad genética como para evaluar si existe señal de evolución durante el TARVc efectivo [190]. Otra limitación de nuestro trabajo, compartida también por la gran mayoría de los reportes mencionados con anterioridad [163,166,169,232,233], fue que se estudiaron las variantes provirales a partir de CMT. Estas variantes no necesariamente representan al reservorio del HIV-1, como si es el caso de las variantes presentes en los viriones liberados al sobrenadante de cultivo de células TCD4+ en reposo (mediante QVOA). Además, ya que para la obtención de estas últimas variantes se cultivan las células por dilución límite, se disminuyen significativamente los eventos de re-amplificación y los errores en la reconstrucción de variantes o haplotipos [239]. No obstante, esta estrategia es altamente laboriosa, poco reproducible y muy costosa, tanto es así, que en nuestro conocimiento ha sido escasamente reportada [168].

En conclusión, tras evaluar durante 6 a 15 años de SV diferentes marcadores moleculares del reservorio del HIV-1 asociados a la generación de nuevas rondas de infección, como las relaciones filogenéticas y la dinámica de los haplotipos, no se hallaron evidencias de replicación viral bajo TARVc efectivo en ninguno de los pacientes estudiados. Si bien, debido a las limitaciones de nuestros estudios, no podemos excluir la posibilidad que el HIV-1 replique en un pequeño grupo de células y/o compartimentos, nuestros resultados sugieren que la expansión clonal sería el principal mecanismo, sino el único, involucrado en el mantenimiento del reservorio.

## **6. CONCLUSIÓN GENERAL**

## **E IMPLICANCIAS**

En su conjunto, los resultados reportados en el presente trabajo de tesis abordan diferentes aspectos sobre el establecimiento y mantenimiento del reservorio circulante en niños, niñas y adolescentes que contrajeron la infección por el HIV-1 mediante TV y con diferente tiempo de inicio y respuesta al TARVc. En primer lugar, se ha desarrollado e implementado una batería de ensayos moleculares para el monitoreo de la persistencia del HIV-1, los cuales han sido adaptados a las cepas circulantes en nuestra región. Debido a su sensibilidad, estos ensayos pueden ser útiles para el monitoreo de la eficacia de estrategias terapéuticas contra el HIV-1. En segundo lugar, no se halló diferencia en el tamaño del reservorio, estimado por el nivel de ADN-HIV total, entre pacientes con inicio del TARVc antes y después de los 6 meses de vida. En contraste, se halló que cuanto antes se alcanza la SV mayor es el decaimiento del reservorio circulante durante los primeros 2 años de SV. El valor de ADN-HIV total al final de dicho periodo fue 6 veces inferior en pacientes que alcanzaron la SV durante el primer año y medio de vía, respecto a los que la alcanzaron superado dicho tiempo (media igual a 1,48 log<sub>10</sub> copias/106 CMT, respecto a 1,95 log<sub>10</sub> copias/106 CMT). Esto pone en evidencia que el tiempo de inicio de la SV es un mejor predictor del nivel de persistencia del reservorio a largo plazo, respecto al tiempo de inicio del TARVc. Por último, no se hallaron evidencias de replicación viral continua bajo TARVc efectivo. Por el contrario, se determinó que la expansión clonal de células latentemente infectadas previo al inicio del TARVc es el principal mecanismo que permite la persistencia indefinida del reservorio del HIV-1. En consecuencia, estos resultados permiten orientar los esfuerzos hacia el desarrollo de estrategias terapéuticas para exponer y eliminar el reservorio latente, o bien limitar su activación.

Finalmente, el presente trabajo de tesis aporta una mayor comprensión de los mecanismos y la dinámica de persistencia del reservorio en la infección perinatal por HIV-1, que resultan relevantes para avanzar en la búsqueda de los factores determinantes del éxito de la remisión virológica en ausencia de TARVc y la investigación de enfoques tendientes hacia la cura del HIV-1.

## **7. REFERENCIAS**

1. MS Gottlieb, HM Schanker, PT Fan, A Saxon, JD Weisman, I Pozalski. Pneumocystis pneumonia—Los Angeles. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 1981.30(21):250–2.
2. Centers for Disease Control (CDC). Kaposi's sarcoma and Pneumocystis pneumonia among homosexual men--New York City and California. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 1981.30(25):305–308.
3. A Timeline of HIV/AIDS [Internet]. U.S. Dep. Heal. Hum. Serv. 2019. Disponible en: <https://www.hiv.gov/>
4. Barré-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science.* 1983.220(4599):868–871.
5. Sarngadharan MG, DeVico AL, Bruch L, Schüpbach J, Gallo RC. HTLV-III: the etiologic agent of AIDS. *Princess Takamatsu Symp.* 1984.15:301–308.
6. Gallo RC, Salahuddin SZ, Popovic M, et al. Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science.* 1984.224(4648):500–503.
7. Estévez ME, Bruno S, Sen L, Scaglione C, Diez RA MA. Síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) con sarcoma de Kaposi en varones homosexuales de Argentina. *Med (Buenos Aires).* 1983.43:477.
8. Scaglione C, Cahn P, Muchinik G, Perez H, Cordero A, Prados A, Besuschio S, Bracco MM EM. Síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). Experiencia en Argentina. *Med (Buenos Aires).* 1985.45:312.
9. Muchinik GR, Anselmo AA, Picchio GR, Livellara B, Martín M, Bouzas MB, Pérez Bianco R TPM. Prevalence of HIV antibodies in hemophiliacs in Buenos Aires. *Med (Buenos Aires).* 1987.47(4):367–70.
10. Zhu T, Korber BT, Nahmias AJ, Hooper E, Sharp PM, Ho DD. An African HIV-1 sequence from 1959 and implications for the of the epidemic. *Nature.* 1998.391(6667):594–597.
11. Gao F, Balles E, Robertson DL, et al. Origin of HIV-1 in the chimpanzee Pan troglodytes troglodytes. *Nature.* 1999.397(6718):436–441.
12. Weiss Robin A. WRW. From Pan to pandemic. *Nature.* 1999.397:385–386.
13. Huet T, Cheynier R, Meyerhans A, Roelants G, Wain-Hobson S. Genetic organization of a chimpanzee lentivirus related to HIV-1. *Nature.* 1990.345(6273):356–359.
14. Hirsch VM, Olmsted RA, Murphey-Corb M, Purcell RH, Johnson PR. An African primate lentivirus (SIVsmclosely related to HIV-2. *Nature.* 1989.339(6223):389–392.
15. Sharp PM, Hahn BH. Origins of HIV and the AIDS pandemic. *Cold Spring Harb*

- Perspect Med. 2011.1(1):a006841.
16. Foley B, Leitner T, Apetrei C, et al. HIV Sequence Compendium 2018 [Internet]. 2018. Disponible en: <https://www.hiv.lanl.gov/>
  17. Joint United Nations Programme on HIV/AIDS (UNAIDS). UNAIDS Data 2019 [Internet]. Switzerland; 2019. Disponible en: <https://www.aidsinfo.unaids.org>
  18. Programa Conjunto de las Naciones Unidas sobre el VIH/Sida (ONUSIDA). 90-90-90 Un ambicioso objetivo de tratamiento para contribuir al fin de la epidemia de sida [Internet]. Suiza; 2014. Disponible en: <http://www.unaids.org>
  19. Joint United Nations Programme on HIV/AIDS (UNAIDS). UNAIDS - Knowledge is Power [Internet]. 2018. Disponible en: <http://www.unaids.org/>
  20. Dirección de SIDA, ETS, Hepatitis y TBC, Secretaría de Gobierno de Salud. Boletín sobre el VIH, SIDA e ITS en la Argentina N35 [Internet]. 2018. Disponible en: <http://www.msal.gob.ar>
  21. Joint United Nations Programme on HIV/AIDS (UNAIDS). UNAIDS data 2018 [Internet]. 2018. Disponible en: <http://www.unaids.org/>
  22. Luciw PA. Human Immunodeficiency Viruses and their replication. *Fields Virol.* 3rd ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers; 1996. p. 1881–952.
  23. Krebs F. C., Hogan T. H., Quiterio S., Gartner S. WB. Lentiviral LTR-directed expression, sequence variation, and disease pathogenesis. *Los Alamos Natl Lab.* 2002.:29–70.
  24. Göttlinger HG. The HIV-1 assembly machine. *AIDS.* 2001.15(SUPPL. 5):S13-20.
  25. Kwong PD, Wyatt R, Majeed S, et al. Structures of HIV-1 gp120 envelope glycoproteins from laboratory-adapted and primary isolates. *Structure.* 2000.8(12):1329–1339.
  26. Cervera L, Gòdia F, Tarrés-Freixas F, et al. Production of HIV-1-based virus-like particles for vaccination: achievements and limits. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2019.103(18):7367–7384.
  27. Ruiz A, Guatelli JC, Stephens EB. The Vpu Protein: New Concepts in Virus Release and CD4 Down-Modulation. *Curr HIV Res.* 2010.8(3):240–252.
  28. Kueck T, Neil SJD. A cytoplasmic tail determinant in HIV-1 vpu mediates targeting of tetherin for endosomal degradation and counteracts interferon-induced restriction. *PLoS Pathog.* 2012.8(3):e1002609.
  29. Geyer M, Fackler OT, Peterlin BM. Structure–function relationships in HIV-1 Nef. *EMBO Rep.* 2001.2(7):580.
  30. Kirchhoff F. HIV Life Cycle: Overview. *Encycl AIDS.* 1st ed. New York: Springer; 2013. p. 1–9.

31. Nappi F, Schneider R, Zolotukhin A, et al. Identification of a Novel Posttranscriptional Regulatory Element by Using a rev- and RRE-Mutated Human Immunodeficiency Virus Type 1 DNA Proviral Clone as a Molecular Trap. *J Virol*. 2001.75(10):4558–4569.
32. Ganser-Pornillos BK, Yeager M, Sundquist WI. The structural biology of HIV assembly. *Curr. Opin. Struct. Biol*. 2008. p. 203–217.
33. Division of HIV/AIDS Prevention, Centers for Disease Control and Prevention. HIV Transmission | HIV Basics [Internet]. 2019. Disponible en: <https://www.cdc.gov/>
34. Gaur AH, Dominguez KL, Kalish ML, et al. Practice of feeding pre-masticated food to infants: A potential risk factor for HIV transmission. *Pediatrics*. 2009.124(2):658–666.
35. Quinn TC, Wawer MJ, Sewankambo N, et al. Viral load and heterosexual transmission of human immunodeficiency virus type 1. Rakai Project Study Group. *N Engl J Med*. 2000.342(13):921–9.
36. Fideli ÜS, Allen SA, Musonda R, et al. Virologic and immunologic determinants of heterosexual transmission of human immunodeficiency virus type 1 in Africa. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2001.17(10):901–910.
37. Cohen MS, Chen YQ, McCauley M, et al. Prevention of HIV-1 Infection with Early Antiretroviral Therapy. *N Engl J Med*. 2011.365(6):493–505.
38. Rodger AJ, Cambiano V, Bruun T, et al. Sexual activity without condoms and risk of HIV transmission in serodifferent couples when the HIV-positive partner is using suppressive antiretroviral therapy. *JAMA*. 2016.316(2):171–181.
39. Andrew E. Grulich, Benjamin R. Bavinton, Fengyi Jin, Garrett Prestage, Iryna B. Zablotska, Beatriz Grinsztejn, Nittaya Phanuphak, Richard Moore KKK. HIV Transmission in Male Serodiscordant Couples in Australia, Thailand and Brazil. CROI Conf. 2015.
40. Galvin SR, Cohen MS. The role of sexually transmitted diseases in HIV transmission. *Nat. Rev. Microbiol*. 2004. p. 33–42.
41. Gray RH, Li X, Kigozi G, et al. Increased risk of incident HIV during pregnancy in Rakai, Uganda: A prospective study. *Lancet*. 2005.366(9492):1182–1188.
42. Auvert B, Taljaard D, Lagarde E, Sobngwi-Tambekou J, Sitta R, Puren A. Randomized, controlled intervention trial of male circumcision for reduction of HIV infection risk: The ANRS 1265 trial. *PLoS Med*. 2005.2(11):1112–1122.
43. Gray RH, Kigozi G, Serwadda D, et al. Male circumcision for HIV prevention in men in Rakai, Uganda: a randomised trial. *Lancet*. 2007.369(9562):657–666.
44. Dabis F, Fransen L, Halsey N, et al. Rates of mother-to-child transmission of HIV-1 in Africa, America, and Europe: Results from 13 perinatal studies. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirology*. 1995.8(5):506–510.

45. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Zidovudine for the prevention of HIV transmission from mother to infant. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 1994.43(16):285–7.
46. Lee TH, Chafets DM, Biggar RJ, McCune JM, Busch MP. The role of transplacental microtransfusions of maternal lymphocytes in in utero HIV transmission. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2010.55(2):143–147.
47. Khan OA. The role of transplacental microtransfusions of maternal lymphocytes in HIV transmission to newborns. *AIDS.* 2008. p. 2347–2348.
48. Shalekoff S, Gray GE, Tiemessen CT. Age-Related Changes in Expression of CXCR4 and CCR5 on Peripheral Blood Leukocytes from Uninfected Infants Born to Human Immunodeficiency Virus Type 1-Infected Mothers. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2004.11(1):229–234.
49. Mold JE, Michaëlsson J, Burt TD, et al. Maternal alloantigens promote the development of tolerogenic fetal regulatory T cells in utero. *Science.* 2008.322(5907):1562–1565.
50. Parazzini F, Ricci E, Cintio E Di, Chiaffarino F, Chatenoud L, Pardi G. Elective caesarean-section versus vaginal delivery in prevention of vertical HIV-1 transmission: A randomised clinical trial. *Lancet.* Lancet Publishing Group; 1999.353(9158):1035–1039.
51. Bunders MJ, Loos CM Van Der, Klarenbeek PL, et al. Memory CD4+CCR5+ T cells are abundantly present in the gut of newborn infants to facilitate mother-to-child transmission of HIV-1. *Blood.* 2012.120(22):4383–4390.
52. Moussa S, Jenabian MA, Gody JC, et al. Adaptive HIV-Specific B Cell-Derived Humoral Immune Defenses of the Intestinal Mucosa in Children Exposed to HIV via Breast-Feeding. *PLoS One.* 2013.8(5).
53. Lewis P, Nduati R, Kreiss JK, et al. Cell-Free Human Immunodeficiency Virus Type 1 in Breast Milk. *J Infect Dis.* 1998.177(1):34–39.
54. Neveu D, Viljoen J, Bland RM, et al. Cumulative Exposure to Cell-Free HIV in Breast Milk, Rather Than Feeding Pattern per se, Identifies Postnatally Infected Infants. *Clin Infect Dis.* 2011.52(6):819–825.
55. Wahl A, Baker C, Spagnuolo RA, et al. Breast Milk of HIV-Positive Mothers Has Potent and Species-Specific *In Vivo* HIV-Inhibitory Activity. Silvestri G, editor. *J Virol.* 2015.89(21):10868–10878.
56. World Health Organization. Infant and young child feeding : model chapter for textbooks for medical students and allied health professionals [Internet]. 2009. Disponible en: <https://www.who.int/>
57. Coovadia HM, Rollins NC, Bland RM, et al. Mother-to-child transmission of HIV-1 infection during exclusive breastfeeding in the first 6 months of life: an intervention cohort study. *Lancet.* 2007.369(9567):1107–1116.

58. U.S. Department of Health and Human Services. The Stages of HIV Infection [Internet]. 2019. Disponible en: <https://aidsinfo.nih.gov/>
59. Simon V, Ho DD, Abdool Karim Q. HIV/AIDS epidemiology, pathogenesis, prevention, and treatment. *Lancet*. 2006. p. 489–504.
60. Mattapallil JJ, Douek DC, Hill B, Nishimura Y, Martin M, Roederer M. Massive infection and loss of memory CD4<sup>+</sup> T cells in multiple tissues during acute SIV infection. *Nature*. 2005.434(7037):1093–1097.
61. Brenchley JM, Schacker TW, Ruff LE, et al. CD4<sup>+</sup> T cell depletion during all stages of HIV disease occurs predominantly in the gastrointestinal tract. *J Exp Med*. 2004.200(6):749–759.
62. Epstein FH, Pantaleo G, Graziosi C, Fauci AS. The Immunopathogenesis of Human Immunodeficiency Virus Infection. *N. Engl. J. Med*. 1993. p. 327–335.
63. Koup RA, Safrit JT, Cao Y, et al. Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome. *J Virol*. 1994.68(7):4650–4655.
64. Richman DD, Wrinn T, Little SJ, Petropoulos CJ. Rapid evolution of the neutralizing antibody response to HIV type 1 infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003.100(7):4144–4149.
65. Mellors JW, Kingsley LA, Rinaldo CR, et al. Quantitation of HIV-1 RNA in plasma predicts outcome after seroconversion. *Ann Intern Med*. 1995.122(8):573–579.
66. Selik RM, Mokotoff ED, Branson B, Michele Owen S, Whitmore S, Irene Hall H. Revised surveillance case definition for HIV infection - United States, 2014. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2014.63(1).
67. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Terms, Definitions, and Calculations Used in CDC HIV Surveillance Publications [Internet]. 2019. Disponible en: <https://www.cdc.gov/>
68. Tobin NH, Aldrovandi GM. Immunology of pediatric HIV infection. *Immunol Rev*. 2013.254(1):143–169.
69. Time from HIV-1 seroconversion to AIDS and death before widespread use of highly-active antiretroviral therapy: a collaborative re-analysis. *Lancet*. 2000.355(9210):1131–1137.
70. Becquet R, Marston M, Dabis F, et al. Children who acquire hiv infection perinatally are at higher risk of early death than those acquiring infection through breastmilk: A meta-analysis. *PLoS One*. 2012.7(2).
71. Lallemand M, Jourdain G, Coeur S Le, et al. A trial of shortened zidovudine regimens to prevent mother-to-child transmission of human immunodeficiency virus type 1. *N Engl J Med*. 2000.343(14):982–991.

72. Marinda E, Humphrey JH, Iliff PJ, et al. Child mortality according to maternal and infant HIV status in Zimbabwe. *Pediatr Infect Dis J*. 2007.26(6):519–526.
73. Shearer WT, Rosenblatt HM, Gelman RS, et al. Lymphocyte subsets in healthy children from birth through 18 years of age: The Pediatric AIDS Clinical Trials Group P1009 study. *J Allergy Clin Immunol*. 2003.112(5):973–980.
74. Newell ML, Giaquinto C, Rampon O, et al. Level and pattern of HIV-1-RNA viral load over age: Differences between girls and boys? *AIDS*. 2002.16(1):97–104.
75. Mphatswe W, Blanckenberg N, Tudor-Williams G, et al. High frequency of rapid immunological progression in African infants infected in the era of perinatal HIV prophylaxis. *AIDS*. 2007.21(10):1253–1261.
76. Biggar RJ, Janes M, Pilon R, et al. Virus Levels in Untreated African Infants Infected with Human Immunodeficiency Virus Type 1. *J Infect Dis*. 1999.180(6):1838–1843.
77. Saathoff E, Pritsch M, Geldmacher C, et al. Viral and host factors associated with the HIV-1 viral load setpoint in adults from mbeya region, Tanzania. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2010.54(3):324–331.
78. Muenchhoff M, Prendergast AJ, Goulder PJR. Immunity to HIV in Early Life. *Front Immunol*. 2014.5(August):1–13.
79. Prendergast AJ, Klenerman P, Goulder PJR. The impact of differential antiviral immunity in children and adults. *Nat. Rev. Immunol*. 2012. p. 636–648.
80. Okulicz JF, Marconi VC, Landrum ML, et al. Clinical Outcomes of Elite Controllers, Viremic Controllers, and Long-Term Nonprogressors in the US Department of Defense HIV Natural History Study. *J Infect Dis*. 2009.200(11):1714–1723.
81. Kaslow RA, Carrington M, Apple R, et al. Influence of combinations of human major histocompatibility complex genes on the course of HIV-1 infection. *Nat Med*. 1996.2(4):405–411.
82. Adland E, Paioni P, Thobakgale C, et al. Discordant Impact of HLA on Viral Replicative Capacity and Disease Progression in Pediatric and Adult HIV Infection. *PLoS Pathog*. 2015.11(6).
83. Goulder PJ, Lewin SR, Leitman EM. Paediatric HIV infection: the potential for cure. *Nat Rev Immunol*. 2016. 16(4): 259–271.
84. Charles A Janeway, Jr, Paul Travers, Mark Walport and MJS. *Acquired immune deficiency syndrome*. Immunobiol 5th Ed. New York: Garland Science; 2001.
85. Ballan WM, Vu B-AN, Long BR, et al. Natural Killer Cells in Perinatally HIV-1-Infected Children Exhibit Less Degranulation Compared to HIV-1-Exposed Uninfected Children and Their Expression of KIR2DL3, NKG2C, and NKp46 Correlates with Disease Severity. *J Immunol*. 2007.179(5):3362–3370.

86. Ziegner U, Campbell D, Weinhold K, Frank I, Rutstein R, Starr SE. Deficient antibody-dependent cellular cytotoxicity against human immunodeficiency virus (HIV)-expressing target cells in perinatal HIV infection. *Clin Diagn Lab Immunol*. 1999.6(5):718–724.
87. Kollmann TR, Crabtree J, Rein-Weston A, et al. Neonatal Innate TLR-Mediated Responses Are Distinct from Those of Adults. *J Immunol*. 2009.183(11):7150–7160.
88. Belderbos ME, Bleek GM van, Levy O, et al. Skewed pattern of Toll-like receptor 4-mediated cytokine production in human neonatal blood: Low LPS-induced IL-12p70 and high IL-10 persist throughout the first month of life. *Clin Immunol*. 2009.133(2):228–237.
89. Haynes BF, Heinly CS. Early human T cell development: Analysis of the human thymus at the time of initial entry of hematopoietic stem cells into the fetal thymic microenvironment. *J Exp Med*. 1995.181(4):1445–1458.
90. Chinen J, Shearer WT. Molecular virology and immunology of HIV infection. *J Allergy Clin Immunol*. 2002.110(2):189–198.
91. O’Connell KA, Pelz RK, Dinoso JB, et al. Prolonged control of an HIV type 1 escape variant following treatment interruption in an HLA-B\*27-positive patient. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2010.26(12):1307–1311.
92. Migueles SA, Sabbaghian MS, Shupert WL, et al. HLA B\*5701 is highly associated with restriction of virus replication in a subgroup of HIV-infected long term nonprogressors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000.97(6):2709–2714.
93. Gao X, O’Brien TR, Welzel TM, et al. HLA-B alleles associate consistently with HIV heterosexual transmission, viral load, and progression to AIDS, but not susceptibility to infection. *AIDS*. 2010.24(12):1835–1840.
94. Crawford H, Lumm W, Leslie A, et al. Evolution of HLA-B 5703 hiv-1 escape mutations in HLA-B 5703-positive individuals and their transmission recipients. *J Exp Med*. 2009.206(4):909–921.
95. Moore CB, John M, James IR, Christiansen FT, Witt CS, Mallal SA. Evidence of HIV-1 adaptation to HLA-restricted immune responses at a population level. *Science*. 2002.296(5572):1439–1443.
96. Brumme ZL, Brumme CJ, Chui C, et al. Effects of Human Leukocyte Antigen Class I Genetic Parameters on Clinical Outcomes and Survival after Initiation of Highly Active Antiretroviral Therapy. *J Infect Dis*. 2007.195(11):1694–1704.
97. Keele BF, Giorgi EE, Salazar-Gonzalez JF, et al. Identification and characterization of transmitted and early founder virus envelopes in primary HIV-1 infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008.105(21):7552–7557.
98. Ndhlovu ZM, Kanya P, Mewalal N, et al. Magnitude and Kinetics of CD8+ T Cell Activation during Hyperacute HIV Infection Impact Viral Set Point. *Immunity*. 2015.43(3):591–604.

99. Goonetilleke N, Liu MKP, Salazar-Gonzalez JF, et al. The first T cell response to transmitted/founder virus contributes to the control of acute viremia in HIV-1 infection. *J Exp Med*. 2009.206(6):1253–1272.
100. Tomaras GD, Yates NL, Liu P, et al. Initial B-Cell Responses to Transmitted Human Immunodeficiency Virus Type 1: Virion-Binding Immunoglobulin M (IgM) and IgG Antibodies Followed by Plasma Anti-gp41 Antibodies with Ineffective Control of Initial Viremia. *J Virol*. 2008.82(24):12449–12463.
101. Liao HX, Chen X, Munshaw S, et al. Initial antibodies binding to HIV-1 gp41 in acutely infected subjects are polyreactive and highly mutated. *J Exp Med*. 2011.208(11):2237–2249.
102. Burton DR. Antibodies, viruses and vaccines. *Nat. Rev. Immunol*. 2002. p. 706–713.
103. Cole KS, Murphey-Corb M, Narayan O, Joag S V, Shaw GM, Montelaro RC. Common themes of antibody maturation to simian immunodeficiency virus, simian-human immunodeficiency virus, and human immunodeficiency virus type 1 infections. *J Virol*. 1998.72(10):7852–9.
104. Burton DR, Stanfield RL, Wilson IA. Antibody vs. HIV in a clash of evolutionary titans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. 2005. p. 14943–14948.
105. Sather DN, Armann J, Ching LK, et al. Factors Associated with the Development of Cross-Reactive Neutralizing Antibodies during Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection. *J Virol*. 2009.83(2):757–769.
106. Walker LM, Huber M, Doores KJ, et al. Broad neutralization coverage of HIV by multiple highly potent antibodies. *Nature*. 2011.477(7365):466–470.
107. Doria-Rose NA, Schramm CA, Gorman J, et al. Developmental pathway for potent V1V2-directed HIV-neutralizing antibodies. *Nature*. 2014.508(7498):55–62.
108. Binley JM, Lybarger EA, Crooks ET, et al. Profiling the Specificity of Neutralizing Antibodies in a Large Panel of Plasmas from Patients Chronically Infected with Human Immunodeficiency Virus Type 1 Subtypes B and C. *J Virol*. 2008.82(23):11651–11668.
109. Muenchhoff M, Adland E, Karimanzira O, et al. Nonprogressing HIV-infected children share fundamental immunological features of nonpathogenic SIV infection. *Sci Transl Med*. 2016.8(358):358ra125.
110. Goo L, Chohan V, Nduati R, Overbaugh J. Early development of broadly neutralizing antibodies in HIV-1-infected infants. *Nat Med*. 2014.20(6):655–658.
111. Simonich CA, Williams KL, Verkerke HP, et al. HIV-1 Neutralizing Antibodies with Limited Hypermutation from an Infant. *Cell*. 2016.166(1):77–87.
112. Ng CT, Jaworski JP, Jayaraman P, et al. Passive neutralizing antibody controls SHIV viremia and enhances B cell responses in infant macaques. *Nat Med*.

- 2010.16(10):1117–1119.
113. Crotty S. A brief history of T cell help to B cells. *Nat Rev Immunol.* 2015.15(3):185–189.
  114. Sage PT, Alvarez D, Godec J, Andrian UH Von, Sharpe AH. Circulating T follicular regulatory and helper cells have memory-like properties. *J Clin Invest.* 2014.124(12):5191–5204.
  115. Ding Y, Li J, Yang PA, et al. Interleukin-21 promotes germinal center reaction by skewing the follicular regulatory T cell to follicular helper T cell balance in autoimmune BXD2 mice. *Arthritis Rheumatol.* 2014.66(9):2601–2612.
  116. Roider J, Maehara T, Ngoepe A, et al. High-Frequency, Functional HIV-Specific T-Follicular Helper and Regulatory Cells Are Present Within Germinal Centers in Children but Not Adults. *Front Immunol.* 2018.9(SEP):1975.
  117. Perelson AS, Essunger P, Cao Y, et al. Decay characteristics of HIV-1-infected compartments during combination therapy. *Nature.* 1997.387(6629):188–191.
  118. Arts EJ, Hazuda DJ. HIV-1 antiretroviral drug therapy. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012.2(4):a007161..
  119. Palella FJ, Delaney KM, Moorman AC, et al. Declining Morbidity and Mortality among Patients with Advanced Human Immunodeficiency Virus Infection. *N Engl J Med.* 1998.338(13):853–860.
  120. Mills EJ, Bakanda C, Birungi J, et al. Life expectancy of persons receiving combination antiretroviral therapy in low-income countries: A cohort analysis from Uganda. *Ann Intern Med.* 2011.155(4):209–217.
  121. World Health Organization. Antiretroviral therapy of HIV infection in infants and children: towards universal access. Recommendations for a public health approach HIV/AIDS Programme [Internet]. 2010. Disponible en: <http://www.who.int>
  122. Violari A, Cotton MF, Gibb DM, et al. Early Antiretroviral Therapy and Mortality among HIV-Infected Infants. *N Engl J Med.* 2008.359(21):2233–2244.
  123. Chiappini E, Galli L, Tovo P-A, et al. Five-year follow-up of children with perinatal HIV-1 infection receiving early highly active antiretroviral therapy. *BMC Infect Dis.* 2009.9:140.
  124. Severe P, Jean Juste MA, Ambroise A, et al. Early versus Standard Antiretroviral Therapy for HIV-Infected Adults in Haiti. *N Engl J Med.* 2010.363(3):257–265.
  125. Lundgren JD, Babiker AG, Gordin F, et al. Initiation of Antiretroviral Therapy in Early Asymptomatic HIV Infection. *N Engl J Med.* 2015.373(9):795–807.
  126. World Health Organization, UNICEF, UNAIDS. GLOBAL UPDATE ON HIV TREATMENT 2013 : Results, Impact and Opportunities. *Glob. Updat. HIV Treat.* 2013 results, impact Oppor. 2013. Disponible en: <https://www.who.int/>

127. Thompson MA, Aberg JA, Hoy JF, et al. Antiretroviral treatment of adult HIV infection: 2012 Recommendations of the International Antiviral Society-USA panel. *JAMA*. 2012. p. 387–402.
128. Chadwick EG, Rodman JH, Britto P, et al. Ritonavir-based highly active antiretroviral therapy in human immunodeficiency virus type 1-infected infants younger than 24 months of age. *Pediatr Infect Dis J*. 2005.24(9):793–800.
129. Rosenberg ES, Altfeld M, Poon SH, et al. Immune control of HIV-1 after early treatment of acute infection. *Nature*. 2000.407(6803):523–526.
130. Rosenberg ES, Billingsley JM, Caliendo AM, et al. Vigorous HIV-1-specific CD4+ T cell responses associated with control of viremia. *Science*. 1997.278(5342):1447–1450.
131. Günthard HF, Saag MS, Benson CA, et al. Antiretroviral Drugs for Treatment and Prevention of HIV Infection in Adults: 2016 Recommendations of the International Antiviral Society-USA Panel. *JAMA*. 2016.316(2):191–210.
132. Guía para la atención de niños, niñas y adolescentes con VIH y con exposición perinatal. [Internet]. Dir. Sida y ETS, Minist. Salud la Nación Argentina. 2016. Disponible en: <http://www.msal.gob.ar/>.
133. Panel on Antiretroviral Therapy and Medical Management of Children Living with HIV. Guidelines for the Use of Antiretroviral Agents in Pediatric HIV Infection [Internet]. HHS Panel Antiretrovir. Ther. Med. Manag. Child. Living with HIV—A Work. Gr. Off. AIDS Res. Advis. Counc. 2020. Disponible en: <http://aidsinfo.nih.gov/>.
134. Panel on Antiretroviral Guidelines for Adults and Adolescents. Guidelines for the Use of Antiretroviral Agents in Adults and Adolescents with HIV [Internet]. Dep. Heal. Hum. Serv. 2019. Disponible en: <https://aidsinfo.nih.gov/>.
135. Wei X, Ghosh SK, Taylor ME, et al. Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Nature*. 1995.373(6510):117–122.
136. Ho DD, Neumann AU, Perelson AS, Chen W, Leonard JM, Markowitz M. Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature*. 1995.373(6510):123–126.
137. Ho DD, Rota TR, Hirsch MS. Infection of monocyte/macrophages by human T lymphocyte virus type III. *J Clin Invest*. 1986.77(5):1712–1715.
138. Deeks SG. HIV Infection, Inflammation, Immunosenescence, and Aging. *Annu Rev Med*. Annual Reviews; 2011.62(1):141–155.
139. Hunt PW. HIV and inflammation: Mechanisms and consequences. *Curr HIV/AIDS Rep*. 2012.9(2):139–147.
140. Eisele E, Siliciano RF. Redefining the Viral Reservoirs that Prevent HIV-1 Eradication. *Immunity*. 2012.37(3):377–388.

141. Siliciano RF, Greene WC. HIV latency. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2011.1(1):1–19.
142. Verdin E, Paras P, Lint C Van. Chromatin disruption in the promoter of human immunodeficiency virus type 1 during transcriptional activation. *EMBO J*. 1993.12(8):3249–3259.
143. Lint C Van, Emiliani S, Ott M, Verdin E. Transcriptional activation and chromatin remodeling of the HIV-1 promoter in response to histone acetylation. *EMBO J*. 1996.15(5):1112–1120.
144. Kauder SE, Bosque A, Lindqvist A, Planelles V, Verdin E. Epigenetic regulation of HIV-1 latency by cytosine methylation. *PLoS Pathog*. 2009.5(6):e1000495.
145. Han Y, Lin YB, An W, et al. Orientation-Dependent Regulation of Integrated HIV-1 Expression by Host Gene Transcriptional Readthrough. *Cell Host Microbe*. 2008.4(2):134–146.
146. Bruner KM, Hosmane NN, Siliciano RF. Towards an HIV-1 cure: Measuring the latent reservoir. *Trends Microbiol*. 2015.23(4):192–203.
147. Massanella M, Richman DD. Measuring the latent reservoir in vivo [Internet]. *J. Clin. Invest*. 2016. p. 464–472.
148. Deeks SG, Lewin SR, Ross AL, et al. International AIDS Society global scientific strategy: Towards an HIV cure 2016. *Nat. Med*. 2016. p. 839–850.
149. Siliciano JD, Siliciano RF. Enhanced culture assay for detection and quantitation of latently infected, resting CD4<sup>+</sup> T-cells carrying replication-competent virus in HIV-1-infected individuals. *Methods Mol Biol*. 2005.304:3–15.
150. Laird GM, Eisele EE, Rabi SA, et al. Rapid Quantification of the Latent Reservoir for HIV-1 Using a Viral Outgrowth Assay. *PLoS Pathog*. 2013.9(5).
151. Avettand-Fènoë V, Hocqueloux L, Ghosn J, et al. Total HIV-1 DNA, a marker of viral reservoir dynamics with clinical implications. *Clin Microbiol Rev*. 2016.29(4):859–880.
152. Hong T, Drlica K, Pinter A, Murphy E. Circular DNA of human immunodeficiency virus: analysis of circle junction nucleotide sequences. *J Virol*. 1991.65(1):551–5.
153. Kulkosky J, Katz RA, Skalka AM. Terminal nucleotides of the preintegrative linear form of HIV-1 DNA deduced from the sequence of circular DNA junctions. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 1990.3(9):852–8.
154. Gillim-Ross L, Cara A, Klotman ME. HIV-1 extrachromosomal 2-LTR circular DNA is long-lived in human macrophages. *Viral Immunol*. 2005.18(1):190–196.
155. Sharkey M, Babic DZ, Greenough T, Gulick R, Kuritzkes DR, Stevenson M. Episomal viral cDNAs identify a reservoir that fuels viral rebound after treatment interruption and that contributes to treatment failure. *PLoS Pathog*.

2011.7(2): e1001303.

156. Li JZ, Etemad B, Ahmed H, et al. The size of the expressed HIV reservoir predicts timing of viral rebound after treatment interruption. *AIDS*. 2016.30(3): 343–353.
157. Dornadula G, Zhang H, VanUitert B, et al. Residual HIV-1 RNA in blood plasma of patients taking suppressive highly active antiretroviral therapy. *JAMA*. 1999.282(17):1627–1632.
158. Palmer S, Wiegand AP, Maldarelli F, et al. New real-time reverse transcriptase-initiated PCR assay with single-copy sensitivity for human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma. *J Clin Microbiol*. 2003.41(10):4531–4536.
159. Palmer S, Maldarelli F, Wiegand A, et al. Low-level viremia persists for at least 7 years in patients on suppressive antiretroviral therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008.105(10):3879–3884.
160. Pierson TC, Zhou Y, Kieffer TL, Ruff CT, Buck C, Siliciano RF. Molecular Characterization of Preintegration Latency in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection. *J Virol*. 2002.76(17):8518–8531.
161. Zhou Y, Zhang H, Siliciano JD, Siliciano RF. Kinetics of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Decay following Entry into Resting CD4+ T Cells. *J Virol*. 2005.79(4):2199–2210.
162. Mansky LM, Temin HM. Lower in vivo mutation rate of human immunodeficiency virus type 1 than that predicted from the fidelity of purified reverse transcriptase. *J Virol*. 1995.69(8):5087–5094.
163. Lorenzo-Redondo R, Fryer HR, Bedford T, et al. Persistent HIV-1 replication maintains the tissue reservoir during therapy. *Nature*. 2016.530(7588):51–56.
164. Yukl SA, Shergill AK, McQuaid K, et al. Effect of raltegravir-containing intensification on HIV burden and T-cell activation in multiple gut sites of HIV-positive adults on suppressive antiretroviral therapy. *AIDS*. 2010.24(16):2451–2460.
165. Buzón MJ, Massanella M, Llibre JM, et al. HIV-1 replication and immune dynamics are affected by raltegravir intensification of HAART-suppressed subjects. *Nat Med*. 2010.16(4):460–5.
166. Stockenström S Von, Odevall L, Lee E, et al. Longitudinal Genetic Characterization Reveals That Cell Proliferation Maintains a Persistent HIV Type 1 DNA Pool During Effective HIV Therapy. *J Infect Dis*. 2015.212(4):596–607.
167. Wagner TA, McLaughlin S, Garg K, et al. Proliferation of cells with HIV integrated into cancer genes contributes to persistent infection. *Science*. 2014.345(6196):570–573.
168. Lorenzi JCC, Cohen YZ, Cohn LB, et al. Paired quantitative and qualitative assessment of the replication-competent HIV-1 reservoir and comparison with

- integrated proviral DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016.113(49):E7908–E7916.
169. Zyl GU Van, Katusiime MG, Wiegand A, et al. No evidence of HIV replication in children on antiretroviral therapy. *J Clin Invest*. 2017.127(10):3827–3834.
  170. Hütter G, Nowak D, Mossner M, et al. Long-Term Control of HIV by CCR5 Delta32/Delta32 Stem-Cell Transplantation. *N Engl J Med*. 2009.360(7):692–698.
  171. Gupta RK, Abdul-Jawad S, McCoy LE, et al. HIV-1 remission following CCR5Δ32/Δ32 haematopoietic stem-cell transplantation. *Nature*. 2019. p. 244–248.
  172. Persaud D, Gay H, Ziemniak C, et al. Absence of detectable HIV-1 viremia after treatment cessation in an infant. *N Engl J Med*. 2013.369(19):1828–35.
  173. Luzuriaga K, Gay H, Ziemniak C, et al. Viremic relapse after HIV-1 remission in a perinatally infected child. *N Engl J Med*. 2015.372(8):786–8.
  174. Olson AD, Meyer L, Prins M, et al. An Evaluation of HIV Elite Controller Definitions within a Large Seroconverter Cohort Collaboration. Okulicz JF, editor. *PLoS One*. 2014.9(1):e86719.
  175. Sáez-Ciri3n A A, Bacchus C, Hocqueloux L, et al. Post-Treatment HIV-1 Controllers with a Long-Term Virological Remission after the Interruption of Early Initiated Antiretroviral Therapy ANRS VISCONTI Study. *PLoS Pathog*. 2013.9(3): e1003211.
  176. Frange P, Faye A, Avettand-Feno3l V, et al. HIV-1 virological remission lasting more than 12 years after interruption of early antiretroviral therapy in a perinatally infected teenager enrolled in the French ANRS EPF-CO10 paediatric cohort: a case report. *Lancet HIV*. 2016.3(1):e49–e54.
  177. Chun TW, Eisinger RW, Fauci AS. Durable Control of HIV Infection in the Absence of Antiretroviral Therapy: Opportunities and Obstacles. *JAMA*. 2019. p. 27–28.
  178. Kuo L, Lawrence D, McDonald D, et al. Highlights from the Fourth Biennial Strategies for an HIV Cure Meeting, 10-12 October 2018, Bethesda, MD, USA. *J virus Erad*. 2019.5(1):50–59.
  179. Bernard M. Branson, H. Hunter Handsfield, Margaret A. Lampe, Robert S. Janssen, Allan W. Taylor, Sheryl B. Lyss JEC. Revised Recommendations for HIV Testing of Adults, Adolescents, and Pregnant Women in Health-Care Settings. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2006.(55):1–17.
  180. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*. 1988.16(3):1215.
  181. Rose PP, Korber BT. Detecting hypermutations in viral sequences with an emphasis on G→A hypermutation. *Bioinformatics*. 2000.16(4):400–401.

182. Larsson A. AliView: a fast and lightweight alignment viewer and editor for large datasets. *Bioinformatics*. 2014.30(22):3276–8.
183. Guindon S, Dufayard J-F, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W, Gascuel O. New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0. *Syst Biol*. 2010.59(3):307–321.
184. Lefort V, Longueville J-E, Gascuel O. SMS: Smart Model Selection in PhyML. *Mol Biol Evol*. 2017.34(9):2422–2424.
185. Rambaut A, Lam TT, Max Carvalho L, Pybus OG. Exploring the temporal structure of heterochronous sequences using TempEst (formerly Path-O-Gen). *Virus Evol*. 2016.2(1):vew007.
186. Team RC. R: A language and environment for statistical computing. Vienna; 2013.
187. Pasternak AO, Adema KW, Bakker M, et al. Highly sensitive methods based on seminested real-time reverse transcription-PCR for quantitation of human immunodeficiency virus type 1 unspliced and multiply spliced RNA and proviral DNA. *J Clin Microbiol*. 2008.46(7):2206–2211.
188. Burd EM. Validation of laboratory-developed molecular assays for infectious diseases. *Clin. Microbiol. Rev*. 2010. p. 550–576.
189. Avettand-Fènoël V, Boufassa F, Galimand J, Meyer L, Rouzioux C. HIV-1 DNA for the measurement of the HIV reservoir is predictive of disease progression in seroconverters whatever the mode of result expression is. *J Clin Virol*. 2008.42(4):399–404.
190. Zanini F, Brodin J, Thebo L, et al. Population genomics of inpatient HIV-1 evolution. *Elife*. 2015.4:1–26.
191. Parikh UM, McCormick K, Zyl G Van, Mellors JW. Future technologies for monitoring HIV drug resistance and cure [Internet]. *Curr. Opin. HIV AIDS*. 2017. p. 182–189.
192. Hocqueloux L, Prazuck T, Avettand-Fenoel V, et al. Long-term immunovirologic control following antiretroviral therapy interruption in patients treated at the time of primary HIV-1 infection. *AIDS*. 2010.24(10):1598–1601.
193. Eriksson S, Graf EH, Dahl V, et al. Comparative Analysis of Measures of Viral Reservoirs in HIV-1 Eradication Studies. *PLoS Pathog*. 2013.9(2):e1003174.
194. Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM, et al. Real-Time PCR in Clinical Microbiology: Applications for Routine Laboratory Testing. *Clin Microbiol Rev*. 2006.19(1):165–256.
195. Brussel A, Sonigo P. Analysis of Early Human Immunodeficiency Virus Type 1 DNA Synthesis by Use of a New Sensitive Assay for Quantifying Integrated Provirus. *J Virol*. 2003.77(18):10119–10124.

196. O'Doherty U, Swiggard WJ, Jeyakumar D, McGain D, Malim MH. A sensitive, quantitative assay for human immunodeficiency virus type 1 integration. *J Virol*. 2002.76(21):10942–50.
197. Désiré N, Dehée A, Schneider V, et al. Quantification of human immunodeficiency virus type 1 proviral load by a TaqMan real-time PCR assay. *J Clin Microbiol*. 2001.39(4):1303–1310.
198. Taylor BS, Sobieszczyk ME, McCutchan FE, Hammer SM. The challenge of HIV-1 subtype diversity. *N. Engl. J. Med*. 2008. p. 1590.
199. Kondo M, Sudo K, Tanaka R, et al. Quantitation of HIV-1 group M proviral DNA using TaqMan MGB real-time PCR. *J Virol Methods*. 2009.157(2):141–146.
200. Avettand-Fènoë V, Chaix ML, Blanche S, et al. LTR real-time PCR for HIV-1 DNA quantitation in blood cells for early diagnosis in infants born to seropositive mothers treated in HAART area (ANRS CO 01). *J Med Virol*. 2009.81(2):217–223.
201. Oliveira MF De, Gianella S, Letendre S, et al. Comparative analysis of cell-associated HIV DNA levels in cerebrospinal fluid and peripheral blood by droplet digital PCR. *PLoS One*. 2015.10(10):e0139510.
202. Tierney C, Lathey JL, Christopherson C, et al. Prognostic Value of Baseline Human Immunodeficiency Virus Type 1 DNA Measurement for Disease Progression in Patients Receiving Nucleoside Therapy. *J Infect Dis*. 2003.187(1):144–148.
203. Parisi SG, Andreis S, Mengoli C, et al. Baseline cellular HIV DNA load predicts HIV DNA decline and residual HIV plasma levels during effective antiretroviral therapy. *J Clin Microbiol*. 2012.50(2):258–263.
204. Boullé C, Rouet F, Fassinou P, et al. HIV-1 DNA concentrations and evolution among African HIV-1-infected children under antiretroviral treatment (ANRS 1244/1278). *J Antimicrob Chemother*. 2014.:17–20.
205. Laanani M, Ghosn J, Essat A, et al. Impact of the timing of initiation of antiretroviral therapy during primary HIV-1 infection on the decay of cell-associated HIV-DNA. *Clin Infect Dis*. 2015.60(11):1715–1721.
206. Bitnun A, Samson L, Chun TW, et al. Early initiation of combination antiretroviral therapy in HIV-1-infected newborns can achieve sustained virologic suppression with low frequency of CD4+ T cells carrying HIV in peripheral blood. *Clin Infect Dis*. 2014.59(7):1012–1019.
207. Persaud D, Palumbo PE, Ziemniak C, et al. Dynamics of the resting CD4(+) T-cell latent HIV reservoir in infants initiating HAART less than 6 months of age. *AIDS*. 2012.26(12):1483–90.
208. Martinez-Bonet M, Puertas MC, Fortuny C, et al. Establishment and Replenishment of the Viral Reservoir in Perinatally HIV-1-infected Children

- Initiating Very Early Antiretroviral Therapy. *Clin Infect Dis.* 2015.61(7):1169–1178.
209. Besson GJ, Lalama CM, Bosch RJ, et al. HIV-1 DNA Decay Dynamics in Blood During More Than a Decade of Suppressive Antiretroviral Therapy. *Clin Infect Dis.* 2014.59(9):1312–1321.
210. Priyanka Uprety; Kunjal Patel; Brad Karalius; Kaitlin Rainwater-Lovett; Carrie Ziemniak; Ya Chen; Suzanne Siminski; Russell B. Van Dyke; George R. Seage; Deborah Persaud. HIV-1 DNA Dynamics Over a Decade or More of Viral Suppression in Perinatal Infection. *Conf Retroviruses Opportunistic Infect.* Boston MA, USA; 2016.
211. Matias Moragas; Debora Mecikovsky; Solange Arazi Caillaud; Paula Aulicino; Rosa Bologna; Luisa Sen; Andrea Mangano. Kinetics of Cell-Associated HIV DNA During Viral Suppression in HIV-Infected Children. *Conf Retroviruses Opportunistic Infect.* Boston MA, USA; 2016.
212. Strain MC, Little SJ, Daar ES, et al. Effect of treatment, during primary infection, on establishment and clearance of cellular reservoirs of HIV-1. *J Infect Dis.* 2005.191(9):1410–8.
213. Gandhi RT, Coombs RW, Chan ES, et al. No effect of raltegravir intensification on viral replication markers in the blood of HIV-1-infected patients receiving antiretroviral therapy. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2012.59(3):229–35.
214. Hatano H. Immune activation and HIV persistence: Considerations for novel therapeutic interventions [Internet]. *Curr. Opin. HIV AIDS.* 2013. p. 211–216.
215. Dinoso JB, Kim SY, Wiegand AM, et al. Treatment intensification does not reduce residual HIV-1 viremia in patients on highly active antiretroviral therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009.106(23):9403–9408.
216. Noel N, Peña R, David A, et al. Long-Term Spontaneous Control of HIV-1 Is Related to Low Frequency of Infected Cells and Inefficient Viral Reactivation. *J Virol.* 2016.90(13):6148–58.
217. Siliciano JM, Siliciano RF. The remarkable stability of the latent reservoir for HIV-1 in resting memory CD4+ T cells. *J Infect Dis.* 2015.212(9):1345–1347.
218. Uprety P, Chadwick EG, Rainwater-Lovett K, et al. Cell-Associated HIV-1 DNA and RNA Decay Dynamics during Early Combination Antiretroviral Therapy in HIV-1-Infected Infants. *Clin Infect Dis.* 2015.61(12):1862–1870.
219. Kearney MF, Wiegand A, Shao W, et al. Origin of Rebound Plasma HIV Includes Cells with Identical Proviruses That Are Transcriptionally Active before Stopping of Antiretroviral Therapy. *J Virol.* 2016.90(3):1369–76.
220. Hurst J, Hoffmann M, Pace M, et al. Immunological biomarkers predict HIV-1 viral rebound after treatment interruption. *Nat Commun.* 2015.6:8495.
221. Wamalwa D, Benki-Nugent S, Langat A, et al. Treatment interruption after 2-

- year antiretroviral treatment (ART) initiated during acute/early HIV in infancy: a randomized trial. *AIDS*. 2016.24;30(15):2303-13.
222. Ramratnam B, Mittler JE, Zhang L, et al. The decay of the latent reservoir of replication-competent HIV-1 is inversely correlated with the extent of residual viral replication during prolonged anti-retroviral therapy. *Nat Med*. 2000.6(1):82–85.
  223. Panther LA, Coombs RW, Aung SA, Rosa C dela, Gretch D, Corey L. Unintegrated HIV-1 circular 2-LTR proviral DNA as a marker of recently infected cells: relative effect of recombinant CD4, zidovudine, and saquinavir in vitro. *J Med Virol*. 1999.58(2):165–73.
  224. Sharkey M, Triques K, Kuritzkes DR, Stevenson M. In Vivo Evidence for Instability of Episomal Human Immunodeficiency Virus Type 1 cDNA In Vivo Evidence for Instability of Episomal Human Immunodeficiency Virus Type 1 cDNA. *J Virol*. 2005.79(8):5203–5210.
  225. Sharkey ME, Teo I, Greenough T, et al. Persistence of episomal HIV-1 infection intermediates in patients on highly active anti-retroviral therapy. *Nat Med*. 2000.6(1):76–81.
  226. Pierson TC, Kieffer TL, Ruff CT, Buck C, Gange SJ, Siliciano RF. Intrinsic stability of episomal circles formed during human immunodeficiency virus type 1 replication. *J Virol*. 2002.76(8):4138–44.
  227. Pasternak AO, Lukashov V V, Berkhout B. Cell-associated HIV RNA: a dynamic biomarker of viral persistence. *Retrovirology*. 2013.10(1):41.
  228. Pannus P, Rutsaert S, Wit S De, et al. Rapid viral rebound after analytical treatment interruption in patients with very small HIV reservoir and minimal on-going viral transcription. *J Int AIDS Soc*. 2020.23(2):e25453.
  229. Hainaut M, Alexandra Peltier C, Goetghebuer T, et al. Seroreversion in Children Infected with HIV Type 1 who are Treated in the First Months of Life Is Not a Rare Event. *Clin Infect Dis*. 2005.41(12):1820–1821.
  230. Asang C, Laws H-J, Adams O, et al. HIV-1 seroreversion in HIV-1-infected children. *Aids*. 2014.28(4):543–547.
  231. Zou S, Dodd RY, Stramer SL, Strong DM. Probability of viremia with HBV, HCV, HIV, and HTLV among tissue donors in the United States. *N Engl J Med*. *N Engl J Med*; 2004.351(8):751–759.
  232. Brodin J, Zanini F, Thebo L, et al. Establishment and stability of the latent HIV-1 DNA reservoir. *Elife*. 2016.5:1–15.
  233. Josefsson L, Stockenstrom S Von, Faria NR, et al. The HIV-1 reservoir in eight patients on long-term suppressive antiretroviral therapy is stable with few genetic changes over time. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013.110(51):E4987.
  234. Imamichi H, Natarajan V, Adelsberger JW, et al. Lifespan of effector memory

- CD4+ T cells determined by replication-incompetent integrated HIV-1 provirus. *AIDS*. 2014.28(8):1091–1099.
235. Hill AL, Rosenbloom DIS, Fu F, Nowak MA, Siliciano RF. Predicting the outcomes of treatment to eradicate the latent reservoir for HIV-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014.111(37):13475–80.
236. Reeves DB, Duke ER, Wagner TA, Palmer SE, Spivak AM, Schiffer JT. A majority of HIV persistence during antiretroviral therapy is due to infected cell proliferation. *Nat Commun*. 2018.9(1):1–16.
237. Kearney MF, Wiegand A, Shao W, et al. Ongoing HIV Replication During ART Reconsidered. *Open forum Infect Dis*. 2017.4(3):ofx173.
238. Chu ND, Bi HS, Emerson RO, et al. Longitudinal immunosequencing in healthy people reveals persistent T cell receptors rich in highly public receptors. *BMC Immunol*. 2019.20(1):19.
239. Capoferri AA, Bale MJ, Simonetti FR, Kearney MF. Phylogenetic inference for the study of within-host HIV-1 dynamics and persistence on antiretroviral therapy. *Lancet HIV*. 2019. p. e325–e333.