



LA IMPLICACIÓN DE LAS QUIMIOCINAS Y LAS ADIPOQUINAS EN LA RESPUESTA INMUNE DISCORDANTE EN LA INFECCIÓN POR EL VIH

Elena Yeregui Etxeberria

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

WARNING. Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.

TESIS DOCTORAL



UNIVERSITAT ROVIRA i VIRGILI

Elena Yeregui Etxeberria

“La implicación de las quimiocinas y las adipoquinas en la respuesta inmune discordante en la infección por el VIH”

Universitat Rovira i Virgili

2022

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

LA IMPLICACIÓN DE LAS QUIMIOCINAS Y LAS ADIPOQUINAS EN LA RESPUESTA INMUNE DISCORDANTE EN LA INFECCIÓN POR EL VIH

Elena Yeregui Etxeberria

Elena Yeregui Etxeberria

La implicación de las quimiocinas y las adipoquinas en la respuesta inmune discordante en la infección por el VIH

TESIS DOCTORAL

dirigida por la Dra. Anna Rull Aixa, Dr. José Joaquín Peraire Forner i Dra. Consuelo Viladés Laborda

Departamento de Medicina y Cirugía
Infection and Immunity Research group (INIM)

Universitat Rovira i Virgili



UNIVERSITAT ROVIRA i VIRGILI

Tarragona

2022

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

LA IMPLICACIÓN DE LAS QUIMIOCINAS Y LAS ADIPOQUINAS EN LA RESPUESTA INMUNE DISCORDANTE EN LA INFECCIÓN POR EL VIH

Elena Yeregui Etxeberria



UNIVERSITAT ROVIRA i VIRGILI

FAIG CONSTAR que aquest treball, titulat “La implicación de las quimiocinas y las adipoquinas en la respuesta inmune discordante en la infección por el VIH”, que presenta Elena Yeregui Etxeberria, per a l’obtenció del títol de Doctor, ha estat realitzat sota la meva direcció al Departament de Medicina i Cirurgia d’aquesta universitat.

HAGO CONSTAR que el presente trabajo, titulado “La implicación de las quimiocinas y las adipoquinas en la respuesta inmune discordante en la infección por el VIH”, que presenta Elena Yeregui Etxeberria para la obtención del título de Doctor, ha sido realizado bajo mi dirección en el Departamento .de Medicina y Cirugía de esta universidad.

I STATE that the present study, entitled “La implicación de las quimiocinas y las adipoquinas en la respuesta inmune discordante en la infección por el VIH”, presented by Elena Yeregui Etxeberria, for the award of the degree of Doctor, has been carried out under my supervision at the Department Medicine and Surgery of this university.

Tarragona, 25 de mayo de 2022

Los directores de la tesis doctoral

Anna Rull Aixa

Joaquim Peraire Forner

Consuelo Viladés Laborda

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

LA IMPLICACIÓN DE LAS QUIMIOCINAS Y LAS ADIPOQUINAS EN LA RESPUESTA INMUNE DISCORDANTE EN LA INFECCIÓN POR EL VIH

Elena Yeregui Etxeberria

AGRADECIMIENTOS

No podría empezar esta tesis doctoral sin antes mostrar mi agradecimiento a todas las personas que han contribuido a que haya llegado aquí. Se dice que es de bien nacidos ser agradecido, ¿verdad?

En primer lugar, querría mostrar mi enorme agradecimiento al Dr. Francesc Vidal, Paco, director del grupo INIM. Te conocí siendo jefe el día que llegué a visitar el servicio de Medicina Interna del Hospital Joan XXIII antes de escoger plaza, y recuerdo que me dirigiste unas palabras. Gracias por ofrecerme la posibilidad de realizar la tesis doctoral en este grupo, por animarme siempre a ser crítica, ordenar mis ideas y conocimientos y confiar en mis posibilidades de avanzar. Estaré eternamente agradecida por haberme brindado la oportunidad de conocer el mundo de la investigación y transmitirme tu pasión por él.

En segundo lugar, nunca tendré palabras suficientes para agradecer a la Dra. Anna Rull, directora de la tesis, la paciencia que ha tenido conmigo. Me has enseñado todo lo que sé respecto al mundo de la investigación desde cero, siempre amable, siempre con palabras de aliento y ánimo. Has sido mi faro en este camino en el que a veces me sentía perdida y abrumada, con tu frase “be zen” me has inculcado la importancia de mantener la calma y relativizar. No tengo ninguna duda de que destacarás como colP del grupo y que harás que siga creciendo.

A mis otros directores de tesis, el Dr. Peraire y la Dra. Viladés, Ximo y Consuelo, por hacerme descubrir el maravilloso y apasionante mundo del VIH. Como expertos en el área, dedicándoos desde hace más de 25 años a este ámbito, me habéis transmitido vuestros conocimientos, vuestras anécdotas y los detalles que no salen en los libros pero que son igual de importantes (o más). Gracias por la confianza que habéis depositado en mí y por contar conmigo para participar en nuevos proyectos de investigación.

Montse i Anna, mis amiguis, mis enfermeras favoritas después de mi madre. Me habéis enseñado lo que es el trato cercano y amable con el paciente. Los pacientes os adoran y no es de extrañar, siempre estáis dispuestas a ayudarles. Con vosotras he compartido horas de trabajo y confesiones. Siempre me habéis sacado una sonrisa y me habéis dado un abrazo cuando lo necesitaba. Vamos a vivir la vida que nos merecemos.

A mis compañeras de los módulos, Vero, Sonia, Jen y Laia. Gracias por compartir todos estos días conmigo, por ayudarme siempre que lo he necesitado, por enseñarme truquitos cuando tenía que pelearme con el ordenador, y por compartir los detalles cotidianos. Os deseo un camino lleno de éxitos.

A los residentes de Medicina Interna (mis resis mayores y pequeños), por las innumerables guardias juntos, por hacer que la residencia fuera una etapa más agradable, amena, incluso muchas veces divertida.

A los adjuntos del servicio de Medicina Interna, por haber sido mis profesores durante 5 años y por haber compartido vuestros conocimientos conmigo hasta convertirme en especialista.

A los compañeros de Urgencias, por tratarme como a una más, por echarme una mano cuando lo he necesitado, por mostrarnos siempre disponibles para preguntaros, y por interesarnos por mi avance en la tesis.

A las compañeras de Idiawaka y a todo el personal del Padre Pio Health Center IV de Kamwenge, Uganda. Me habéis regalado una experiencia inolvidable e irrepetible que siempre llevaré conmigo.

Os hacéis grandes en la adversidad, y me habéis demostrado el significado real del trabajo en equipo. Espero poder participar en futuras campañas.

Al personal del laboratorio y biobanco, por ponernos las cosas fáciles y por mostrar siempre su disposición para ayudar.

Al personal de los grupos de los hospitales Sant Pau de Barcelona y Virgen del Rocío de Sevilla por su colaboración en los trabajos que conforman esta tesis.

A todos los pacientes que han participado en los estudios y que he visitado en la consulta.

A mis amigas de toda la vida, la Kuadrila. Cuántos momentos vividos, si es que hemos crecido juntas. Gracias por animarme siempre y por celebrar mis logros, pero, sobre todo, gracias por enseñarme el valor de la amistad. A pesar de estar lejos, os tengo muy cerca.

A mi familia. Aita, ama, sois mis referentes y soy quien soy gracias a vosotros. Gracias por inculcarme el valor del esfuerzo y del trabajo duro, así como la humildad, la compasión y el perdón. Habéis puesto a mi alcance todos los recursos para que haya podido aprender, avanzar y vivir nuevas experiencias. Pero, sobre todo, gracias por quererme tanto y ser un apoyo incondicional. Siempre habéis confiado en mí y habéis respetado mis decisiones, aunque eso suponga estar lejos de vosotros. Nunca os podré devolver todo lo que me habéis dado. Julen, mi hermano, eres una de las mejores personas que conozco. Tan generoso, bueno, divertido y alegre. Siempre dispuesto a ayudar a los demás. Incluso a recoger a tu hermana a las 4 am a Donosti porque está cansada. Ya te daré una vuelta en una Lambo para agradeceréte. Gracias por escuchar mis preocupaciones y darles un giro, ayudándome a diferenciar lo que es realmente importante de lo que no. Por favor, mantén siempre tu esencia. Al resto de la familia extensa (abuelos, tíos, primos) y familia política, gracias por preguntarme siempre por mis avances y demostrarme vuestro aprecio al trabajo realizado. Amama, acompañarte en tus últimos momentos es una de las grandes satisfacciones de mi vida.

Y a ti, Bahaa, qué decirte que no sepas. Eres mi compañero de vida, la mejor persona que podría tener a mi lado. Mi apoyo incondicional, crees en mí más que yo misma, y ahuyentas las nubes los días grises. A lo largo de todo este camino has estado a mi lado, animándome a seguir avanzando y ofreciéndome tu cariño. Dijimos que 2022 iba a ser nuestro año, y así está siendo. Vas a ser el mejor padre del mundo.

A todos, os echaré de menos en la nueva etapa que comenzaré, pero siempre habrá una parte de vosotros en mí.

LISTADO DE ABREVIATURAS

AI: Activación inmune

APJ: Receptor de la apelina

AZT: Zidovudina

CA: Proteína de la cápside

CCR: Receptor de quimiocina tipo CC

CDC: *Center of Disease Control and Prevention*

CXCL: Ligando de quimiocina tipo CXC

CXCR: Receptor de quimiocinas tipo CXC

CMV: *Citomegalovirus*

CTLA-4: *Cytotoxic T lymphocyte-associated protein 4*

CV: Carga viral

DNA: *Deoxyribonucleic acid*

DT: Diagnóstico tardío

ELISA: *Enzyme-linked immunosorbent assay*

EU: Población Europea

EUA: *Estados Unidos de América*

FBP4: *Fatty acid binding protein 4*

FDA: *Food and Drug Administration*

FRCn: *Fibroblastic reticular cell network*

GALT: *Gut-associated lymphoid tissue*

GPCRs : *G protein-coupled receptors*

GRID: *Gay-Related Immune Deficiency*

HCC: *Hemofiltrate Chemokine*

HPC: *Hematopoietic progenitor cells*

HSC: *Hematopoietic stem cells*

HTLV-III: *Human T-lymphotropic virus- III*

IBP: Inhibidor de bomba de protones

IBS: Población Ibérica en España

IMC: Índice de masa corporal

ICR: Immune checkpoint receptors

IISPV: Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili

IL: Interleuquina

IN: *Integrase*

INIM: *Infection and Immunity*

INR: Inmunológicamente no respondedores

IFN: Interferon

IR: Inmunológicamente respondedores

Lag-3: *Lymphocyte activation gene-3*

LAV: *Lymphadenopathy associated virus*

LD: *Linkage Disequilibrium*

MA: proteína de la matriz p17

MCP-2: *Monocyte Chemoattractant Protein-2*

MIP: *Macrophage Inflammatory Protein*

MO: Médula ósea

NC: Nucleoproteína

NK: *Natural Killer*

NRTI: Inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos

NNRTI: Inhibidor de la transcriptasa inversa no análogo de nucleósidos

OMS: Organización Mundial de la Salud

ONUSIDA: Programa Conjunto de las Naciones Unidas sobre el VIH/Sida

PD-1: *Programmed Death-1*

PECAM-1: *Platelet endothelial cell adhesion molecule-1*

PI: Inhibidor de proteasa

PLHIV: *People Who Live With HIV*

PR: *Protease*

PrEP: Profilaxis preexposición

RANTES: *Regulated upon Activation, Normal T Cell Expressed and Presumably Secreted*

RBP4: *Retinol binding protein 4*

RNA: *Ribonucleic acid*

RT: *Reverse transcriptase*

RTEs: *Recent thymic emigrants*

SD: Desviación estándar

SDF-1: *Stromal cell-derived factor-1*

SIDA: Síndrome de la inmunodeficiencia adquirida

SIV: Virus de la Inmunodeficiencia de Simia

SNPs: *Single nucleotide polymorphisms*

SNS: Sistema nacional de salud

SM: Síndrome metabólico

SU: Glicoproteína de superficie gp120

TAR: Tratamiento antirretroviral

TC: Tomografía computarizada

Th: *T helper*

TIGIT : *T cell immunoglobulin and ITIM domain*

Tim-3: *T cell immunoglobulin and mucin domain-containing molecule-3*

TM: Proteína transmembrana gp41

TNF: *Tumor necrosis factor*

TRECs: *T-cell receptor excision circles*

Tregs: Células T reguladoras

UDVP: Usuarios de drogas por vía parenteral

VHB: Virus de la hepatitis B

VHC: Virus de la hepatitis C

VIH: Virus de la inmunodeficiencia humana

ZAG: Zinc-alfa-2-glicoproteína

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

LA IMPLICACIÓN DE LAS QUIMIOCINAS Y LAS ADIPOQUINAS EN LA RESPUESTA INMUNE DISCORDANTE EN LA INFECCIÓN POR EL VIH

Elena Yeregui Etxeberria

JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

LA IMPLICACIÓN DE LAS QUIMIOCINAS Y LAS ADIPOQUINAS EN LA RESPUESTA INMUNE DISCORDANTE EN LA INFECCIÓN POR EL VIH

Elena Yeregui Etxeberria

En los últimos años la infección por VIH ha sufrido un cambio de paradigma. El desarrollo de la terapia antirretroviral (TAR) y su perfeccionamiento han conseguido que pase de ser una infección mortal a una condición crónica. De hecho, con las pautas actuales, las personas que viven con VIH (PLHIV) pueden llevar una vida relativamente normal, con tasas muy bajas de efectos adversos e interacciones farmacológicas. Es importante recalcar que un diagnóstico precoz y un inicio temprano del tratamiento no solo permiten reducir la transmisión del virus, sino que confieren un buen pronóstico en cuanto a la situación inmunológica de los pacientes. Según las estadísticas, la esperanza de vida de las PLHIV es la misma que las personas sin VIH en cantidad de años vividos, pero hay una pérdida sustancial de calidad de vida y años de vida saludables. Este último punto es objetivo de múltiples estudios que se están llevando a cabo actualmente.

Además, a pesar de todas las mejoras y todos los avances que se han implementado en el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas, es bien sabido que incluso bajo una correcta supresión virológica, cierto porcentaje de pacientes no consiguen una correcta recuperación inmune. Los pacientes pertenecientes a este grupo son llamados inmunológicamente no respondedores (INR) o PLHIV con respuesta inmune discordante. Estos pacientes suelen desarrollar una mayor progresión de la enfermedad y presentar una tasa más elevada tanto de eventos-SIDA como eventos no-SIDA respecto a los pacientes con una correcta supresión inmunológica. Este hecho supone un reto para el personal asistencial e investigador del mundo del VIH que ha incrementado sus esfuerzos en identificar los mecanismos implicados en este proceso. No obstante, hasta el momento no se dispone de un correcto marcador ni tratamiento para la pobre respuesta inmunológica que haya permitido desarrollar estrategias terapéuticas empleando estos mecanismos como diana.

Por una parte, disponer de biomarcadores que puedan predecir una respuesta inmune discordante ayudaría a identificar los pacientes que posiblemente serán INR y realizar un seguimiento más estrecho en cuanto a detectar eventos-SIDA y eventos no-SIDA. Por otra parte, el descubrimiento de nuevas dianas terapéuticas basadas en los mecanismos implicados en la pobre respuesta inmune podría dar lugar al desarrollo de estrategias dirigidas a optimizar la respuesta inmunológica.

Por eso, este trabajo se ha centrado en estudiar en mayor profundidad algunos de los factores que se han propuesto como factores involucrados en la pobre respuesta inmune: las citoquinas. Para ello se presentan dos artículos publicados en revistas de alto impacto. El primer trabajo que constituye la presente tesis (**artículo 1**), analiza el papel de las quimiocinas y sus polimorfismos en la regulación de la respuesta inmune. El segundo trabajo (**artículo 2**) estudia el papel de las adipoquinas en la recuperación inmune, y concluye proponer alguna de ellas como marcador clínico de una pobre respuesta inmunológica. En su conjunto, estos dos trabajos aportan una visión más amplia y profunda de algunos de los mecanismos de las citoquinas implicados en la recuperación inmune incompleta. De este modo, los hallazgos y las aportaciones de los dos estudios abren una nueva ventana hacia futuras investigaciones para optimizar la respuesta inmune discordante, y así mejorar el pronóstico y la calidad de vida de las PLHIV inmunológicamente no respondedores.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

LA IMPLICACIÓN DE LAS QUIMIOCINAS Y LAS ADIPOQUINAS EN LA RESPUESTA INMUNE DISCORDANTE EN LA INFECCIÓN POR EL VIH

Elena Yeregui Etxeberria

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS

LISTADO DE ABREVIATURAS

JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO

I.	INTRODUCCIÓN	1
	1. Infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)	3
	2. La respuesta inmunitaria al VIH	15
	3. Citoquinas en la infección por el VIH	27
II.	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	35
III.	MÉTODOS	39
IV.	RESULTADOS	45
	Estudio 1: <i>“High circulating SDF-1and MCP-1 levels and genetic variations in CXCL12, CCL2 and CCR5: Prognostic signature of immune recovery status in treated HIV-positive patients”</i>	47
	Estudio 2: <i>“Adipokines as New Biomarkers of Immune Recovery: Apelin Receptor, RBP4 and ZAG Are Related to CD4+ T-Cell Reconstitution in PLHIV on Suppressive Antiretroviral Therapy”</i>	63
V.	DISCUSIÓN	85
VI.	CONCLUSIONES GLOBALES	93
VII.	BIBLIOGRAFÍA	97
VIII.	ANEXO	123

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

LA IMPLICACIÓN DE LAS QUIMIOCINAS Y LAS ADIPOQUINAS EN LA RESPUESTA INMUNE DISCORDANTE EN LA INFECCIÓN POR EL VIH

Elena Yeregui Etxeberria

I INTRODUCCIÓN

1. Infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).

1.1 Historia y epidemiología del VIH.

Las principales investigaciones apuntan que la pandemia por el VIH se inició en Kinshasa (República Democrática del Congo) en 1920, una de las ciudades del África central mejor conectadas por vía fluvial y ferrocarril. Este fue uno de los factores que favoreció que el virus, transmitido de primates y chimpancés a humanos, se extendiera por todo el continente africano, y posteriormente a todo el planeta [1,2].

En la década de los 80 se definió un síndrome asociado al virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), llamado Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA). El 5 de junio de 1981 se publicó en el *Morbidity and Mortality Weekly Report* del CDC (*Center of Disease Control and Prevention*) una serie de 5 casos de neumonía atípica causada por el microorganismo oportunista *Pneumocystis carinii* (actualmente denominado *Pneumocystis jirovecii*) en varones homosexuales sin antecedentes previos[3]. Ese mismo año, se dieron a conocer varios casos de Sarcoma de Kaposi (también llamado en ese momento “el cáncer gay”) entre varones homosexuales [4], se describió el primer caso de neumonía por *Pneumocystis carinii* en personas usuarias de drogas por vía parenteral (UDVP) [5] y se cuantificaron 270 casos de inmunodeficiencia severa en hombres gay (lo que algunos investigadores denominaron GRID (*Gay-Related Immune Deficiency*) [6]. Curiosamente, en 1982 también se detectaron casos de inmunodeficiencia severa en pacientes hemofílicos [7], lo que desencadenó a que se empleara por primera vez el término SIDA para describir el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida [8].

Un año más tarde, se describió el SIDA en mujeres heterosexuales [9] y en niños [10], lo que sugirió que la vía sexual heterosexual y la vertical también podrían ser vías de transmisión de la enfermedad. Ese mismo año, científicos del Instituto Pasteur de Francia descubrieron un retrovirus, el Virus Asociado a Linfadenopatía (LAV de sus siglas en inglés *Lymphadenopathy associated virus*), que se creyó que podría ser el causante del SIDA [11]. Posteriormente, en 1984, científicos del *National Cancer Institute* anunciaron el descubrimiento de un retrovirus que denominaron HTLV-III (*Human T-lymphotropic virus- III*) como causante del SIDA [12]. Junto con los científicos del Instituto Pasteur, concluyeron que se trataba del mismo agente, pero no fue hasta el año 1986 cuando se empleó el término Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) [13]. Una vez reconocidas las vías de transmisión y el agente causal se pusieron en marcha múltiples recomendaciones y campañas de prevención del VIH a lo largo de los siguientes años (14–18).

En 1987, la agencia americana *Food and Drug Administration* (FDA) aprobó el primer fármaco antirretroviral en adultos con VIH, la zidovudina (AZT) (**Figura 1**) [19], que se autorizó para su uso en niños en 1990 [20], y en 1994 para prevenir la transmisión vertical [21]. El inicio del tratamiento antirretroviral (TAR) supuso una caída en la mortalidad por el VIH.

Más tarde, en 1995 se aceptó el primer inhibidor de proteasa (PI) (saquinavir) (22), en 1996 el primer inhibidor de la transcriptasa inversa no análogo de nucleósidos (NNRTI) (nevirapina) [23], y en 1997 se comercializó el Combivir®, el primer comprimido único que contenía dos inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos (NRTI) (lamivudina y zidovudina) (24). El hecho de disponer de un comprimido único facilitó la toma de medicación antirretroviral y el TAR se convirtió en el “*Standard of Care*” del tratamiento por el VIH.

El año 2000 se inició una bajada de los precios de los antirretrovirales tras el acuerdo de ONUSIDA (Programa Conjunto de las Naciones Unidas sobre el VIH/Sida) con varias farmacéuticas, y el año 2001 comenzó la comercialización de fármacos genéricos [25]. En 2002, se iniciaron múltiples planes para combatir el SIDA puesto que se había convertido en la primera causa de muerte en el África

Subsahariana y la 4ª causa a nivel mundial [26]. En este contexto, cobró vital importancia la prevención del VIH, y se iniciaron estudios para una nueva estrategia de actuación global: la profilaxis preexposición (PrEP). En 2010 se publicaron los resultados del primer estudio de profilaxis preexposición (iPrEx)[27], y 2 años más tarde, en 2012, se aprobó el uso de la PrEP por la FDA [28], una estrategia que ha probado ser eficaz y que se ha implementado en el sistema nacional de salud (SNS). En 2015, la OMS (Organización Mundial de la Salud) modificó las guías de tratamiento, en las que recomendaban iniciar TAR en todas las personas que viven con VIH (PLHIV de las siglas en inglés *People Who Live With HIV*) [29]. Desde entonces, se han desarrollado nuevos fármacos que aportan una acción óptima en cuanto al control virológico, con menores efectos adversos que los regímenes previos, lo que ha permitido mejorar la calidad de vida de las PLHIV. Finalmente, en la última década, los esfuerzos se han centrado en el desarrollo de formulaciones parenterales de larga acción, como cabotegravir-rilpivirina (29) que es un tratamiento antirretroviral inyectable de larga acción o un anillo vaginal que contiene antirretrovirales como islatravir [31] o dapivirina [32].

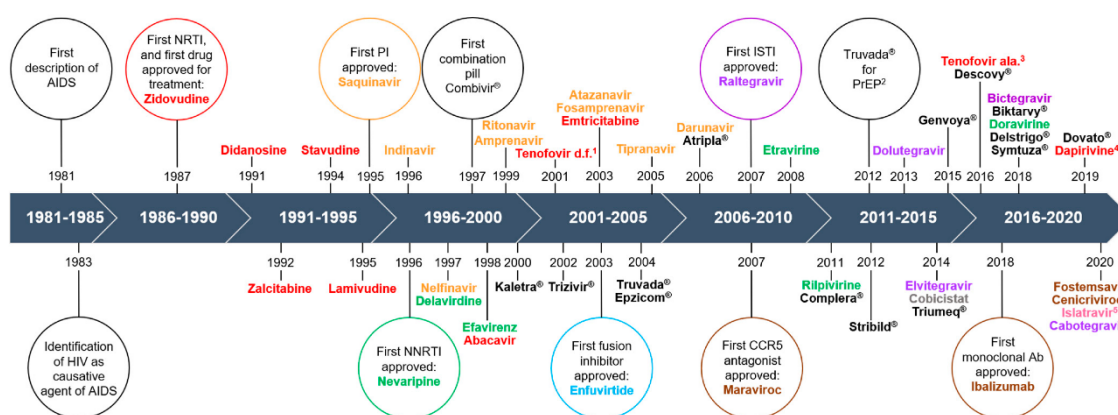


Figura 1. Línea del tiempo del desarrollo de las terapias antirretrovirales: Los hitos se muestran en círculo. Los años muestran la fecha en que la FDA aprobó su uso. Se ha empleado una codificación por colores según grupo de fármacos: Rojo = inhibidor de la transcriptasa inversa análogo de nucleósidos (NRTI); naranja = inhibidor de la proteasa (PI), verde = inhibidor de la transcriptasa inversa no análogo de nucleósidos (NNRTI); azul = inhibidor de la fusión, morado = inhibidor de la integrasa, marrón = inhibidor de la entrada, rosa = inhibidor de la translocación de nucleósido de la transcriptasa inversa (NRTTI), gris = potenciador sin actividad antiviral (análogo de ritonavir). Los nombres comerciales se muestran en negro y negrita. ¹Tenofovir Disoproxil Fumarato; ²PrEP = Profilaxis preexposición; ³ Tenofovir alafenamida; ⁴Pendiente de aprobación de la FDA para la formulación en anillo vaginal, ⁵ Actualmente en ensayos de fase III, ⁶ Aprobado en 2021 como primer fármaco inyectable de acción prolongada y que se coadministra con la formulación de larga duración de rilpivirina. Imagen extraída de Cheney et al. 2021 [33].

Para 2020, ONUSIDA marcó los llamados objetivos 90-90-90 (90% de PLHIV diagnosticadas, 90% de personas diagnosticadas bajo tratamiento antirretroviral, y de estos, el 90% con carga viral (CV) indetectable), que desgraciadamente todavía no se han cumplido a nivel global [34]. Según los datos revisados por la Organización Mundial de la Salud (OMS) [35] y ONUSIDA [36] (Figura 2) en noviembre 2021, a finales de 2020 en el mundo había 37.7 millones de personas viviendo con VIH [30.2-45.1 millones], de las cuales 25.4 millones se encuentran en la región africana de la OMS, 1.7 millones eran niños y niñas de entre 0-14 años, y el 53% eran mujeres y niñas. El VIH se ha cobrado la vida de 36.3 millones de personas [27.2-47.8 millones]. El 2020, 680000 personas [480000- 1

millón] murieron por causas relacionadas con el VIH y 1.5 millones [1-2 millones] adquirieron el VIH. Sin embargo, lejos de alcanzar los objetivos establecidos por ONUSIDA de 90-90-90, únicamente el 84% de las PLHIV conocen su estatus serológico, el 73% tiene acceso al TAR, y el 66% se encuentran virológicamente suprimidos. Además, el impacto de la pandemia de COVID ha tenido un gran impacto en el acceso a circuitos de diagnóstico de VIH, seguimiento y acceso al tratamiento. Los objetivos establecidos por ONUSIDA de 90-90-90 han sido ampliados a 95-95-95 para el 2030.



Source: UNAIDS/WHO and KFF.org

Figura 2. Estado global de la epidemia de VIH en 2020: El año 2020 había 37.7 millones de PLHIV, lo que supone un 23% más que en 2010. Ese año se infectaron 1.5 millones de personas, un 31% menos que en 2010. Se contabilizaron 680000 millones de muertes relacionadas con el VIH, un 47% menos que en 2010. Imagen extraída de <https://asm.org/Resource-Pages/HIV-AIDS-Resources>.

1.2 El Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH)

El VIH (tipo 1 y tipo 2) es un retrovirus que pertenece a la familia *Retroviridae*, cuya característica principal es que el material genético se almacena a modo de RNA, y que se convierte en DNA al infectar las células huéspedes gracias a la enzima transcriptasa inversa. Dentro de esta familia se encuentran múltiples virus que se han asociado con otras patologías como el cáncer, la leucemia o las enfermedades neurológicas[37,38]. La familia *Retroviridae* se divide en dos subfamilias: *Spumaretroviridae*, y *Ortoretrovirinae*, en el que se encuentra el género *Lentiviridae*[39], género al que pertenecen el VIH-1, VIH-2 y el SIV (Virus de la Inmunodeficiencia de Simia)[40,41] (**Figura 3**).

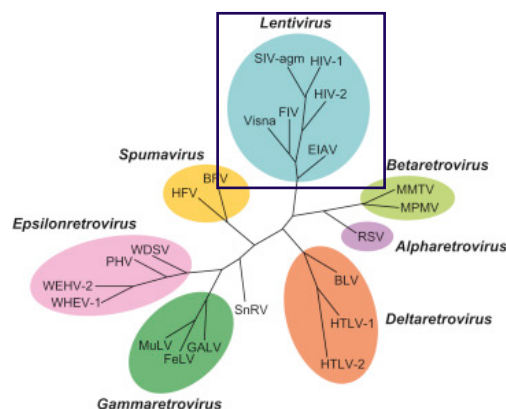


Figura 3. Análisis filogenético de los retrovirus: El género *Lentiviridae* que incluye el VIH-1 y VIH-2 ha sido remarcado en un recuadro azul para su mejor identificación. Imagen extraída de MacLachlan et al. 2016. [42]

Algunos de estos retrovirus se integran el genoma del huésped y pueden ser transmitidos como virus endógenos a futuras generaciones. El estudio de los retrovirus ha contribuido a la identificación de los oncogenes y la comprensión de la expresión génica de las células procariotas, mostrando su utilidad en la investigación y en la terapia génica[41].

1.2.1 Estructura del VIH

El VIH es un virus de forma esférica, de unos 80-120nm de diámetro, cubierta con una envuelta [43]. Su estructura se compone de los siguientes elementos (**Figura 4**):

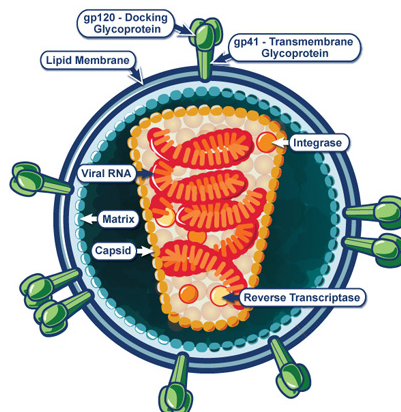


Figura 4. Estructura del VIH: Representación gráfica de la estructura de una partícula viral infecciosa del VIH. Imagen extraída de <https://www.niaid.nih.gov/news-events/niaid-hiv-research-images>

- **Envuelta (*Lipid membrane*):** Bicapa lipídica proveniente del huésped, en la que se ancla la espícula *Env* conformada por la glicoproteína de superficie gp120 y la glicoproteína transmembrana gp41. La estructura gp120 se une al receptor primario de CD4 y a los correceptores CCR5 y CXCR4 [44] y la estructura gp41 promueve la fusión de las membranas viral y celular del huésped (45).
- **Matriz (*Matrix*):** Membrana compuesta por la proteína de la matriz p17 (MA), que cumple su función principal en la regulación de la replicación y ciclo vital del virus. Se postula que existen dos subunidades de MA: una anclada en el precursor de Gag de la célula huésped (cMA), y la otra anclada a los viriones (vMA) [46,47].
- **Cápside (*Capsid*):** Estructura cónica compuesta principalmente por hexámeros y pentámeros de la proteína de la cápside CA, localizada en el centro del virión [48]. Contiene el material genético del virus (RNA genómico, gRNA) y las enzimas transcriptasa inversa (RT) e Integrasa (IN). Recientemente se ha descubierto que la cápside desempeña un papel imprescindible en el mantenimiento del gRNA intacto, y en el proceso de desensamblaje del core [49,50]
- **Genoma viral (*Viral RNA*):** Está compuesto por dos cadenas idénticas de RNA monocatenario, que mediante la RT se transcribe como DNA y se integra en el genoma del huésped para posteriormente replicarse y generar nuevos viriones. El genoma de todos los retrovirus contiene 3 genes estructurales imprescindibles:
 - **Gag:** Codifica las proteínas estructurales internas que conforman la matriz (MA), la cápside (CA) y la nucleoproteína (NC), entre otras.
 - **Pol:** Precursor las enzimas necesarias para generar nuevos virus, como son la transcriptasa inversa (RT), proteasa (PR), integrasa (IN) y RNasa H.
 - **Env:** Codifica las proteínas que conforman la envuelta, como son la glicoproteína de superficie gp120 (SU) y la proteína transmembrana gp41 (TM).

Los lentivirus, además de estos genes estructurales, contienen de 6 genes reguladores más: *tat*, *rev*, *nef*, *vif*, *vpr* y *vpu* [51].

1.2.2 Ciclo de replicación del VIH

El ciclo vital del VIH es un proceso complejo, que se puede dividir en distintas etapas y se estima que puede durar de uno a dos días. La fase temprana comprende desde la unión del virus a la célula hasta la integración del genoma en el DNA del huésped, y la fase tardía abarca desde la expresión génica hasta la liberación de viriones maduros [52]. El virus del VIH infecta principalmente linfocitos T-CD4, pero también macrófagos y células dendríticas. Los macrófagos, por ejemplo, son capaces de producir viriones durante semanas y de almacenar viriones infecciosos en el medio intracelular. A continuación, se describen en detalle las etapas del ciclo de replicación (**Figura 5**):

- **Entrada:** El primer paso del ciclo replicativo consiste en la entrada del virus a la célula huésped, que ocurre en dos fases: unión y fusión. En primer lugar, la espícula *Env*, que contiene gp120 y gp41 interacciona con la membrana celular. La proteína gp120 se une

al receptor principal de CD4, dando lugar a una formación de puentes que dejan al descubierto la región de unión de los correceptores principal CCR5 o CXCR4. Esta unión da lugar a la inserción del péptido de fusión de la gp41 en la membrana celular, favoreciendo la fusión de la membrana del virus con la membrana celular del huésped. La importancia de estos correceptores reside en que, en primer lugar, determinan el tropismo del virus y que juegan un papel vital en la capacidad infectiva del virus. En función del correceptor con el que interactúan, el VIH se clasifica como tropismo CCR5 o CXCR4. Por otro lado, se conocen casos de curación espontánea del virus en los pacientes conocidos como paciente de Berlín, Londres, Esperanza y recientemente en Estados Unidos de América. En estos casos los pacientes habían recibido un trasplante de médula ósea o células madre de un donante que era portador de la mutación CCR5 Δ 32. Esta mutación imposibilita que el virus pueda interactuar con el correceptor CCR5, impidiendo así su entrada en la célula. Además, los correceptores se han utilizado como diana terapéutica mediante los inhibidores de la fusión (Enfuvirtide) y los antagonistas de CCR5 (Maraviroc) [53].

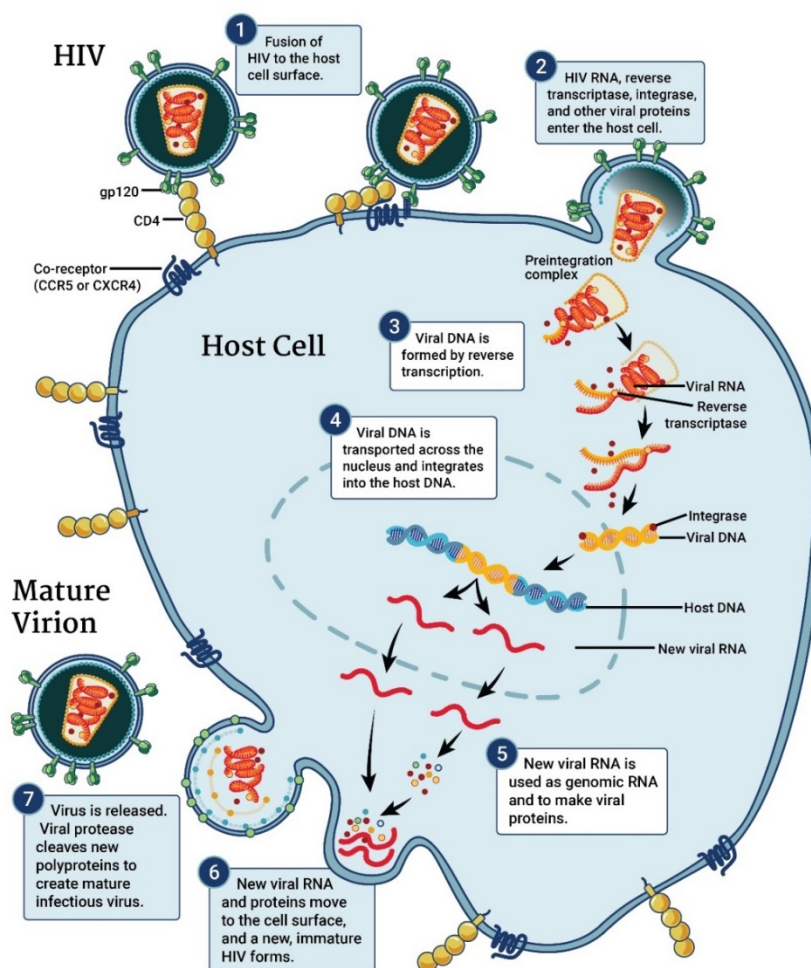


Figura 5. Ciclo replicativo del VIH: La infección se inicia cuando el VIH se fusiona con la superficie de la célula huésped (1) y el genoma y las proteínas virales entran a la célula (2). La transcriptasa

inversa convierte el RNA viral en DNA (3) que es transportado a través del núcleo y la integrasa integra el DNA viral en el DNA del huésped (4). La maquinaria de transcripción del huésped convierte el DNA del VIH en múltiples copias de nuevo RNA viral (5) que servirán para crear proteínas virales y nuevos viriones inmaduros (6). Finalmente, el virus es liberado y la proteasa escinde glicoproteínas recién creadas para dar lugar a virus infectivos maduros. Imagen extraída de <https://www.niaid.nih.gov/diseases-conditions/hiv-replication-cycle>

- **Desensamblaje y síntesis de DNA viral:** Tras la entrada del virus a la célula huésped, dentro de la cápside se inicia el proceso de la retrotranscripción. La transcriptasa inversa es una polimerasa lenta, que emplea como sustrato la cadena gRNA para polimerizarla en una DNA de doble cadena complementaria (cDNA) y a su vez mediante la actividad de RNasa H, degradar el RNA viral. El inicio de esta fase sucede dentro de la cápside que ofrece un entorno favorable para que esta reacción suceda [54]. El inicio de la retrotranscripción es una señal clave para que la proteína CA sufra un cambio la rigidez de su estructura, se diluya, y tanto el material genético como la RT y la IN sean liberados al citosol de la célula huésped [55]. La transcriptasa inversa, junto con su gran capacidad de producción masiva de virus (2×10^9 viriones al día) y su alta tasa de mutaciones (1 error por cada 10000 nucleótidos), confiere al virus la capacidad de adaptarse rápidamente al nuevo entorno y generar resistencias frente a los fármacos antiretrovirales. Esta enzima se ha utilizado como diana terapéutica desde los inicios de la terapia antirretroviral, y tanto los inhibidores de la transcriptasa inversa análogos como no análogos, hoy en día siguen siendo la columna vertebral del tratamiento antiretroviral combinado [56].
- **Integración:** El DNA proviral es transportado al núcleo de la célula huésped por los nucleoporos mediante proteínas, y gracias a la enzima de Integrasa, se incorpora en el genoma del huésped. La integrasa corta ambas cadenas de DNA viral en el final 3', que en el núcleo de la célula huésped se une al DNA del huésped de manera aleatoria, aunque se han identificado algunas zonas en las que estratégicamente se une el DNA. De esta manera el DNA proviral queda integrado en DNA de la célula, conformando los provirus estables [57] para su posterior replicación junto con el DNA del huésped. En algunas células de larga vida media, como las células T de memoria, el genoma viral integrado llamado provirus, puede mantenerse silente e inactivo durante años. Esto permite al virus escapar del sistema inmune y establecer reservorios que los tratamientos disponibles hoy en día no son capaces de eliminar. Los inhibidores de la integrasa han cobrado especial importancia como fármacos antirretrovirales, y junto con los inhibidores de la transcriptasa inversa, se han convertido en fármacos de primera línea en las guías clínicas actuales [58].
- **Transcripción, exportación y traducción:** Una vez que el DNA proviral está integrado en el genoma del huésped, el virus emplea la enzima del huésped RNA polimerasa II (Pol II) para sintetizar RNA genómico y RNA mensajero (mRNA). Este proceso se divide en las fases de pre-iniciación, iniciación, aclaramiento del promotor, elongación y terminación. La transcripción se inicia por el promotor viral, ubicado en el final 5' y requiere la proteína transactivadora Tat y el factor de elongación de la transcripción positiva b (P-TEFb) [59]. Tat permite la síntesis de transcripciones de VIH de tamaño completo y la de >25 mRNA de distinto tamaño, según el *splicing* ("corte y empalme") sufrido [52]:

- RNA sin splicing: Sirven como RNA genómico o para la producción de precursores de Gag y Gag-Pol.
- RNA con splicing único: Codifican las proteínas Vif, Vpr, Vpu y Envi
- RNA con splicing completo: Expresan Tat, Rev y Nef

Los mRNA de menor tamaño serán transportados automáticamente fuera del núcleo, pero aquellos fragmentos de mayor tamaño requerirán la acción de la proteína Rev.

- **Ensamblaje y gemación:** El ensamblaje es un proceso complejo, resultado de una extensa interacción entre el gRNA y múltiples moléculas de la proteína viral Gag en la membrana plasmática[60]. El precursor de la poliproteína GagPol contiene las enzimas RT, PR e IN, y la proteína Gag contiene las proteínas MA, CA y NC. La proteína MA transporta Gag a la membrana plasmática, y promueve la incorporación de la glicoproteína Env en los nuevos viriones. La proteína CA promueve la multimerización de Gag y GagPol, y NC recluta las dos copias de gRNA en los viriones. Posteriormente Gag recluta la maquinaria celular para la escisión celular para la liberación de partículas virales[61].
- **Maduración:** Las partículas de VIH son liberadas en la forma inmadura y no infecciosa, envueltas por una capa de precursores de Gag y Gag-Pol. Para la actividad infectiva del virus es necesaria la acción de la proteasa viral [62]. Tras el proceso de gemación, se activan estas proteasas virales que escinden los precursores de Gag y Gag-Pol [52] dando lugar a un cambio morfológico conocido como maduración [61]. Así, se forman nuevos virus infectivos que iniciarán un nuevo ciclo vital.

1.3 Patogénesis del VIH/SIDA

La patogénesis de la infección por el VIH se organiza en diferentes fases (**Figura 6**): 1) la transmisión del virus a través de la mucosa, 2) una fase aguda que se caracteriza por una intensa y rápida replicación viral y destrucción inicial de linfocitos T-CD4, para posteriormente dar paso a 3) una fase latente que puede durar años, en la que la replicación del virus se estabiliza y la destrucción de CD4 es lentamente progresiva, hasta dar lugar a 4) una fase final o fase SIDA. En esta etapa, destacan las infecciones por gérmenes oportunistas, y finalmente la muerte. Sin embargo, el TAR ha cambiado significativamente la historia natural de la enfermedad, lo que ha reducido significativamente llegar a la fase SIDA y por consiguiente, la muerte. A continuación, se detalla cada fase natural del virus por separado. La patogénesis del VIH/SIDA bajo TAR se detalla en un apartado especial.

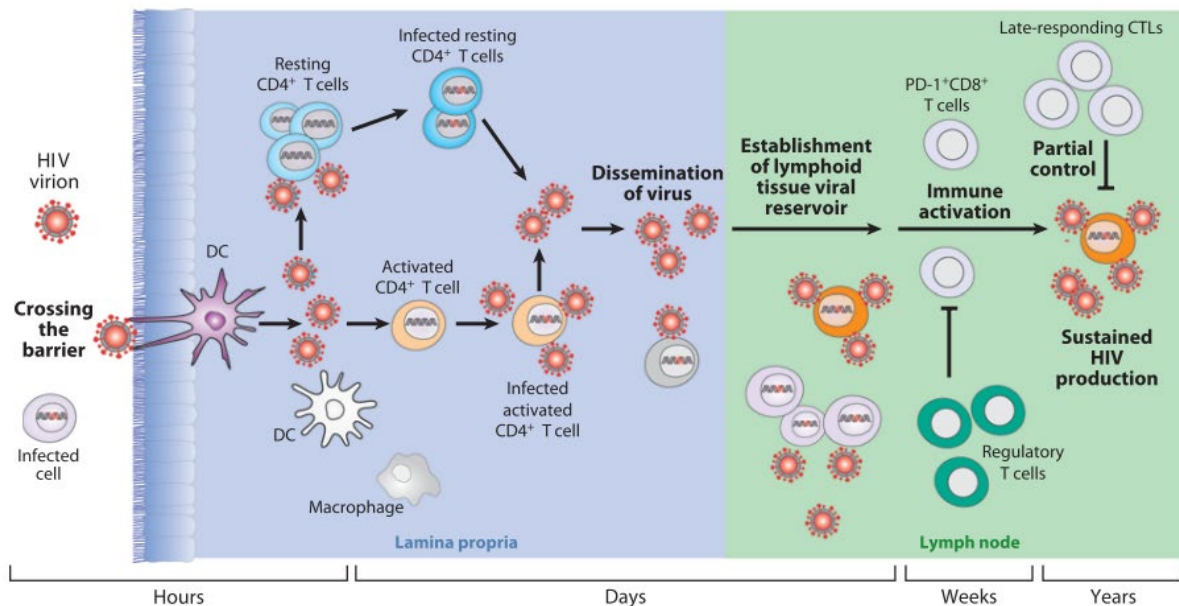


Figura 6. Fases de la infección por el VIH. El virus atraviesa la barrera mucosa y se inicia la propagación a través de las células T-CD4⁺ parcialmente activadas. La propagación de bajo nivel que se da inicialmente da lugar a una propagación masiva en la lámina propia del GALT. Posteriormente el virus se disemina hacia los tejidos linfáticos secundarios y se establecen los reservorios virales. Esto provoca una activación inmune que es capaz de controlar la replicación viral solo parcialmente, manteniéndose una producción viral sostenida. Abreviaturas: CTLs: Linfocitos T citotóxicos, DC: Célula dendrítica, PD-1: Programmed Death-1. Imagen extraída de Moir et al. 2011, [63]

Fase 1 y Fase 2) Transmisión e infección aguda:

La propagación lenta inicial se da en células T-CD4⁺ parcialmente infectadas, para luego propagarse masivamente a través de los ganglios linfáticos hasta el tejido linfático asociado al intestino (GALT) [63]. En el caso de la vía de transmisión sexual (la más frecuente hoy en día [64]), el virus fundador infecta las células T-CD4⁺ que se encuentran en la lámina propia de la barrera mucosa que expresan CCR5⁺ [65]. Entre los días 4-11 de la transmisión de este virus fundador se da un rápido aumento de la replicación viral que se traduce en una viremia masiva que puede llegar a 10 millones de copias/ml (**Figura 7**). A las dos semanas de la transmisión, en contexto de esta viremia masiva la persona puede experimentar síntomas gripales, fiebre o adenopatías. Durante este tiempo el virus se disemina a otros tejidos linfáticos y se establece el reservorio viral [63], que es constituido por células persistentemente infectadas como pueden ser los macrófagos. Estos se encargan de mantener la infección y rellenar el reservorio [66]. La importancia de reservorio radica en que no es posible eliminarlo con el TAR disponible, aunque

su inicio precoz puede disminuir el tamaño del reservorio viral. Además, se produce una inducción de quimiocinas y citoquinas inflamatorias [67], y una destrucción masiva de linfocitos T-CD4⁺, bien por acción directa o acción citotóxica [65]. La depleción severa de T-CD4⁺ se asocia principalmente a la depleción masiva de las células CD4⁺ de memoria CCR5⁺ del GALT. Tras la infección, hay una respuesta compensadora a la destrucción aguda del compartimento de CD4 memoria, lo que da lugar a una proliferación de linfocitos T-CD4⁺ de memoria. No obstante, esta respuesta es incompleta e insuficiente y en muchas ocasiones, destinada a fracasar. La destrucción temprana del compartimento de T-CD4⁺ memoria aumenta el riesgo de invasión de patógenos locales, y contribuye a una hiperactivación inmune crónica y destrucción del microentorno, asociado con la progresión de la infección [65]. A las 3-4 semanas del inicio de la infección, gracias a los anticuerpos y la respuesta T-CD8⁺, disminuye la replicación viral, manteniendo una carga viral estable, y se recuperan los T-CD4⁺, aunque sin llegar a los valores previos a la infección.

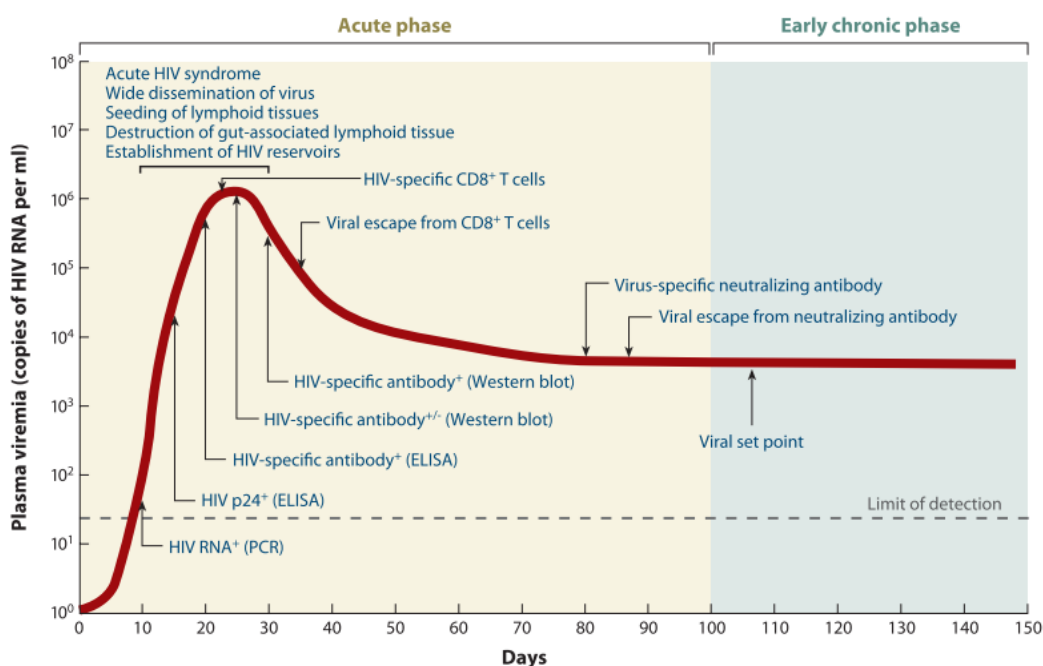


Figura 7. Cinética de los eventos virales e inmunológicos en la infección aguda y crónica por VIH: El reservorio viral se establece durante la fase aguda de la infección, justo tras la aparición de la viremia plasmática. Durante la fase aguda de la infección, caracterizada por la replicación masiva del virus y niveles altos de viremia plasmática, en algunas personas tiene lugar un síndrome agudo de VIH, y el virus se disemina rápidamente a varios órganos linfoides, causando una depleción de T-CD4⁺. Aunque en esta fase aguda se desarrolla una respuesta inmunitaria contra el VIH, compuesta por linfocitos T-CD8⁺ específicos y anticuerpos, rápidamente emergen mutantes de escape viral. Así, finalmente tiene lugar el establecimiento del *set point* viral. Abreviaturas: ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay; PCR: Polymerase-chain-reaction. Imagen extraída de Moir et al. 2011, [63]

Fase 3) Infección crónica

Tras la infección aguda, se inicia la fase crónica o latente, que habitualmente es asintomática. Esta etapa suele durar entre 7-10 años, en función de la velocidad de la pérdida de CD4⁺. Gracias a la respuesta inmune generada a través de los linfocitos CD8⁺ citotóxicos y los anticuerpos, hay una caída en la replicación viral, la cual se estabiliza y se convierte en persistente [68]. Esta viremia crónica induce fenómenos entre los que se encuentran un

elevado *turnover* celular (apoptosis de T-CD4⁺ y producción de T-CD4⁺ en el timo) y cambios en la función y el fenotipo de las células, que se relacionan con una hiperactivación inmune [63]. Tras la pérdida masiva de T-CD4⁺ que ocurre en la fase aguda, el declive de los recuentos de T-CD4⁺ sucede progresivamente.

Iniciar el TAR en fases avanzadas de esta etapa, puede generar peor respuesta al tratamiento y una pobre respuesta inmune al mismo, problema que se abarca en la presente tesis.

Fase 4) Fase final o fase SIDA

Si no se realiza ninguna intervención terapéutica y la enfermedad progresa en su fase asintomática, el recuento de T-CD4⁺ decae hasta llegar al recuento crítico de 200células/ μ l, cifra en la cual existe riesgo de contraer infecciones oportunistas (IO) que finalmente pueden causar la muerte. Estas infecciones oportunistas u otras enfermedades asociadas a la inmunosupresión severa son condiciones que constituyen la definición de SIDA según la clasificación del CDC [69]. Gracias al desarrollo del TAR, el número de personas que llegan a esta fase se ha reducido drásticamente, a pesar de que algunos individuos son incapaces de restaurar correctamente el sistema inmune.

1.3.1 Patogénesis del VIH/SIDA bajo tratamiento antiretroviral

El desarrollo de las terapias antirretrovirales ha cambiado sustantivamente la historia natural de la enfermedad, reduciendo drásticamente la mortalidad por VIH y las comorbilidades asociadas. Las PLHIV que gracias al TAR consiguen la supresión virológica y restauran exitosamente los recuentos de CD4⁺ tienen una esperanza de vida similar a las personas que no viven con VIH [70]. Se ha demostrado que iniciar TAR en las etapas iniciales de la infección puede reducir la progresión de la enfermedad y reducir el riesgo de transmisión [71]. Es conocido que, a mayor progresión de la enfermedad, menores recuentos de T-CD4⁺, y que un nadir bajo de T-CD4⁺ al inicio del TAR es un factor pronóstico para una respuesta inmune incompleta. Aproximadamente a los 3 meses de haber iniciado el TAR, la carga viral disminuye por debajo de las concentraciones detectables por los dispositivos disponibles. Esta reducción en la carga viral se acompaña de un aumento de células T-CD4⁺ y una disminución de la hiperactivación inmune. Sin embargo, aunque la activación inmune disminuya, se mantiene un ambiente de inflamación crónica de bajo grado, mayor que en personas sanas. Además, aunque la replicación viral se controle, el virus persiste latente en los reservorios, lo que impide la cura de la infección.

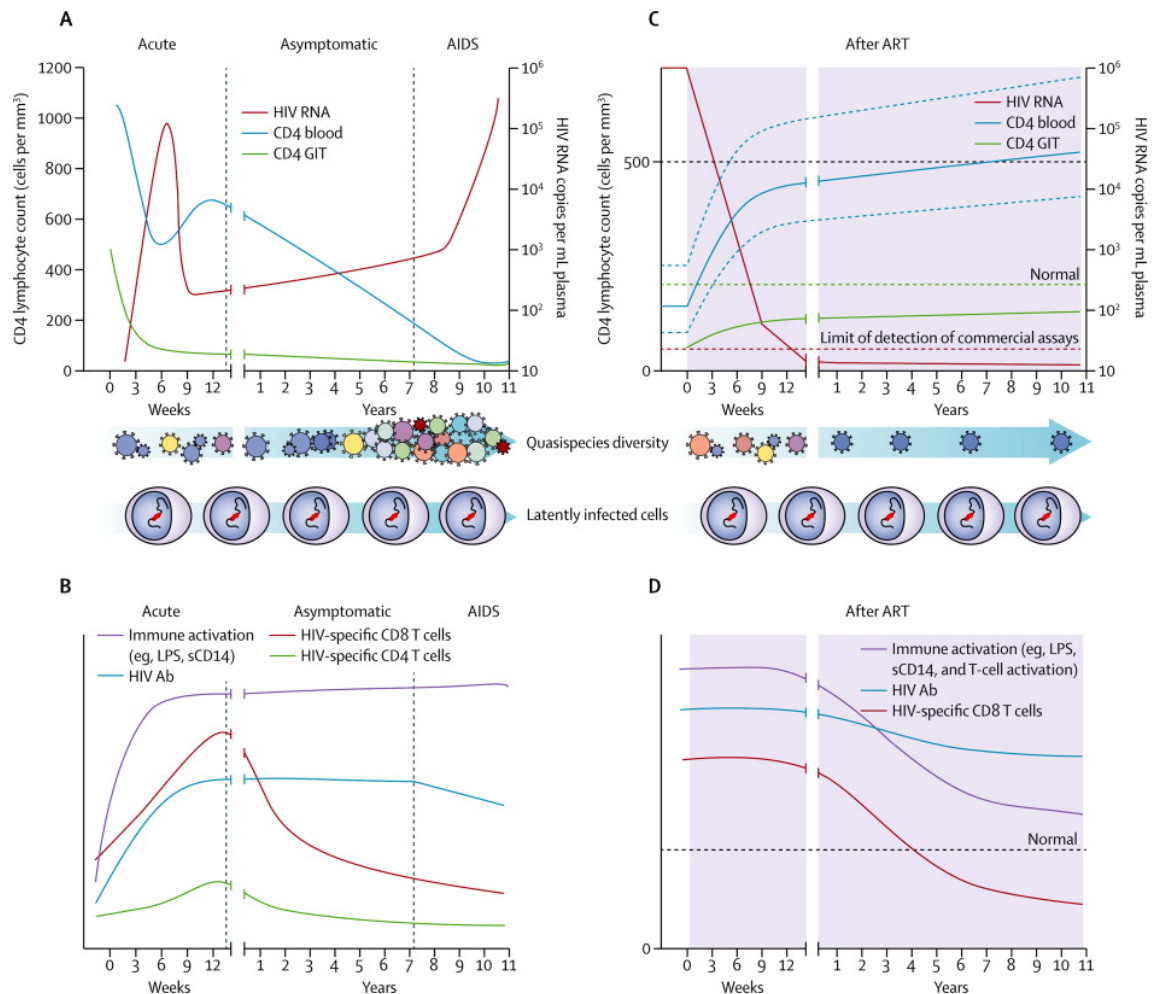


Figura 8. Historia natural de la infección por VIH no tratada y los cambios tras el TAR: A) En la infección por VIH no tratada, hay una pérdida progresiva de T-CD4⁺ circulantes, pero los T-CD4⁺ del tracto gastrointestinal se deplecionan rápidamente. B) La respuesta aguda a la infección por VIH incluye un aumento importante de los marcadores de activación inmune y la producción de anticuerpos no neutralizantes y células T-CD4⁺ y T-CD8⁺ específicas que se relacionan temporalmente con un descenso plasmático de RNA de VIH. C) Tras el TAR, el RNA del VIH disminuye significativamente y se da una recuperación de T-CD4⁺. Por otro lado, la recuperación de células T-CD4⁺ en el tracto gastrointestinal está disminuida. D) Con la reducción de RNA de VIH y antígenos virales, las células T VIH específicas disminuyen tras el tratamiento antirretroviral, mientras que los anticuerpos persisten en todos los pacientes. La activación inmune disminuye tras la terapia antirretroviral, pero en la mayoría de los pacientes se mantienen significativamente elevados en comparación a los controles sanos. Abreviaturas: GIT: Tracto gastrointestinal; LPS: Lipopolisacáridos. Imagen extraída de Marteens et al. 2014, [67]

El desarrollo de nuevos fármacos antirretrovirales ha mejorado el perfil de seguridad y eficacia de los mismos, reduciendo toxicidad secundaria a fármacos y ofreciendo alternativas para casos de resistencia a los tratamientos preexistentes. El problema reside en que para aquellas personas con una pobre respuesta inmune e incapacidad para restaurar los recuentos de CD4⁺ aún no disponemos de estrategias terapéuticas que optimicen la ganancia de CD4⁺.

2. Respuesta inmunitaria al VIH

Tras la infección inicial por VIH, el organismo responde produciendo una respuesta inmune mediante la activación de células innatas, células B y T. Esta activación inmune, aunque necesaria, se relaciona con la progresión de la enfermedad [72]. En los próximos apartados se abordará la respuesta inmune natural a la infección por VIH, en qué consiste la respuesta inmune discordante y los mecanismos implicados en ello.

2.1. Respuesta innata y adaptativa

La respuesta inmune se inicia conforme hay un aumento de la viremia. En primer lugar, las células T-CD4⁺ CCR5⁺ infectadas, los *Natural Killer* (NK), células dendríticas, monocitos, macrófagos y células T VIH específicas producen citoquinas proinflamatorias que a su vez estimulan la síntesis de proteínas de fase aguda. La producción de citoquinas aumenta al tiempo que aumenta la viremia, pudiendo encontrar distintos perfiles cinéticos según cada citoquina [73]:

- IL-15, interferón tipo I (IFN), Ligando de quimiocina CXC 10 (CXCL10): Aumentan rápidamente, pero de manera transitoria.
- IL-18, Factor de necrosis tumoral (TNF), Interferon Gamma (IFN γ), IL-22: Aumentan rápidamente y sus niveles se mantienen elevados.
- IL-10: Aumenta tardíamente

Esta producción de citoquinas estimula la respuesta innata, pero a su vez facilita la replicación viral.

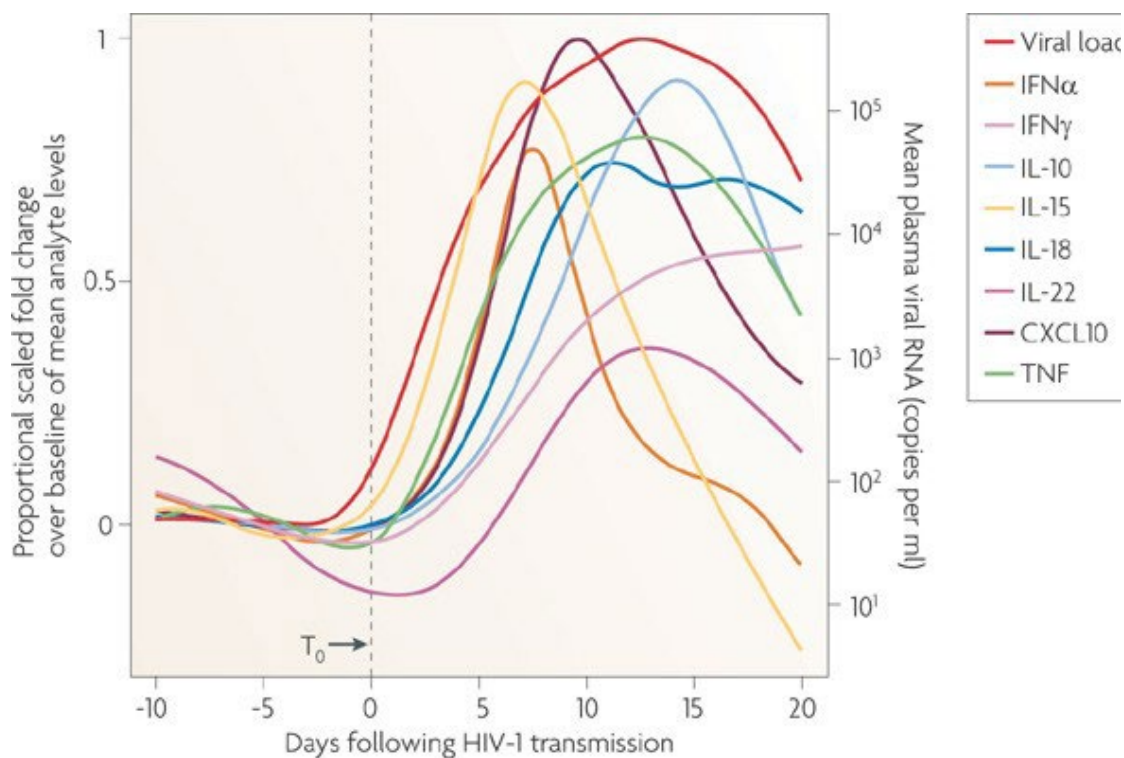
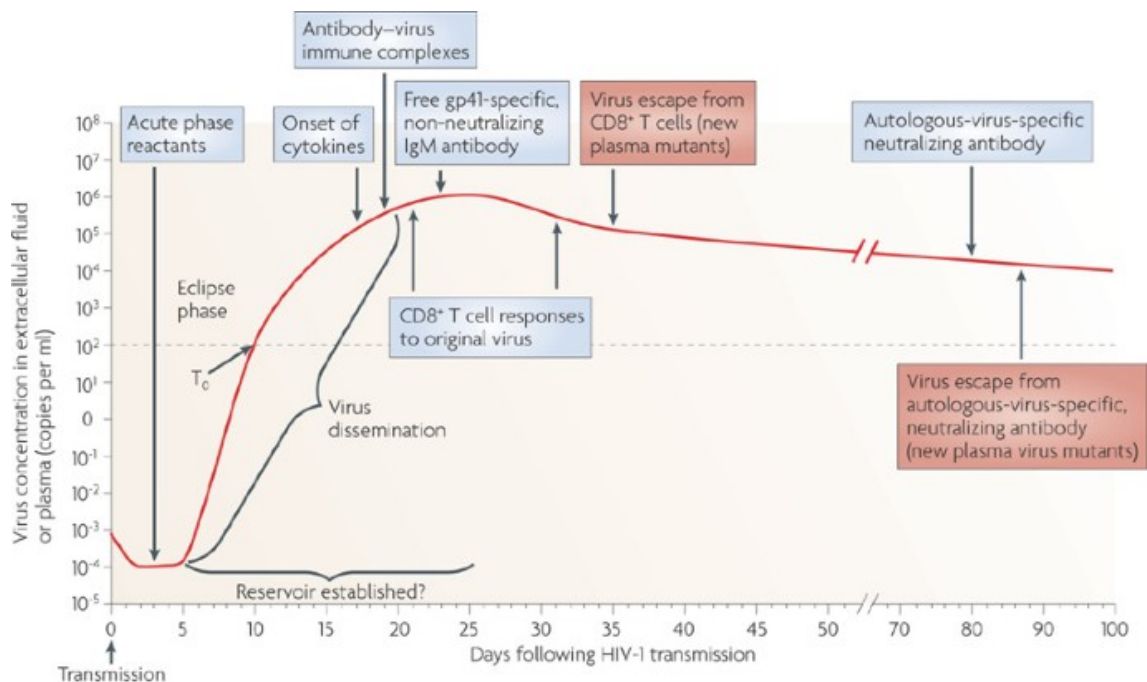


Figura 9. Cinética de la elevación de las proteínas de fase aguda en la infección por VIH: Al inicio de la infección tiene lugar un incremento rápido de IL-15, IFN α y CXCL10, seguido de una elevación de TNF, IL-18 y por último IL-10 y IL-22. Imagen extraída de McMichael et al. 2009. [74]

A las 3 semanas de la infección aguda, tiene lugar el pico de viremia, en el que se detecta un único virus fundador, sin variantes, y se forman inmunocomplejos de virus-anticuerpo, detectándose anticuerpos no neutralizantes anti gp41 tipo IgM e IgA, que no son efectivos para controlar la

infección por VIH ni seleccionan mutaciones de escape [75]. Tras 1-2 semanas de este pico, ocurre un pico de respuesta de células T hacia el virus inicial, en el que se pueden detectar linfocitos T-CD8⁺ citotóxicos (**Figura 11**). Estos linfocitos T-CD8⁺ producen la muerte de las células infectadas por VIH, y contribuyen al descenso de la viremia, siendo un factor imprescindible para el *viral set point* (punto en el que la viremia se hace estable) [65]. Sin embargo, esta respuesta es tardía e insuficiente y, a largo plazo su respuesta como células de memoria es reducida y disfuncional. Las 12-20 semanas siguientes, ocurre un descenso progresivo de la viremia, espacio temporal en el que el virus se diversifica y aparecen mutaciones de escape viral [74]: el virus produce mutaciones en los epítomos que identifican los T-CD8⁺, de modo que estos nuevos mutantes no son detectados por los T-CD8⁺ y escapan al sistema inmune. A medida que ocurre la selección de virus mutantes, disminuye la respuesta T específica y hay un agotamiento de células T específicas, caracterizado por un aumento de expresión de PD-1 (*Programmed Death-1*).



Nature Reviews | Immunology

Figura 10. Gráfica de las primeras respuestas inmunes innatas y adaptativas tras la infección por VIH: La primera respuesta inmune detectable es la elevación de las concentraciones plasmáticas de proteínas de fase aguda, incluso en la fase de eclipse cuando la replicación viral está limitada a las mucosas. Cuando el virus es detectado en plasma por primera vez (T_0) se observa una elevación de citoquinas plasmáticas. Los primeros días de la infección también se establece el reservorio viral. A los pocos días, la viremia plasmática sigue aumentando, y es cuando se detectan los primeros complejos de anticuerpos-virus. La expansión de células T-CD8⁺ específicos inicia antes del pico de viremia, seguido por la detección de anticuerpos no neutralizantes IgM contra la glicoproteína gp41. El escape viral de mutantes suele ocurrir aproximadamente a los 10 días de la expansión de células T-CD8⁺. Los anticuerpos neutralizantes se detectan en torno a los 80 días tras la infección, antes de que establezca el *set point* viral. Las semanas siguientes emergen los mutantes de escape viral de los anticuerpos. Imagen extraída de McMichael et al. 2009. [74]

Aproximadamente a las 12 semanas ocurre la producción de anticuerpos neutralizantes y se da la seroconversión. En aproximadamente el 20% de los pacientes se producen anticuerpos ampliamente

neutralizantes, capaces de neutralizar varios subtipos de VIH. La acción de estos anticuerpos deriva en la sustitución de virus sensibles por virus resistentes que escapan al sistema inmune. Estos virus presentan mutaciones sobre todo en el gen *Env*, y su envuelta se encuentra más glicosilada [76]. Los anticuerpos neutralizantes se han empleado como diana en el desarrollo de las vacunas, sin poder obtener una terapia eficaz a día de hoy.

Al iniciar el TAR y alcanzar la supresión virológica, hay una mejoría en la respuesta inmune innata tanto cuantitativa como cualitativa: hay un aumento de células T-CD4⁺, una disminución de células T-CD8⁺ VIH específicas y una mejoría en su funcionalidad.

2.2. Respuesta inmune discordante

Tal y como se ha mencionado en los apartados anteriores, en la historia natural de la infección por VIH ocurre una destrucción progresiva de células T-CD4⁺ a lo largo de los años, hasta alcanzar el dintel crítico de <200 células/ μ l. Llegados a este punto, aparecen las infecciones oportunistas y otras patologías asociadas al VIH, y finalmente la muerte. Desde que se han desarrollado diversas terapias antirretrovirales, la morbimortalidad por VIH se ha reducido considerablemente. El TAR consigue controlar la replicación viral, obteniendo una correcta supresión virológica y por consiguiente un aumento de los recuentos de células T-CD4⁺ y mejoría de su funcionalidad. Sin embargo, hasta un tercio de los pacientes no consiguen recuperar los niveles de T-CD4⁺ a pesar de una correcta supresión virológica. Estas personas son denominadas inmunológicamente no recuperadores o no respondedores (INR), y suponen un reto para la comunidad científica.

Los pacientes bajo supresión virológica que no recuperan los niveles de CD4⁺ tienen mayor riesgo de progresión clínica que los pacientes con una correcta recuperación inmune, pudiendo desarrollar tanto eventos definitorios de SIDA o neoplasias asociadas al VIH, como complicaciones no relacionadas con el VIH (Síndrome metabólico (SM), enfermedad hepática, cardiovascular, neoplasias no relacionadas con VIH y alteraciones neurocognitivas asociadas con el VIH) [77,78] y muerte [79,80]. El riesgo de muerte disminuye a lo largo del tiempo que el paciente se encuentre en supresión virológica: el riesgo es mayor los primeros 6 meses, pero disminuye un 65% por año de supresión virológica [81]. Por otro lado, la propia infección por VIH acelera la inmunosenescencia, dado lugar a características fisiológicas que en otras condiciones se relacionan con los ancianos, como pueden ser la osteoporosis, aterosclerosis, deterioro cognitivo y fragilidad, además de generar un entorno de inflamación crónica [82]. Esto pone de manifiesto la necesidad de identificar correctamente a estos pacientes y monitorizarlos estrechamente. Además, será necesario conocer detalladamente los mecanismos implicados en la pobre respuesta inmune para poder desarrollar biomarcadores predictivos y estrategias dirigidas a estas dianas que puedan mejorar la recuperación de CD4⁺ y su funcionalidad. Es conocido que los valores de células T-CD4⁺ al inicio del TAR son un factor decisivo en cuanto a la recuperación de T-CD4⁺ y predicen la posibilidad de eventos SIDA y muerte (8) (Figura). Es decir, los pacientes que inicien TAR con niveles más bajos de CD4⁺, tienen mayor probabilidad de no obtener una recuperación inmune satisfactoria. Por este motivo, se han diseñado estudios que analizan la eficacia y seguridad de iniciar TAR de forma temprana mediante la estrategia *test and treat*, antes de que haya un descenso significativo de los CD4⁺. Así, los estudios STAT [83,84] y FAST [85] han analizado los dos regímenes de tratamiento preferentes en el momento de la redacción de la presente tesis (DTG/3TC [Dovato©] y BIC/TAF/FTC [Biktarvy©] respectivamente) para un inicio precoz del TAR con resultados favorables. En este sentido, las políticas asistenciales están siendo dirigidas hacia un abordaje *test and treat*. Cabe decir que para llegar a este punto, en primera instancia se debe potenciar la realización de pruebas diagnósticas de VIH para evitar los diagnósticos tardíos (DT). El 46.8% de los casos de VIH diagnosticados en España

en 2020 fueron DT [86] (se tomó como definición de DT un recuento de T-CD4+ al diagnóstico <350 células/ μ l).

Según diversos estudios, tras iniciar el TAR, el aumento del recuento de T-CD4⁺ suele ser bifásico: En una primera fase que sucede los primeros 3-6 meses [87], hay un incremento rápido, debido a la liberación de células CD4 de memoria de los tejidos linfoides y una reducción de la activación de células T. En una segunda fase que dura aproximadamente 4-6 años, hay un lento aumento, basado en la producción tímica de linfocitos T-CD4 naïve y de memoria [88]. En cuanto al régimen de TAR empleado, los estudios disponibles no han observado diferencias significativas en la recuperación de T-CD4⁺ entre diferentes pautas.

La prevalencia de pacientes INR varía desde el 10% al 40% en función a la cohorte analizada y la definición escogida ya que no existe una única definición de respuesta inmune discordante. En la literatura existente, se han empleado diversos criterios, teniendo en cuenta los valores absolutos de T-CD4⁺, la ganancia de CD4⁺ y el tiempo de recuperación [89,90]. En una revisión sistemática, se detectaron 22 términos y hasta 73 definiciones de INR, lo que hace difícil la unificación de una sola definición [89].

A continuación, se muestra una tabla (**Tabla 1**) que recoge diversas definiciones de INR e inmunológicamente respondedores (IR) con el objetivo de ilustrar la heterogeneidad en las definiciones.

Definition of "immunological nonresponder"	Definition of "immunological responder"
Total CD4 ⁺ T-cell count < 500 cells/ μ l at 2-12 years after ART initiation, with an undetectable plasma VL. ^a	Total CD4 ⁺ T-cell count > 500 cells/ μ l at 2-12 years after ART initiation, with an undetectable plasma VL.
Increase in the CD4 ⁺ T-cell count < 200 cells/ μ l from baseline at 7 years after ART initiation, with plasma HIV RNA < 200 copies/ml.	Increase in the CD4 ⁺ T-cell count > 500 cells/ μ l from baseline at 7 years after ART initiation, with plasma HIV RNA < 200 copies/ml.
Increase in the CD4 ⁺ T-cell count < 20% from baseline and/or CD4 ⁺ T-cell counts < 200 cells/ μ l at 1-3 years after ART initiation, with plasma HIV RNA < 50 copies/ml.	Increase in the CD4 ⁺ T-cell count > 20% from baseline and/or CD4 ⁺ T-cell counts > 200 cells/ μ l at 1-3 years after ART initiation, with plasma HIV RNA < 50 copies/ml.
Increase in the CD4 ⁺ T-cell count < 100 cells/ μ l from baseline at 1 year after ART initiation, with plasma HIV RNA < 50 copies/ml.	Increase in the CD4 ⁺ T-cell count > 100 cells/ μ l from baseline at 1 year after ART initiation, with plasma HIV RNA < 50 copies/ml.
Increase in the CD4 ⁺ T-cell count < 50 cells/ μ l from baseline at 3-9 months after ART initiation, with an undetectable plasma VL.	Increase in the CD4 ⁺ T-cell count > 50 cells/ μ l from baseline at 3-9 months after ART initiation, with an undetectable plasma VL.
Total CD4 ⁺ T-cell count < 200 cells/ μ l at 2 years after ART initiation, with an undetectable plasma VL.	Total CD4 ⁺ T-cell count > 500 cells/ μ l at 2 years after ART initiation, with an undetectable plasma VL.
Increase in the CD4 ⁺ T-cell count < 200 cells/ μ l from baseline at 1 year after ART initiation, with plasma HIV RNA < 50 copies/ml.	Increase in the CD4 ⁺ T-cell count > 200 cells/ μ l from baseline at 1 year after ART initiation, with plasma HIV RNA < 50 copies/ml.
Total CD4 ⁺ T-cell count < 350 cells/ μ l at 2 years after ART initiation, with plasma HIV RNA < 50 copies/ml.	Total CD4 ⁺ T-cell count > 400 cells/ μ l at 2 years after ART initiation, with plasma HIV RNA < 50 copies/ml.
Total CD4 ⁺ T-cell count < 350 cells/ μ l and/or increase in the CD4 ⁺ T-cell count < 30% from baseline at 1-10 years after ART initiation, with an undetectable plasma VL.	Total CD4 ⁺ T-cell count > 350 cells/ μ l and/or increase in the CD4 ⁺ T-cell count > 30% from baseline at 1-10 years after ART initiation, with an undetectable plasma VL.
Total CD4 ⁺ T-cell count < 500 cells/ μ l and CD4/CD8 ratio < 1 at 8 years after ART initiation, with plasma HIV RNA < 50 copies/ml.	Total CD4 ⁺ T-cell count > 900 cells/ μ l and CD4/CD8 ratio < 1 at 8 years after ART initiation, with plasma HIV RNA < 50 copies/ml.
Increase in the CD4 ⁺ T-cell count < 400 cells/ μ l from baseline at 5 years after ART initiation, with an undetectable plasma VL.	Increase in the CD4 ⁺ T-cell count > 400 cells/ μ l from baseline at 5 years after ART initiation, with an undetectable plasma VL.
Total CD4 ⁺ T-cell count < 350 cells/ μ l at 2 years after ART initiation, with an undetectable plasma VL.	Total CD4 ⁺ T-cell count > 500 cells/ μ l at 2 years after ART initiation, with an undetectable plasma VL.
Total CD4 ⁺ T-cell count < 400 cells/ μ l at 2 years after ART initiation, with plasma HIV RNA < 20 copies/ml.	Total CD4 ⁺ T-cell count > 600 cells/ μ l at 2 years after ART initiation, with plasma HIV RNA < 20 copies/ml.
Total CD4 ⁺ T-cell count < 250 cells/ μ l at 2-3 years after ART initiation, with an undetectable plasma VL.	Total CD4 ⁺ T-cell count > 250 cells/ μ l at 2-3 years after ART initiation, with an undetectable plasma VL.
Increase in the CD4 ⁺ T-cell count < 50 cells/ μ l from baseline at 1 year after ART initiation, with plasma HIV RNA < 40 copies/ml.	Increase in the CD4 ⁺ T-cell count > 100 cells/ μ l from baseline at 1 year after ART initiation, with plasma HIV RNA < 40 copies/ml.
Total CD4 ⁺ T-cell count < 270 cells/ μ l at 2 years after ART initiation, with an undetectable plasma VL.	Total CD4 ⁺ T-cell count > 270 cells/ μ l at 2 years after ART initiation, with an undetectable plasma VL.

Tabla 1. Definiciones de IR y INR. La definición adoptada en los trabajos de nuestro grupo está marcada en un recuadro rojo. Tabla extraída de Yang et al.2020 [90]

En los trabajos llevados a cabo por nuestro grupo, se ha empleado como definición el recuento total de T-CD4⁺ <250 células/ μ l bien tras 48 semanas (1 año) [91] o 144 semanas (3 años) [92] de iniciar el TAR, siempre que se encuentren virológicamente suprimidos (marcado en recuadro rojo en la tabla).

2.2.1. Mecanismos implicados en la respuesta inmune discordante

Hasta el momento actual, los mecanismos implicados en una pobre respuesta inmune no han sido dilucidados completamente. Estos mecanismos son múltiples y complejos, por lo que ninguno de ellos es capaz de justificar la disfunción inmune por sí solo [90]. Entre estos mecanismos se encuentran las características tanto del virus como del huésped, junto con diversas vías moleculares. Conocer y comprender los procesos implicados en la respuesta inmune es de vital importancia para detectar biomarcadores que predigan una pobre respuesta inmune y diseñar y desarrollar nuevas estrategias terapéuticas.

Tradicionalmente, se han relacionado con una respuesta inmune discordante, factores como la edad avanzada, el sexo masculino, el tiempo transcurrido desde la infección por VIH hasta el inicio del TAR, la coinfección por VHC (Virus de la hepatitis C) [93,94] y el nadir de T-CD4⁺.

El recuento de T-CD4⁺ de una persona en un momento puntual, es el resultado de la producción, destrucción y el tráfico entre la sangre y el tejido linfóide [95]. Por tanto, si aumenta la destrucción de CD4⁺ y disminuye su producción, habrá un descenso en el recuento de CD4. En el caso de los INR, hay un aumento del *turnover* de los T-CD4⁺, y probablemente una distribución distinta de las células entre la sangre y el tejido linfático. Los mecanismos implicados en esta pobre respuesta inmune se explican detalladamente a continuación.

- **Generación de T-CD4⁺**

La producción de linfocitos T se inicia en la médula ósea (MO), y posteriormente maduran en el timo [96]. Por consiguiente, es necesaria una médula ósea funcional para una correcta timopoyesis y recuperación inmune [95].

- Médula ósea y progenitores hematopoyéticos:

El origen de los linfocitos T está en las células progenitoras CD34⁺ (HPC de sus siglas en inglés *hematopoietic progenitor cells*) que se relacionan con el recuento total de TCD4⁺, y de células madre hematopoyéticas (HSC de sus siglas en inglés *hematopoietic stem cells*). Los recuentos de células CD34⁺ se relaciona con los recuentos de TCD4⁺. Algunos estudios han demostrado que algunas células CD34⁺ pueden expresar receptores de CD4 junto con CXCR4 o correceptor CCR5, lo que las hace susceptibles a la infección por VIH [97]. También se ha visto que el VIH puede afectar a múltiples subtipos de HPCs CD34⁺ de la médula ósea, estableciendo reservorios de células latentes [98]. Además, el aumento de la expresión de Fas y Fas ligando, contribuye a la depleción apoptótica de CD34⁺ HPC y a la disminución de la producción de células T-CD4⁺ naïve [99]. Algunos estudios han objetivado que los pacientes con VIH tienen menos precursores funcionales y menos capacidad de formar colonias [100], y que en la progresión de la enfermedad hay un descenso de HPCs CD34⁺ y linfocitos maduros, que podría estar relacionado con un descenso en la producción de distintos linajes de linfocitos secundario a una disfunción de la MO [101].

Esto apoya la idea de que la MO y los HPC son esenciales en la recuperación inmune, y que una disfunción de los mismos contribuye a una recuperación inmune incompleta.

- Timo:

Como se ha mencionado previamente, las células T que se originan en la MO, migran al timo y es ahí donde maduran hasta convertirse en células CD4⁺. Por tanto, el timo es una pieza clave en la producción de CD4⁺ y consiguientemente, en la recuperación inmune.

Las biopsias de timo son un método invasivo, y las tomografías computarizadas (TC) no son prácticas ni económicas. Por este motivo, para estudiar su funcionalidad, se emplea un método indirecto que cuantifica las células *T-cell receptor excision circles* (TRECs) o *recent thymic emigrants* (RTEs). Los TRECs son fragmentos de DNA que no se repican durante la división celular, por lo que a mayor número de células CD4 inmaduras, mayor contenido de TRECs [95]. Las células T que migran del timo a la periferia, se denominan RTEs [102], y tras una posterior maduración, son clasificados como células T naïve. Así, el recuento de TRECs, RTEs y de células naïve es una medición indirecta de la producción tímica.

El volumen del timo es un predictor independiente de la recuperación de T-CD4⁺, y este volumen se relaciona directamente con el contenido de TREC CD4⁺, CD4⁺ naïve y CD4⁺ total. Los pacientes con un mayor volumen de timo presentan una mejor recuperación inmune [103,104]. Con la edad, existe una disminución significativa del tamaño y de la funcionalidad del timo, y las células naïve comienzan a ser generadas principalmente mediante proliferación [105]. Los RTEs expresan el marcador de superficie *platelet endothelial cell adhesion molecule-1* (PECAM-1) también conocido como CD31. La proliferación conlleva una pérdida de CD31 y un menor recuento de TREC, por lo que las células naïve de las personas

de mayor edad, tienen una menor proporción de CD31 y recuentos de TRECs, aunque en las personas adultas se mantiene una mínima producción tímica, sobre todo en situaciones de linfopenia, como puede ser el VIH [106].

Tras el inicio del TAR, tiene lugar una mejoría de la función tímica, y el número total de células naïve aumenta y disminuye la proliferación [107,108], lo que indica la importancia de iniciar el TAR de una manera temprana. Sin embargo, a pesar del cumplimiento de TAR durante largos periodos de tiempo (hasta 7 años), en raras ocasiones se llega a normalizar el recuento de CD4⁺ a niveles previos a la infección [109]. De hecho, en los INR se ha visto que los valores de TRECs CD4⁺, sjTREC y sj/βTREC están disminuidos en comparación a los recuperadores, lo que se traduce en una disminución del recuento de CD4⁺RTEs y CD4⁺ naïve. Además, tienen una mayor proliferación periférica como compensación a la timopoyesis alterada, detectada por el marcador Ki67.

En conclusión, la función tímica es vital para la producción de células T y para alcanzar una recuperación inmune óptima.

○ Citoquinas:

La interlequina-7 (IL-7) es clave en la homeostasis de las células T y la posibilidad de respuesta a IL-7 viene dada por su receptor IL7R (formado por una cadena común y [CD132] y una cadena específica α [CD127]), que se encuentra en la mayoría de las células T maduras [110]. Además, IL-7 es un modulador de la homeostasis de las células T periféricas, participando en su supervivencia, proliferación sin perder el fenotipo naïve, y producción de novo [110]. La IL-7 se produce en células estromales de órganos linfoides primarios y secundarios, como células estromales de la MO, células tímicas epiteliales, células fibroblásticas reticulares y células del endotelio linfático. Es sabido que existe una correlación negativa entre los valores circulantes de IL-7 y el recuento de células CD4⁺. Por eso, los pacientes con VIH tienen niveles elevados de IL-7 y niveles bajos de IL-7R y en concreto de CD127 en comparación con controles sanos [111,112]. La expresión de CD127 en células CD4⁺ es un predictor de la respuesta tímica tras dos años de TAR [113]. Tras el inicio del TAR, los INR muestran un aumento de la producción y niveles circulantes de IL-7 [114,115] y una disminución de la expresión de IL-7R [114], como respuesta a la necesidad de aumentar la producción de T-CD4⁺. Además, la reducción de la expresión de CD127 causada por la infección por VIH se recupera parcialmente tras la introducción del TAR, aunque los INR muestran una recuperación más reducida, principalmente en los compartimentos de memoria. Esto conlleva una peor capacidad homeostática de regeneración del repertorio de células T, y por último a una respuesta inmune discordante. Ha de tenerse en cuenta también, que los distintos polimorfismos genéticos que se puedan encontrar en el eje IL-7/IL-7R pueden influir en la producción de células T-CD4⁺ como respuesta al TAR [116]. Además de la IL-7, que es la citoquina principal en la homeostasis de las células T, otras citoquinas también juegan un papel importante en la recuperación inmune, como pueden ser la IL-2, la IL-15, la IL-1 o la IL-6. La IL-2 y la IL-15 son citoquinas reguladoras de la proliferación, activación y diferenciación de células T [117], y en el caso de los INR la producción de IL-2 se encuentra disminuida [118]. La IL-1 y la IL-6 inducen atrofia tímica y fibrosis de los tejidos linfoides, lo que aumenta el *turnover* de las células T-CD4⁺ y disminuye la capacidad de respuesta a IL-7 por disminuir la expresión de IL-7R [119], traduciéndose finalmente en una timopoyesis reducida.

La importancia de estas citoquinas es tal, que se han estudiado IL-2, IL-7 y IL-15 en sus formulaciones recombinantes humanas (rh) como posibles dianas terapéuticas en INR [120,121] con el objetivo de expandir la respuesta de T-CD4⁺ y así optimizar la respuesta

inmune. Sin embargo, los resultados de los estudios llevados a cabo no han sido los esperados y de momento, no se contempla ninguna de estas estrategias para la práctica clínica.

- **Destrucción de T-CD4⁺**

- **Receptores coinhibitorios:** Los receptores coinhibitorios o ICR (*immune checkpoint receptors*) tienen un rol vital en la regulación de la respuesta al VIH. Estos ICR son PD-1, *cytotoxic T lymphocyte-associated protein 4* (CTLA-4), *T cell immunoglobulin and ITIM domain* (TIGIT), *T cell immunoglobulin and mucin domain-containing molecule-3* (Tim-3), *lymphocyte activation gene-3* (Lag-3) y 2B4 (CD244) (90). En el VIH, la sobreexpresión de los ICR se relaciona con la depleción de células T y en consecuencia con la progresión de la enfermedad [122], ya que los niveles de ICR tienen una correlación negativa con el recuento de T-CD4⁺ y la ratio CD4/CD8 y una correlación positiva con la CV. Además, los ICR participan en el establecimiento y mantenimiento de reservorios virales, que son uno de los obstáculos para la cura de VIH [123]. Al iniciar el TAR disminuye la expresión de ICR, lo que se traduce en un aumento de la proliferación y funciones efectoras de T-CD4⁺ y T-CD8⁺ [124]. Se han visto niveles más elevados de PD-1 en los CD4⁺ de los INR que en IRs, y que la expresión de PD-1 en los CD4⁺ se correlacionaba negativamente con los recuentos de T-CD4⁺ [125]. También vieron que la ciclicidad de los CD4⁺ (caracterizada por la expresión de Ki-67⁺) y la tasa de desgaste de CD4⁺ eran más altos en los INRs. La proliferación intensiva inducida por la linfopenia, se relaciona con el desgaste de células T-CD4⁺ y con una pobre recuperación inmune [126]. En resumen, el desgaste de CD4⁺ inducido por los ICR, es un factor clave en la respuesta inmune incompleta.
- **Activación inmune:** La activación inmune (AI) puede ser una respuesta normal del organismo a ciertas infecciones, en un intento de luchar contra la infección. Sin embargo, en el VIH hay una AI desmesurada que se relaciona con la progresión de la enfermedad y tiene un valor pronóstico [127]. Se caracteriza por la adquisición de un fenotipo activado por las células inmunes innatas y adaptativas y la secreción de mediadores inflamatorios solubles como IFN- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF, TGF- β , sCD14, sCD163, MIP-1 β , MIP-1 α , RANTES y IP-10. Los factores que mantienen la AI son múltiples, como por ejemplo la replicación de virus residual, proliferación homeostática como respuesta a la depleción de CD4⁺, disfunción de células T reguladoras (Treg) translocación de microbiota intestinal, estimulación antigénica, y coinfección (92). El TAR reduce significativamente la inflamación y la AI, pero no consigue normalizarlo del todo, siendo la AI y la apoptosis mayor en los INR que en los IR [114,118,128]. Los INR tienen porcentajes mayores de T-CD4⁺ y T-CD8⁺ activados, (medido como CD38⁺), y la activación de estas células se relaciona con una mayor muerte celular, ya que las células activadas son más propensas a sufrir apoptosis [129]. Este es otro de los mecanismos que impiden una correcta recuperación inmunológica.

Varios estudios han demostrado que la AI persistente se relaciona con una menor ganancia de T-CD4⁺: en los primeros 3 meses de TAR por cada 5% que aumenta el porcentaje de CD4⁺ activados, hay un descenso de CD4⁺ de 45 células/ μ l y por cada 5% de aumento en el porcentaje de CD8⁺ activados, hay un descenso de CD4⁺ de 35 células/ μ l [130], que pone de manifiesto una correlación inversa entre los recuentos de CD4⁺ y CD8⁺ activados y el recuento total y la recuperación de CD4⁺ tras el inicio del TAR [131]. Los niveles plasmáticos de sCD14 y sCD163 se relacionaron positivamente con los niveles de CD4⁺ y CD8⁺ activados, y estos a su vez con una pobre recuperación inmune. Los INR también tienen una mayor frecuencia de activación de otros tipos celulares, como los

monocitos y las células dendríticas o los NK. La respuesta de *HIV-Specific monocyte plasma IFN-inducible protein-10* (CXCL10 también conocido como IP-10), marcador de activación monocítica, se asoció negativamente con la ganancia futura de CD4⁺ [132], y se objetivó también que los INR tenían mayores niveles de CXCL10. En cuanto a los NK, se observó una correlación inversa entre los NK activados y los recuentos de T-CD4⁺ periféricos y que, mediante efectos citotóxicos, los NK de los INR podían inducir la muerte de los CD4⁺ no infectados [133]. Finalmente, cabe destacar que los INR tienen mayor frecuencia de células CXCR4 trópicos, y estos virus pueden desencadenar una activación persistente de células T, y apoptosis mediante la interacción de gp120-CXCR4, resultando en una depleción de células T naïve. Esto puede sugerir que la dominancia del correceptor puede tener importancia en la recuperación inmune, ya que la destrucción tímica se ha asociado con los virus X4 [134].

Es importante resaltar que existen ciertos subtipos de células T que también juegan un papel importante en la activación inmune. Por un lado, están las células *T helper 17* (Th17), que tienen una capacidad proinflamatoria, y por otro lado están las células T reguladoras (Tregs), con capacidad antiinflamatoria. Los Tregs al ser también células CD4⁺, son susceptibles a la infección por VIH y en consecuencia, sus niveles disminuyen conforme la enfermedad progresa. No obstante, al iniciar el TAR sus niveles aumentan y se mantienen elevados [135,136]. Tienen un papel inmunosupresor: participan en la tolerancia a autoantígenos [137] y suprimen la activación de células T. Este aspecto se podría interpretar como una función favorable, ya que regularía la AI crónica, pero podría tener efectos negativos al disminuir las respuestas específicas al VIH.

En cambio, los Th17, tienen una función proinflamatoria y aunque comparten vías de maduración, tienen efectos opuestos. En la infección aguda por SIV, hay una rápida depleción de Th17, lo que provoca una pérdida del equilibrio entre Tregs y Th17 y una mayor AI, y este desequilibrio es mayor en INR [138]. Esto pone de manifiesto que es imprescindible un balance óptimo entre efectos proinflamatorios y efectos antiinflamatorios.

En conclusión, la activación inmune y la activación específica de CD4⁺, CD8⁺, monocitos, células dendríticas y NK, tiene un efecto deletéreo en la recuperación inmune y juega un papel fundamental en la pobre respuesta inmune.

- Apoptosis y senescencia: Las células pueden sufrir un número limitado de replicaciones, hasta que finalmente caen en la senescencia inmunológica. Como se ha mencionado en los apartados anteriores, en la infección por VIH existe un *turnover* elevado, por lo que este hecho cobra una vital importancia. En la replicación celular, se da un acortamiento de los telómeros, que inicialmente es compensado por la enzima telomerasa. En los pacientes con VIH, se ha demostrado que los telómeros son más cortos y que existe una disfunción de la enzima telomerasa [139]. Los telómeros cortos pueden provocar inestabilidad cromosómica, lo que conlleva una detención del crecimiento y apoptosis. En consecuencia, los pacientes con VIH tienen mayores tasas de apoptosis [140] y las células CD4⁺ apoptóticas son más prevalentes en aquellos pacientes con recuentos de CD4⁺ <500 células/ μ l [129,140,141]. La relación entre la senescencia y la pobre respuesta inmune se ve reflejada por el marcador PD-1, detallado en el apartado de receptores coinhibitorios. Los INR tienen mayores niveles de PD-1 comprado con IR.
- Translocación microbiana y desequilibrio de la flora intestinal: En la fase temprana de la infección, tiene lugar una depleción masiva de células CD4⁺, sobre todo células Th17 y Th22, que juegan un papel esencial en el mantenimiento de la integridad del colon. La

infección por VIH también se ha asociado con el daño en la barrera epitelial, caracterizado por atrofia vellosa, apoptosis de enterocitos, hiperplasia de criptas, disminución de la expresión de las proteínas de la unión, y aumento en la inflamación gastrointestinal, lo que contribuye a un aumento de la permeabilidad intestinal [142,143]. Esto finalmente resulta en una alteración de la composición de la microbiota intestinal (disbiosis) y liberación de productos bacterianos en la circulación (translocación microbiana), dando lugar a una activación inmune e inflamación crónicas [144,145]. Por tanto, la translocación de productos microbianos del intestino a la circulación sanguínea se relaciona con la AI y provoca una depleción de $CD4^+$. Además, la infección por VIH se asocia con un descenso de la diversidad microbiana del intestino, tanto al diagnóstico como tras el inicio de TAR, comparado con controles sanos [143]. De lo contrario, el aumento de número de especies microbianas, se relaciona con un aumento de $CD4^+$. Si nos centramos en el tipo de microorganismos concretos, las personas con VIH tienen una disminución de *Bacteroides* y un aumento de *Prevotella*, que se relaciona positivamente con niveles de IP-10 y sCD14, así como $CD4^+$, $CD8^+$ y células dendríticas activadas [146]. Como ya se ha mencionado en los apartados previos, el porcentaje de células activadas tiene una correlación negativa con los recuentos totales de $CD4^+$. Los INR tienen un mayor número de *Fusobacterium*, también relacionado con una mayor activación de $CD4^+$, y de *Faecalibacterium rausnitzii* y *Coprococcus comes*. De lo contrario, los *Lactobacillales* se han relacionado con una menor translocación bacteriana, menor AI y por lo tanto, un mayor porcentaje de $CD4^+$, además de poder regular la respuesta inflamatoria y participar en el mantenimiento de la integridad de la barrera mucosa intestinal. Por último, el uso prolongado de inhibidores de la bomba de protones (IBP) se ha asociado con una mayor translocación microbiana, activación de la inmunidad innata y pobre reconstitución inmune en pacientes con TAR [147].

- Coinfección: Algunos estudios han descubierto que la coinfección por el VHC [148], virus de la hepatitis B (VHB) [149] y el citomegalovirus (CMV) [150] pueden afectar negativamente a la recuperación inmune, aunque los factores implicados no se conocen completamente. La coinfección por VHC tiene una prevalencia del 15-30% entre los pacientes infectados por VIH. El virus de la VHC podría tener un efecto sinérgico con el VIH respecto a la activación inmune y la muerte celular, ya que el VHC se ha relacionado con la apoptosis mediada por Fas [151]. Por otro lado, la infección crónica por CMV, se ha relacionado con la senescencia, ya que la viremia de CMV y la proporción de células T específicas para CMV se han relacionado con recuentos bajos de $CD4^+$ y aumento de mortalidad [152].

Sin embargo, en algunos estudios los datos son contradictorios, lo que podría justificar que la respuesta inmune incompleta estuviera condicionada por otros factores demográficos (edad, consumo de sustancias...), inmunológicos (nadir $CD4^+$) o tiempo transcurrido hasta el tratamiento y la adherencia al mismo [153].

- Órganos linfáticos secundarios: En la infección por VIH la depleción de células $CD4^+$ ocurre tanto en el torrente sanguíneo como en los tejidos linfáticos secundarios, ganglios linfáticos, y el GALT, donde residen la mayoría de las células $CD4^+$. En la infección aguda se pierde un gran número de $CD4^+$ y en la infección crónica se pierde aproximadamente el 50% de los $CD4^+$ de los ganglios linfáticos. La estructura del tejido linfático y su función son de vital importancia en la homeostasis de las células T. Además, los tejidos linfáticos funcionan como reservorios virales, donde se encuentran las células $CD4^+$ infectadas latentes y a pesar de que en sangre se consiga la supresión viral gracias al TAR, se

mantiene una replicación viral persistente, ya que no se alcanzan las concentraciones de fármaco suficientes para inhibir la replicación viral [154]. Mientras que, en los pacientes con una correcta recuperación inmune, el DNA proviral se mantiene en las células de memoria centrales, en pacientes con peor recuperación inmune, el DNA proviral se encuentra en las células de memoria transicionales [155], lo que sugiere que el reservorio viral puede influenciar la recuperación inmune. La activación inmune y la inflamación crónica que suceden en el VIH, provocan un depósito de colágeno en la zona parafolicular, y una fibrosis del tejido linfoide reemplazando el *fibroblastic reticular cell network* (FRCn), una estructura que es clave para una función inmune normal, y produce la citoquina IL-7 [156], imprescindible para la homeostasis de células T. Múltiples estudios han demostrado que la magnitud del depósito de colágeno se relaciona de forma inversa con el tamaño de la población de CD4⁺ en el tejido linfoide y con el aumento de recuentos de CD4⁺ periféricos. A su vez, la pérdida de FRCn en el tejido linfoide predice el grado de restauración de células T naïve y el recuento total de CD4⁺ a los 6 meses de TAR [157]. Estos estudios sugieren que el depósito de colágeno y la pérdida de FRCn en el tejido linfoide limitan la magnitud de recuperación de CD4 en pacientes infectados por VIH bajo TAR de larga duración. La infección por VIH también afecta a la distribución de CD4⁺ entre la circulación sanguínea y los órganos linfáticos, causando una acumulación de células CD4⁺ y Tregs en los ganglios linfáticos y tejido linfático secundario, en lugar de en sangre periférica [158].

- **Otros factores:**

Además de los factores arriba mencionados, otros factores como mayor edad, sexo masculino, el origen étnico, nadir bajo de CD4⁺, valores bajos de ratio CD4⁺/CD8⁺, y valores bajos de ratio de células T-CD4⁺ naïve/memoria, se han relacionado con una pobre respuesta inmune al TAR. En concreto, el nadir de CD4⁺ (recuento más bajo de CD4⁺ que representa el peor estado inmunológico del paciente) se conoce como un factor predictivo de la recuperación inmune [159,160]. Conforme más bajo sea el nadir, menor es la probabilidad de una correcta recuperación inmune. Diversos estudios han demostrado que los pacientes que inician TAR con recuentos más elevados tienen una mejor recuperación inmune [161] y que el nadir bajo se relaciona con una pobre recuperación inmune como consecuencia del daño irreversible provocado por el VIH en el sistema inmune [162]. Por este motivo, se debe priorizar iniciar el TAR de manera temprana con el objetivo de evitar un daño irreparable en el sistema inmune.

- Factores genéticos del huésped: Estudios previos han demostrado que los factores genéticos del huésped pueden afectar la recuperación de CD4 durante el TAR. Los genotipos CCL3LA-CCR5 [163], polimorfismos en CD14 y TLR4 [164], haplogrupo mitocondrial H [165], y las variantes de IL18 G [166], se asociaron a un aumento de recuperación de T-CD4 a largo plazo. Algunos genotipos se han relacionado con la apoptosis, migración de linfocitos, o homeostasis de T-CD4⁺ [167]. Los genotipos rs1799864-AG de CCR2, los alelos HLA-A68 y HLA-B15, genotipo 1635AA de TLR9, polimorfismo RS1385129 del gen GLUT SLC2A1 y polimorfismos en IFN-G IL-19 se han relacionado con una pobre recuperación de CD4⁺.
- Factores metabólicos del huésped: Numerosos estudios han demostrado que un mayor índice de masa corporal (IMC) se asocia con una mejor recuperación inmune [168]. El metabolismo de la glucosa juega un papel vital en el crecimiento, proliferación y funciones efectoras de las células T. El transportador de la glucosa-1 (Glut1) su principal

transportador en las células T. Glut1 también sirve como un marcador de activación de la glicólisis. La proporción de células T-CD4⁺Glut1⁺ se correlaciona positivamente con el porcentaje de células T-CD4⁺ activadas, e inversamente con el recuento total de CD4⁺. Las células T-CD4⁺ senescentes tenían una sobrerregulación del Glut1, lo que muestra que la hiperactivación de la glicólisis en T-CD4 durante la infección por VIH facilita el agotamiento metabólico que conlleva a la depleción de T-CD4⁺. Por último, la Vitamina D también juega un papel en la regulación de la AI y la inflamación, ya que los valores suficientes de esta vitamina pueden reducir la inflamación y la activación de T-CD4⁺ y estimular la proliferación de T-CD4⁺, a través de la activación de genes y vías metabólicas que estimulan la inmunidad innata y adaptativa [169].

3 Citoquinas en la infección por el VIH

Las citoquinas son glicoproteínas de pequeño tamaño (habitualmente menores de 30 kDa) que conforman una familia grande y diversa. Aunque pueden ser producidas por cualquier célula nucleada, su producción proviene principalmente de las células Th y los macrófagos, y su función consiste en regular la respuesta inmune e inflamatoria. Pueden ejercer su acción sobre la misma célula (acción autocrina), sobre células vecinas (acción paracrina) o sobre células lejanas (acción endocrina). La unión de las citoquinas a sus receptores provoca una cascada de reacciones y respuestas intracelulares, que finalmente se traduce en una alteración de la expresión génica y un efecto biológico. Estos efectos suelen comprender la diferenciación, proliferación y activación de la célula diana, y típicamente se suelen clasificar en citoquinas proinflamatorias o antiinflamatorias.

Dentro de la denominación general de citoquinas, podemos encontrar las interleuquinas (citoquinas producidas por leucocitos y que actúan sobre otros leucocitos), quimiocinas (citoquinas con actividad quimiotáctica) y adipoquinas (citoquinas producidas por los adipocitos), entre otros [170]. Aunque en un apartado anterior se ha hablado del papel de las citoquinas como mecanismo implicado en la respuesta inmune incompleta, en este apartado se abordarán más detalladamente. La infección por VIH altera la producción de citoquinas y la capacidad de respuesta de las células T a las mismas, aumentando la replicación vírica que dificulta una recuperación inmune completa. Comprender el funcionamiento y las interacciones de estas citoquinas puede abrir un abanico de posibilidades terapéuticas, como ya sucede en distintas patologías inflamatorias y reumatológicas [171,172].

En la infección aguda por VIH, los primeros 5 días tras la detección de viremia, tiene lugar un aumento significativo de las citoquinas proinflamatorias $IFN\alpha$ y IL-15, seguido de un aumento de $TNF\alpha$, CXCL10, $IFN\gamma$, IL-7 y IL-12 [73]. Las citoquinas proinflamatorias promueven la replicación viral mediante la transcripción proviral y mediante la apoptosis promovida por las células T vecinas. El reclutamiento y la activación de células T- $CD4^+$, contribuyen a la pérdida progresiva de T- $CD4^+$ [173,174]. De forma más tardía, se da una elevación de IL-10 mRNA y IL-10, que ejerce una función antiinflamatoria [175]. Por tanto, el desequilibrio en la producción de citoquinas conlleva a una alteración de la homeostasis de las células T [176,177]. La aparición temprana de las citoquinas también juega un papel esencial en el establecimiento del *set-point* viral. Se ha visto que los niveles plasmáticos elevados de IL-7 y IL-15 durante la infección aguda pueden ser dañinos y contribuyen a un mayor *set-point* viral. De lo contrario, los niveles elevados de IL-10, IL-12 e $IFN-\gamma$ y se relacionan con un *set-point* viral más bajo [178] (**Figura 11**).

Como se ha mencionado en el apartado previo “Mecanismos implicados en la respuesta inmune discordante”, la activación inmune es esencial para generar una respuesta específica contra el VIH, pero a su vez facilita la replicación viral mediante la activación de determinadas citoquinas proinflamatorias. Por ejemplo, en este sentido, $TNF\alpha$ refuerza la inmunidad antiviral, pero induce la expresión de $NF-\kappa B$, que estimula la transcripción proviral y conlleva a la replicación viral. En el caso de IL-15, estimula las células NK y T- $CD8^+$ que son necesarias para la respuesta inmune contra el VIH, pero a la vez también se relaciona con aumento de la replicación viral. De lo contrario, el efecto antiinflamatorio de algunas citoquinas puede disminuir la respuesta específica contra el VIH, pero también hacer disminuir el número de células T- $CD4^+$ activadas susceptibles a la infección por VIH.

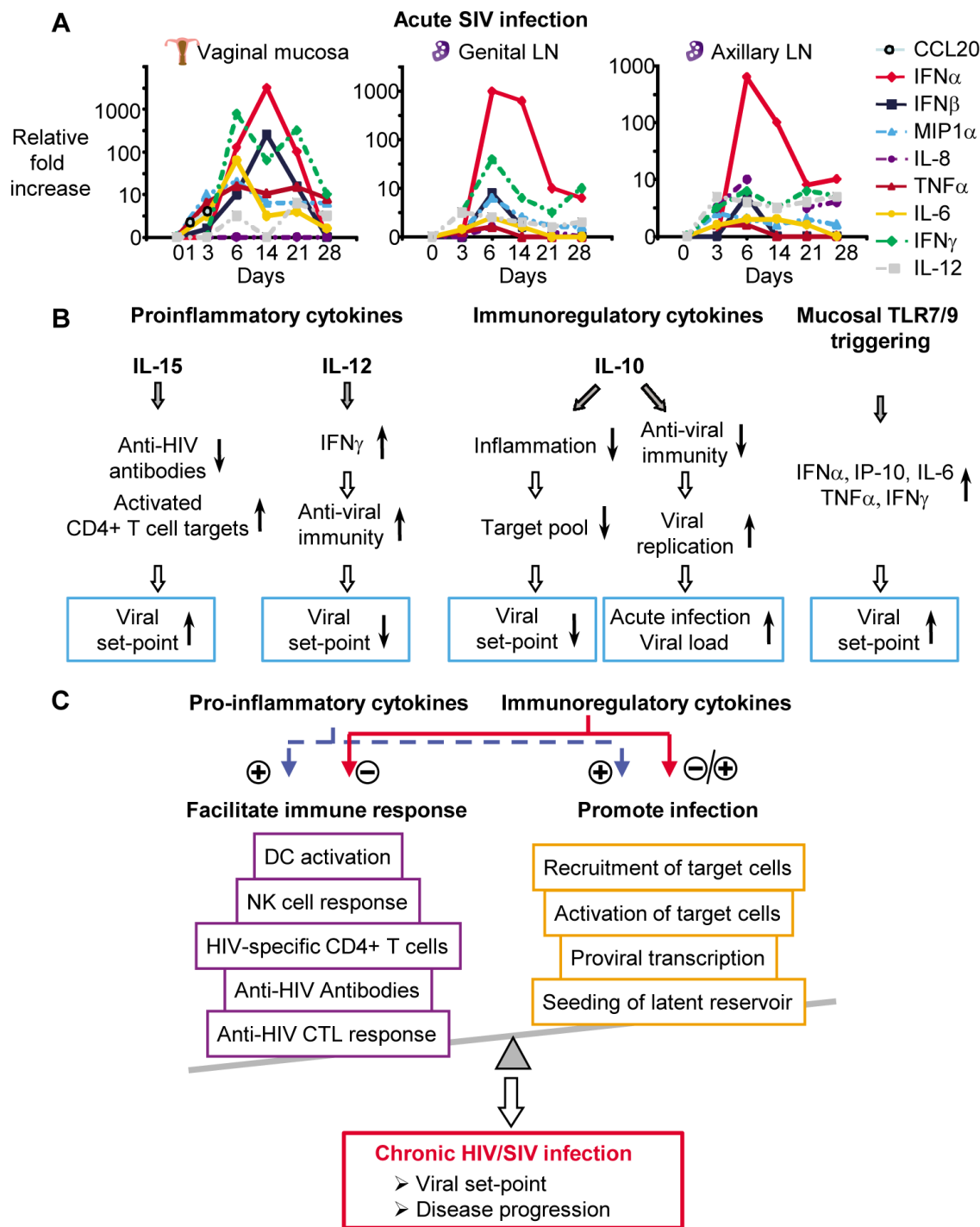


Figura 11. Efecto de las citoquinas tempranas en la patogénesis del VIH/SIV: A) En la infección por SIV se producen múltiples citoquinas tanto en el lugar de la infección como en los tejidos linfoides. B) Las citoquinas pueden aumentar (↑) o disminuir (↓) los parámetros inmunes o influir sobre su disponibilidad y, por tanto, afectar a la replicación viral y el establecimiento del *set point* viral. C) Las citoquinas proinflamatorias e inmunoreguladoras pueden modular de forma positiva o negativa la respuesta inmune y la replicación viral, lo que determinará el *set point* viral y la progresión de la enfermedad durante la infección crónica por VIH/SIV. Imagen extraída de Katsikis et al. 2011. [179]

Este doble papel anti- y proinflamatorio de las citoquinas pone nuevamente de manifiesto la importancia del equilibrio entre los factores proinflamatorios y antiinflamatorios en la respuesta del organismo a la infección por el VIH.

3.1 Quimiocinas en la infección por el VIH:

Las quimiocinas son proteínas de bajo peso molecular que pertenecen a la superfamilia de citoquinas. Las quimiocinas ejercen sus funciones biológicas mediante la unión con sus receptores, que son receptores transmembrana unidos a la proteína G (*G protein-coupled receptors*, GPCRs) [180], ubicados en la superficie de las células diana. Se han descrito 4 familias de quimiocinas: CXC, CC, XC, y CX₃C [181] y más de 20 receptores. Su función principal es regular la migración celular, y la mayoría de quimiocinas se han identificado como proinflamatorias, estando su expresión aumentada cuando existe daño tisular. Además, se han visto involucradas en múltiples procesos patológicos y fisiológicos como infecciones, angiogénesis, inflamación, crecimiento tumoral y desarrollo hematopoyético [182], por lo que se han empleado como dianas terapéuticas en múltiples enfermedades inflamatorias.

En el caso concreto del VIH, el aumento de expresión de ciertas quimiocinas y sus receptores han demostrado jugar un papel principal en ciclo vital facilitando la entrada del virus a la célula, progresión de la enfermedad mediante la inflamación crónica y establecimiento del reservorio del VIH [183].

- Entrada en la célula: Para que el virus del VIH entre a la célula, no es suficiente la unión de la glicoproteína gp120 con moléculas específicas de la superficie de CD4⁺. Es necesario que los receptores de quimiocinas CXCR4 o CCR5 actúen como correceptores para que la envuelta viral se fusione con la membrana celular. Los receptores de quimiocinas CXCR4 y CCR5 son GPCRs. El receptor CXCR4 es activado por su ligando la quimiocina CXCL12/SDF-1 (*stromal cell-derived factor 1*), implicado en la quimiotaxis, proliferación celular y supervivencia. Los ligandos naturales del CCR5 son CCL3/MIP-1 α (*Macrophage Inflammatory Protein-1 Alpha*), CCL4/MIP-1 β (*Macrophage Inflammatory Protein-1 Beta*), CCL5/RANTES (*Regulated upon Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted*), CCL8/MCP-2 (*Monocyte Chemoattractant Protein-2*), CCL11 (eotaxina), CCL14/HCC1 (*Hemofiltrate Chemokine 1*) y CCL6/HCC4 (*Hemofiltrate Chemokine 4*) [184]. CCR5 interactúa con sus ligandos para regular la quimiotaxis y la activación celular. CXCL12/SDF-1 y CCL5/RANTES, ligandos naturales de CXCR4 y CCR5 respectivamente, inhiben competitivamente la entrada del VIH a la célula (**Figura 12**).

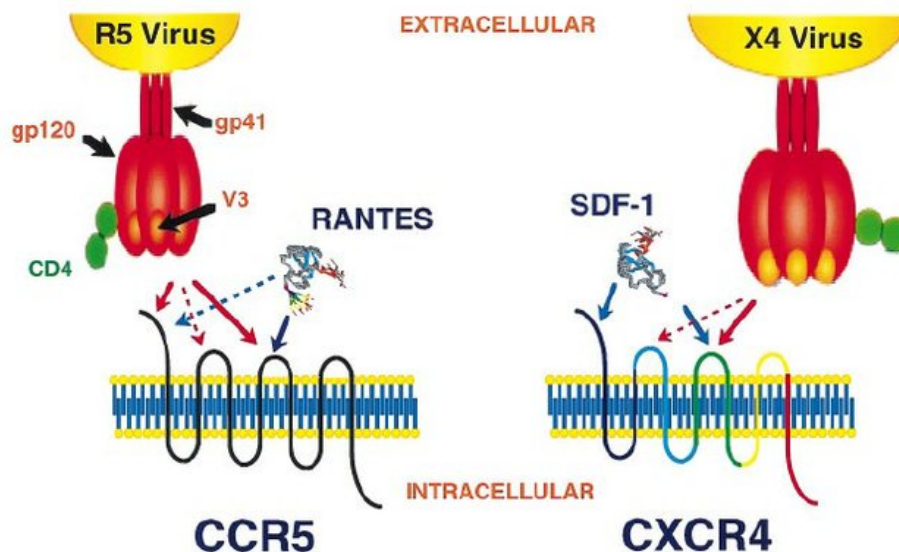


Figura 12. Tropismo de VIH: RANTES es el ligando natural de la GPCR CCR5, mientras que SDF-1 lo es para la GPCR CXCR4. RANTES impide la unión del virus R5 con su correceptor transmembrana CCR5, lo que impide el cambio de conformación de gp120 y en consecuencia la entrada del virus a la célula. Por otro lado, SDF-1 se une al correceptor CXCR4 e impide su unión con el virus X4 y la entrada del virus a la célula huésped. Imagen extraída de Lee et al. 1999, [185]

Estos hechos tienen repercusión en la clínica, ya que la ausencia de CCR5 (receptor principal para la entrada de virus CCR5 trópico o R5) impide la entrada del virus en las células, generando así una resistencia natural. De hecho, la repercusión que tenía la ausencia de CCR5 en la infección por VIH se determinó con el caso conocido como “el paciente de Berlín” quien presentó una cura funcional al VIH al recibir un trasplante de médula ósea de un donante homocigoto para la mutación genética CCR5- Δ 32, que se traduce en la ausencia de expresión de CCR5 en la superficie celular, impidiendo así la entrada del virus en la célula [186]. A partir de estos hallazgos, se han desarrollado fármacos dirigidos a bloquear CCR5, como Maraviroc y Cenicriviroc, ambos antagonistas de CCR5 [187,188]. Además, conforme avanza la infección, se modifica el tropismo viral. Inicialmente casi la totalidad de los virus son CCR5 trópicos, pero a medida que progresa la infección, aumentan los virus CXCR4-trópicos, lo que se relaciona con un peor pronóstico. Así, el correceptor CXCR4 cobra cada vez más importancia, sobre todo en la entrada del virus. Hoy en día aún no se ha desarrollado ninguna estrategia efectiva para bloquear la entrada por esta vía [189].

- **Establecimiento del reservorio/latencia:** Como se ha mencionado previamente, la latencia del VIH es un obstáculo mayor para la cura del VIH. Aunque los monocitos y algunos tejidos como el linfoide pueden actuar como reservorios, las células T-CD4⁺ de memoria son las que principalmente cumplen con esta función. Una vez establecido el reservorio viral, con las estrategias actuales resulta imposible eliminar el virus. Las quimiocinas y sus receptores juegan un papel primordial en el establecimiento del reservorio, ya que, en los momentos iniciales de la infección, antes del pico de viremia, se da una elevación de quimiocinas que promueven la entrada e integración del VIH en las células T-CD4⁺ latentes [190]. Las células T-CD4⁺ de memoria latentes que se encuentran en los tejidos linfoides secundarios y migran entre ellos son infectadas más eficientemente que las que circulan en el torrente sanguíneo [191]. Las quimiocinas CCL19 y CCL21 (ligandos de CCR7 y reguladores del tráfico de las células T hacia tejidos linfoides) son expresadas en los órganos linfoides y se han relacionado con la progresión

de la enfermedad, ya que pueden interactuar entre el VIH y las células T-CD4⁺ de memoria y potencian la entrada e integración del VIH en la célula. En los pacientes con inmunodeficiencia avanzada, se han detectado niveles séricos más elevados de CCL19, que además se relacionan con mayor mortalidad [192]. Por otro lado, las células T-CD4⁺ latentes que expresan CCR7 son el subtipo que principalmente se infecta por el VIH [193]. Las células T-CD4⁺ de memoria que expresan CXCR3 tienen mayor cantidad de DNA viral y son más permisivas en cuanto a la replicación viral [194], por lo que el CXCR3 se considera un marcador del reservorio de VIH. CCL2, producida por monocitos y macrófagos [195], es una quimiocina inflamatoria que se encuentra sobrerregulada en la infección por VIH. Además de promover la diferenciación de monocitos en macrófagos [196], induce la replicación viral en los macrófagos infectados y en los linfocitos T. Esto sugiere que la infección por VIH aumenta la expresión génica de CCL2 y su secreción, y la misma CCL2 facilita la extensión y replicación del VIH. Por otro lado, CXCL12, ligando del correceptor CXCR4, compite con gp120 de la envuelta viral para la unión. CXCL12 inhibe la infección de las células T-CD4⁺ de memoria por virus X4 (CXCR4-trópico), inhibiendo en consecuencia el establecimiento de la latencia viral.

- Inflamación crónica persistente y progresión de la enfermedad: Además de las funciones arriba mencionadas, las quimiocinas suprimen la función de las células inmunes, lo que produce una disfunción del sistema inmune y finalmente, progresión de la enfermedad. Entre las funciones principales de CXCL10 se encuentran la quimiotaxis, el crecimiento celular y la angiogénesis. En la infección por VIH, CXCL10, conocida como quimiocina inflamatoria, suprime la función de las células T [197], y al unirse a su receptor CXCR3 suprime la función de las células NK [198]. Sus niveles se encuentran elevados desde la fase temprana de la enfermedad, y se correlacionan con la progresión de la enfermedad [199] y el fracaso inmunológico al TAR [197].

En un estudio en el que se empleó CXCL10 como tratamiento, se observó un aumento de depósito de DNA viral en macrófagos y linfocitos de sangre periférica [200]. Por otra parte, la frecuencia de células T de memoria que expresaban CXCR3 y CCR6 (cuyo ligando es CCL20) se correlacionó positivamente con la concentración plasmática de CD14 soluble, un marcador de activación inmune sistémica crónica [201]. Además, la AI persistente produce un daño en la respuesta de las células Th CCR6⁺ y CXCR3⁺ a CCL20 y CCL10, lo que impide la migración de las células Th a los órganos linfoides [201]. Posiblemente, la alteración de la migración de estas células tenga su implicación en la falta de aclaramiento de VIH. Además de CXCL10, las quimiocinas CCL19 y CCL20 también se han relacionado con un RNA viral elevado y un bajo recuento de células T-CD4⁺ [202].

En conclusión, la inhibición de las quimiocinas a través de antagonistas o anticuerpos específicos puede proteger la función inmune y aumentar la capacidad del sistema inmune para controlar el virus y así evitar la progresión de la enfermedad.

3.2 Tejido adiposo y adipoquinas en la infección por el VIH: Las adipoquinas son citoquinas secretadas por los adipocitos, que ejercen una función autocrina y paracrina. En general, se clasifican como proinflamatorias o antiinflamatorias, y juegan un papel fundamental en la homeostasis de procesos inmunes y metabólicos. Recientemente, el tejido adiposo se ha identificado como un potente órgano inmune, de gran relevancia en la infección por VIH. La fracción del estroma vascular de los adipocitos es donde residen células del sistema inmune innato y adaptativo, entre las que se encuentran diferentes subtipos de células T, y monocitos que derivan en macrófagos, y neutrófilos. La infiltración de estas células contribuye a una inflamación *in situ* y una ganancia de peso progresiva. Es conocido que tanto el VIH como el TAR afectan a la cantidad y distribución del tejido adiposo [203], y se estima que hasta un 50% de PLHIV con TAR tienen alteración de la composición grasa. De hecho, algunos fármacos antirretrovirales pueden causar toxicidad mitocondrial de los adipocitos, que produce lipodistrofia, caracterizada por acumulación de grasa central (lipohipertrofia) y pérdida de grasa en nalgas y extremidades (lipoatrofia), incluso a nivel subclínico [204].

En la infección por VIH, el tejido adiposo subcutáneo sufre un cambio hacia un entorno profibrótico y proinflamatorio. Las biopsias del tejido graso subcutáneo de los pacientes con VIH han demostrado una reducción del DNA mitocondrial (mtDNA), aumento de fibrosis, descenso de apoptosis, y formación de lipogranulomas, junto con un aumento de la expresión de citoquinas proinflamatorias TNF- α y IL-6 [205,206]. La hipertrofia de adipocitos, característica de la obesidad, se acompaña de un aumento de quimiocinas MCP-1 y MIP-1 α que promueven la infiltración por macrófagos y aumentan la producción de IL-8, que a su vez promueve la quimiotaxis de los neutrófilos. Además, en las biopsias de personas obesas se ha visto un aumento del número de macrófagos residentes, y mayor polarización hacia el fenotipo proinflamatorio M1, así como un mayor número de células T-CD4⁺ y T-CD8⁺ activadas pero menor número de Tregs [207–209]. Además, las células T-CD4⁺ latentes infectadas que se han identificado en el tejido adiposo, se han propuesto como origen de la activación inmune y de la inflamación a través de la producción y diseminación de citoquinas como IL-2, IL-7 o IL-15 [210], además de actuar como reservorio.

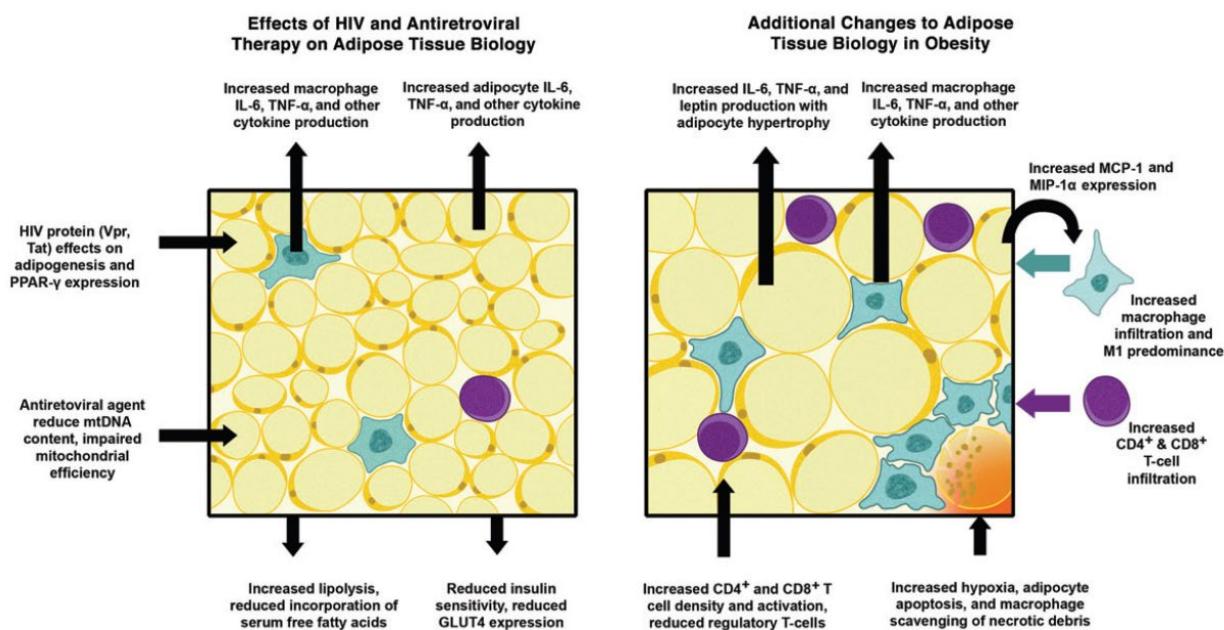


Figura 13. Efecto del VIH, TAR y obesidad en el tejido adiposo. Abreviaturas: IL-6: Interleuquina-6; MCP-1: Macrophage chemotactic protein 1; MIP-1 α : Macrophage inflammatory protein 1 α ; mtDNA: DNA mitocondrial; PPAR- γ : peroxisome proliferator activated receptor γ de Koethe et al. 2013. [211]

La composición corporal y el exceso o falta de adiposidad también han mostrado su efecto en la recuperación de T-CD4⁺. Las personas con VIH no tratadas tienen una mayor prevalencia de *wasting syndrome* que conlleva una pérdida de grasa de distribución principalmente central, que se ha identificado como factor de mal pronóstico. Por otra parte, estudios de la era pre-TAR relacionaron un mayor IMC con una pérdida más lenta de T-CD4⁺ y progresión a SIDA. Un estudio llevado a cabo por Koethe et al., detectó que en individuos INR con IMC de 25kg/m² tenían mayor probabilidad de alcanzar recuentos de T-CD4⁺ >350 células/ μ L [212]. No obstante, en la era del TAR este paradigma ha cambiado, ya que estudios recientes han objetivado que las PLHIV con obesidad tienen una menor recuperación de recuentos de T-CD4⁺ [213]. Por tanto, estos datos apuntan a que es necesario un equilibrio en la cantidad del tejido adiposo: un mínimo de cantidad de tejido adiposo es necesario para una correcta función y recuperación inmune, pero un exceso de adiposidad puede tener efectos deletéreos debido a una excesiva AI. Por tanto, podemos concluir que las adipoquinas juegan un papel fundamental en la homeostasis de los procesos inmunes y metabólicos en la infección por VIH. A continuación, se desarrollarán los efectos de las adipoquinas estudiadas en el trabajo presentado en la presente tesis.

3.2.1 Leptina, resistina, adiponectina, FABP4, RBP4, omentina, ZAG, vaspina, apelina y su receptor

De entre las adipoquinas proinflamatorias, probablemente la **leptina** sea la más conocida. Es producida por el gen de la obesidad (*ob*) en el tejido adiposo, en proporción a la masa grasa, pero también es producido en otros tejidos como estómago, músculo, placenta y médula ósea. Aumenta la producción de las citoquinas proinflamatorias TNF- α , IL-6 y IL-12 en los monocitos y los macrófagos. Promueve la proliferación de células T-CD4⁺ naïve y su polarización hacia Th1, y aumenta la expresión de los marcadores de activación de CD4⁺ y CD8⁺. De esta manera, estimula la liberación de citoquinas de tipo Th1 como el IFN- γ e inhibe la producción Th2 de IL-4 [214,215]. Por otra parte, inhibe la proliferación de Treg y la apoptosis de los timocitos.

La **resistina**, es la adipoquina que induce la resistencia a la insulina, principalmente actúa a nivel endotelial promoviendo la expresión de moléculas de adhesión y CCL2. Por otro lado, regula la respuesta inmune innata hacia un entorno proinflamatorio, aumentando la expresión de citoquinas proinflamatorias TNF- α , IL-1 β y IL-6 y quimiocinas CCL1, CCL4 y CXCL1 [216].

Como representación de las adipoquinas antiinflamatorias, se encuentra la **adiponectina**. Es producida por los adipocitos maduros pero también por células del músculo esquelético, miocitos y células endoteliales. Al contrario que la leptina, tiene una correlación inversa con la obesidad visceral y la resistencia a insulina, y la pérdida de peso es inductor de su síntesis. Tiene un efecto supresor en el sistema inmune reduciendo la producción del CXCR-3 en los macrófagos, de modo que disminuye el reclutamiento de los linfocitos T y su proliferación. Además, suprime la producción de IFN- γ y la activación de NF- κ B, y aumenta la secreción de citoquinas antiinflamatorias como el IL-10 y IL-1R. En la lipodistrofia, los niveles de adiponectina son más bajos que los pacientes con VIH sin lipodistrofia [217,218], mientras que los niveles de **fatty acid binding protein 4** (FABP4) y **retinol binding protein 4** (RBP4) son más elevados [219,220].

El RBP4 se relaciona con SM y fragilidad en pacientes con VIH, y sus niveles aumentan con el TAR. El FABP4 también se encuentra elevado en paciente con SM y es un buen marcador de alteraciones metabólicas en pacientes con infección por VIH, al relacionarse con el IMC, los triglicéridos, la insulina y la tensión arterial [219,221].

La **omentina**, además de ser una adipoquina antiinflamatoria, se cree que tiene propiedades inunomoduladoras, ya que reduce la producción de ciertas citoquinas (TNF- α , IL-1 α , IL-1 β y IL-6), reduce la apoptosis de las células endoteliales y estimula la diferenciación de macrófagos hacia el fenotipo antiinflamatorio M2 [222]. En cuanto al VIH, tiene una correlación positiva con la CV y correlación negativa con el recuento de T-CD4⁺.

La **zinc-alfa-2-glicoproteína** (ZAG) aumenta la lipólisis, reduce los niveles de triglicéridos, y aumenta los niveles del transportador GLUT4 en el músculo esquelético y el tejido adiposo. Su expresión génica está disminuida en la obesidad, así como en pacientes con infección por VIH comparado con controles sanos [223,224].

Se cree que la **apelina** y la **vaspina** tienen propiedades inmunomoduladoras: La vaspina inhibe la activación de diferentes citoquinas proinflamatorias como leptina, resistina y TNF [225]. La apelina, además de disminuir la producción de TNF- α , IL-6 y IL-1 β , es un ligando del **receptor de apelina** (APJ), que es correceptor del VIH. Por tanto, los niveles de APJ se relacionan negativamente con la CV, ya que la unión de la apelina a su receptor dificulta la entrada del virus a la célula [226].

El desequilibrio en la producción de adipoquinas conlleva a una alteración de los procesos metabólicos y de la función inmune. Por lo tanto, conocer a fondo sus efectos e implicación en la pobre respuesta inmune en el VIH, podría abrir una ventana de nuevos biomarcadores pronósticos y nuevas estrategias terapéuticas.

II HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis

En la infección por VIH tiene lugar la activación de procesos inflamatorios en los que se secretan múltiples citoquinas de distinto tipo. Estas citoquinas contribuyen en el mantenimiento de un estado de inflamación crónica de bajo grado y cumplen un rol vital en la regulación de la respuesta inmune, en la generación de T-CD4⁺ y en su destrucción. Dentro de la gran familia de citoquinas se encuentran las quimiocinas, que participan en la quimiotaxis o migración celular, y las adipoquinas, proteínas sintetizadas principalmente en los adipocitos y que tienen una función autocrina y paracrina, regulando procesos metabólicos e inmunes.

Por tanto, creemos que:

- Las quimiocinas y las adipoquinas están implicadas en la regulación de la respuesta inmune y son un factor clave en la pobre recuperación inmunológica.
- Las quimiocinas y las adipoquinas sirven como biomarcadores de una respuesta inmune discordante.

Objetivos

El objetivo principal de la presente tesis es analizar los mecanismos moleculares implicados en la respuesta inmune discordante al TAR en PLHIV con correcta supresión virológica, e identificar posibles biomarcadores que identifiquen una pobre respuesta inmune a nivel basal.

Los objetivos específicos de la presente tesis doctoral son:

1. Estudiar la implicación de las quimiocinas (SDF-1/CXCL12, fractalquina/CX3CL1, MPC-1/CCL2, MIP- α /CCL3, MIP- β /CCL4 y RANTES/CCL5) y sus correceptores (CXCL12, CXCR1, CCR2, CCL5, y CCR5) en la respuesta inmunológica incompleta de las personas con VIH que consiguen una correcta supresión virológica gracias al TAR.
2. Determinar el papel de los distintos polimorfismos genéticos en la respuesta discordante de las PLHIV virológicamente suprimidas.
3. Analizar la función de las adipoquinas (adiponectina, apelina y su receptor, FABP-4, leptina, omentina, RBP4, resistina, vaspina, ZAG) en la regulación de la respuesta inmune en la infección por VIH con correcta supresión virológica.

Como resultado de la investigación llevada a cabo se han publicado los siguientes artículos, que constituyen la base de la presente tesis doctoral.

- Estudio 1: ***“High circulating SDF-1 and MCP-1 levels and genetic variations in CXCL12, CCL2 and CCR5: Prognostic signature of immune recovery status in treated HIV-positive patients”***.
Esta publicación aborda los objetivos 1 y 2.
- Estudio 2: ***“Adipokines as New Biomarkers of Immune Recovery: Apelin Receptor, RBP4 and ZAG Are Related to CD4+ T-Cell Reconstitution in PLHIV on Suppressive Antiretroviral Therapy”***.
Esta publicación aborda el objetivo 3.

III MÉTODOS

En el seno de la presente tesis, se han publicado dos artículos originales en revistas de alto impacto del campo de la investigación del VIH, que se pueden encontrar en el apartado de “Resultados” y en los que se pueden consultar de forma detallada el diseño de estudio y la metodología empleada en cada uno de ellos. Por lo que a continuación, se hace una breve síntesis de los métodos utilizados para la elaboración de dichos trabajos.

Diseño del estudio y participantes

Ambos artículos se basan en un estudio multicéntrico longitudinal de casos y controles, en el que se incluyeron PLHIV naïve visitados en consultas externas de VIH entre 2011 y 2013. Estos pacientes iniciaron el TAR por primera vez y alcanzaron la supresión virológica. Las pautas de tratamiento empleadas fueron dos inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos (NRTI) más un inhibidor de la transcriptasa inversa no análogo de nucleósidos (NNRTI) o más un inhibidor de la proteasa (PI). El primer estudio (**Artículo 1**) incluyó 502 pacientes naïve, de los cuales 262 fueron clasificados como controles (valores de T-CD4⁺ a nivel basal >200 células/ μ L) y 240 fueron casos (valores de T-CD4⁺ a nivel basal \leq 200 células/ μ L). De entre los casos, 226 fueron clasificados según su respuesta inmune a las 48 semanas de iniciar el TAR: 118 fueron inmunológicamente respondedores (IR, T-CD4⁺ \geq 250 células/ μ L) y 108 inmunológicamente no respondedores (INR, T-CD4⁺ <250 células/ μ L). En el caso del segundo estudio (**Artículo 2**) se empleó un esquema similar, en el que se reclutaron 221 pacientes naïve, clasificados según el mismo criterio del artículo anterior como controles (120 pacientes) y casos (101 pacientes). De entre los casos, 2 pacientes fueron excluidos y 99 pacientes fueron clasificados según el recuento de T-CD4⁺ a las 144 semanas de haber iniciado el TAR: 77 fueron IR (T-CD4⁺ \geq 250 células/ μ L a las 144 semanas) y 22 como INR (T-CD4⁺ <250 células/ μ L a las 144 semanas).

Los pacientes debían cumplir con los siguientes criterios de inclusión: edad \geq 18 años, infección por VIH-1, recibir TAR durante las 48 semanas de estudio, y CV indetectable a las 48 semanas. Los criterios de exclusión fueron la presencia de infecciones oportunistas activas, enfermedades inflamatorias concomitantes, cambios en el régimen de TAR, y el uso de fármacos conocidos por afectar o modificar los recuentos de T-CD4⁺: antineoplásicos, esteroides, moduladores de la respuesta inmune y factor estimulador de colonias, entre otros.

Ética

El estudio y los protocolos de investigación se llevaron a cabo de acuerdo con las recomendaciones del Comité de Ética de cada centro participante, y fueron aprobados por el Comité de Ética de Investigación Clínica conforme las normas de Buena Práctica Clínica del Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili (CEIm IISPV) (CEIC 61p/2013 y 041/2018, respectivamente). El CEIm IISPV es un comité independiente constituido por profesionales sanitarios y no sanitarios que supervisa el cumplimiento de los principios de ética en ensayos clínicos y proyectos de investigación llevados a cabo en nuestra región, específicamente en términos de metodología, ética y legislación. Todos los participantes dieron su consentimiento informado conforme la Declaración de Helsinki.

Determinaciones generales de laboratorio

La sangre de los participantes fue extraída tras ayuno nocturno en la consulta externa de VIH. La sangre total se empleó para medir el recuento de T-CD4⁺ y para el aislamiento de DNA. La infección por VIH-1 se diagnosticó por un ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) positivo y se confirmó mediante un análisis de Western blot. La CV de VIH-1 se determinó empleando el Cobas Amplicor HIV-1 Monitor Test v 1.5 (Roche Diagnostics, Barcelona, España). El límite de detección fue <20

copias/ μl . El recuento de T-CD4⁺ se analizó utilizando el citómetro de flujo FAC (Becton Dickinson, San Jose, CA, EUA). Estas determinaciones se realizaron en un laboratorio central. El plasma se obtuvo por centrifugación y se almacenó en el BioBanc IISPV a -80°C hasta su uso.

Determinación de citoquinas plasmáticas

Las concentraciones de SDF-1 (CXCL12), fractalquina (CX3CL1), MCP-1 (CCL2), MIP- α (CCL3), MIP- β (CCL4) y RANTES (CCL5) se midieron mediante un kit ELISA DuoSet DY350 (R&D Systems Inc), DuoSet DY365 (R&D Systems Inc), BMS281INST (eBioscience, The Affymetrix company), DuoSet DY270 (R&D Systems Inc) y DuoSet DY271 (R&D Systems Inc), respectivamente.

Estudios genéticos

El DNA genómico se extrajo de la sangre periférica con un kit Qiagen (Qiagen, Hilden, Germany) y luego las muestras del DNA extraído (5 ng/mL) se enviaron a LGC Genomics Ltd. (antes Kbioscience Ltd., Herts, Reino Unido) para el genotipado. Se escogieron 13 *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) de las quimiocinas seleccionadas y sus receptores, con una frecuencia alélica mayor de 20% en la Población Ibérica en España (IBS) o la Población Europea (EU) en la base de datos NCBI SNP. Se analizaron los siguientes 13 SNPs (*Single nucleotide polymorphisms*) de las quimiocinas arriba mencionadas: CXCL12 rs1801157; CCL5rs2280789, CCL5rs2280788 y CCL5rs2107538. En los receptores de quimiocinas se analizaron CX3CR1rs373278_814, CX3CR1rs3732379, CCR2rs1799864, CCR5rs2734648, CCR5rs1799987, CCR5rs1799988, CCR5rs1800023, CCR5rs1800024 y CCR5rs333_814.

Determinación de adipoquinas plasmáticas

Las concentraciones plasmáticas de adiponectina (RD195023100, BioVendor, Brno, República Checa), apelina (E00237, QAYEE, Shanghai, China), receptor de apelina (E05144, QAYEE, Shanghai, China), fatty acid-binding protein 4 (FABP4) (RD191036200R, BioVendor, Brno, República Checa), leptina (EL2001-1, AssayPro, St Charles, MO, EUA), omentina (RD191100200R, BioVendor, Brno, República Checa), retinol-binding protein 4 (RBP4) (ER3005-1, AssayPro, St Charles, MO, EUA), resistina (RD 191016100, BioVendor, Brno, República Checa), vaspina (RD191097200R, BioVendor, Brno, República Checa), y zinc-alpha-2-glycoprotein (ZAG) (RD191093100R, BioVendor, Brno, República Checa) fueron medidas utilizando un kit ELISA a nivel basal y a las 48 y 144 semanas de seguimiento tras el inicio de TAR.

Análisis estadístico

Antes de iniciar el análisis estadístico, se analizaron la distribución normal y la homogeneidad de las varianzas empleando una prueba de Kolmogorov–Smirnov. Los datos con distribución normal son representados como media \pm desviación standard (SD), mientras que las variables con distribución sesgada son representadas como medianas (percentiles 25-75) o fueron transformadas en logaritmos decimales. Las variables categóricas se representaron como números (porcentajes). Las variables cualitativas se analizaron utilizando la prueba de χ^2 o la prueba exacta de Fisher. Las comparaciones entre grupos se realizaron mediante la prueba no paramétrica de Kruskal–Wallis y/o Mann–Whitney para muestras no pareadas y una prueba T de Wilcoxon para muestras pareadas. Cuando fue aplicable, se utilizó la prueba post hoc de Bonferroni para comparaciones múltiples. Para analizar si las adipoquinas estaban relacionadas independientemente con la reconstitución de T-CD4⁺ (empleando los T-CD4⁺ a las 144 semanas como variable dependiente) se utilizaron pruebas de regresión lineal múltiple por pasos. Los análisis de correlación se evaluaron empleando la prueba de

Spearman. El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando el programa SPSS (versión 21.0, SPSS Inc., Chicago, IL, EUA), y las representaciones gráficas se generaron con el programa GraphPad Prism (versión 9.0, GraphPad Inc., San Diego, CA, EUA). Los resultados se consideraron significativos si $p < 0.05$.

IV RESULTADOS

Estudio 1:

High circulating SDF-1 and MCP-1 levels and genetic variations in CXCL12, CCL2 and CCR5: Prognostic signature of immune recovery status in treated HIV-positive patients

EBioMedicine 62 (2020) 103077

Las quimiocinas son citoquinas que están involucradas en la regulación de la respuesta inmune. Su secreción y producción se ve alterada en la infección por VIH, lo que en consecuencia puede conllevar a una desregulación del sistema inmune. Para analizar este efecto, se estudiaron los niveles de diferentes quimiocinas y sus receptores en pacientes con distinta respuesta inmunológica. Se analizaron las concentraciones plasmáticas de SDF-1/CXCL12, fractalquina/CX3CL1, MCP-1/CCL2, MIP- α /CCL3, MIP- β /CCL4 y RANTES/CCL5 y su asociación con los polimorfismos genéticos de CXCL12, CX3CR1, CCR2, CCL5 y CCR5 a nivel basal y a las 48 semanas después de haber iniciado el TAR. Se empleó una cohorte de 502 pacientes naïve, que fueron clasificados como casos o controles según los valores basales de T-CD4⁺ (casos si T-CD4⁺ \leq 200 células/ μ L y controles si T-CD4⁺ $>$ 200 células/ μ L). Los casos a su vez se clasificaron según su respuesta inmune a las 48 semanas de iniciar el TAR como inmunológicamente respondedores (IR, T-CD4⁺ \geq 250 células/ μ L) o inmunológicamente no respondedores (INR, T-CD4⁺ $<$ 250 células/ μ L).

En cuanto a las características basales, los casos tenían mayor edad, menor recuento de T-CD4⁺ y una mayor CV que los controles. Además de estas mismas características, los INR presentaban una mayor frecuencia de consumo de drogas por vía parenteral que los IR. A nivel basal se observó que SDF-1, RANTES y MCP-1 tenían una correlación negativa con los recuentos de T-CD4⁺. En concreto, los INR mostraron concentraciones más elevadas de SDF-1 y MCP-1 que los IR, lo que relaciona estas últimas quimiocinas con un mal pronóstico de recuperación inmune. De lo contrario, MIP- α mostró una correlación positiva con los recuentos de T-CD4⁺, y los controles mostraron concentraciones más elevadas de esta quimiocina que los casos, lo que lo relaciona con un mejor pronóstico.

A las 48 semanas de haber iniciado el TAR, las concentraciones de SDF-1 y RANTES circulantes eran más elevadas en los casos que en los controles, y como ocurría a nivel basal, los INR tenían concentraciones más elevadas de SDF-1 que los IR, lo que sugiere que esta quimiocina puede servir como marcador de la progresión de la enfermedad además de ser un buen predictor de una respuesta inmune discordante. Los niveles de MIP- α fueron más elevados en controles que en casos, y su ganancia se correlacionó positivamente con la ganancia de T-CD4⁺, mientras que los niveles de MCP-1 disminuyeron durante el seguimiento y su pérdida se relacionó negativamente con la ganancia de T-CD4⁺. Esto indica que MCP-1 y MIP- α son marcadores de respuesta de T-CD4⁺ al tratamiento.

La variante de CXCL12rs1801157 se asoció con las concentraciones de SDF1 en IR. En los INR el CCR5- Δ 32 se relacionó con MIP- β , y el CCR2rs1799864_814 se relacionó con RANTES, lo que corrobora la unión de RANTES a su receptor CCR2.

En conclusión, los niveles elevados de SDF-1/CXCL12 y MCP-1/CCL-2 junto con las variaciones genéticas de CXCL12, CCL2 y CCR5 son marcadores pronósticos de una respuesta inmune incompleta en pacientes con VIH con correcta supresión virológica.



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

EBioMedicine

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ebiom

Research paper

High circulating SDF-1 and MCP-1 levels and genetic variations in CXCL12, CCL2 and CCR5: Prognostic signature of immune recovery status in treated HIV-positive patients



Elena Yeregui^{1,2,3,#}, Consuelo Viladés^{1,2,3,#}, Pere Domingo^{4,#}, Andra Ceausu^{1,3}, Yolanda María Pacheco^{5,6}, Sergi Veloso^{1,2,3}, Alexy Inciarte⁷, Judit Vidal-González^{8,9}, Maria Peraire¹⁰, Carles Perpiñán¹¹, Vicenç Falcó^{9,12}, Jenifer Masip^{1,3}, Verónica Alba^{1,3}, Montserrat Vargas^{1,3}, Anna Martí^{1,2,3}, Laia Reverté^{1,2,3}, Josep Mallolas⁷, Francesc Vidal^{1,2,3,**}, Joaquim Peraire^{1,2,3,*}, Anna Rull^{1,2,3,*}

¹ Universitat Rovira i Virgili, Tarragona, Spain² Institut Investigació Sanitària Pere Virgili (IISPV), Tarragona, Spain³ Hospital Universitari de Tarragona Joan XXIII, Tarragona, Spain⁴ Infectious Diseases Unit, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain⁵ Laboratory of Immunology, Institute of Biomedicine of Seville, IBI, Seville, Spain⁶ UGC Clinical Laboratories, Virgen del Rocío University Hospital/CSIC/University of Seville, Seville, Spain⁷ Department of Infectious Diseases, Hospital Clinic, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain⁸ Department of Internal Medicine - Hepatology, Hospital Universitari Vall d'Hebron (HUVH), Barcelona, Spain⁹ Vall d'Hebron Institut de Recerca (VHIR), Barcelona, Spain¹⁰ Hospital Universitari Son Espases, Palma, Illes Balears, Spain¹¹ CAP Sant Pere, Reus, Tarragona, Spain¹² Infectious Diseases Department, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article History:

Received 14 August 2020

Revised 22 September 2020

Accepted 6 October 2020

Available online xxx

Keywords:

Chemokines

Chemokine receptors

HIV

Poor immune recovery

Polymorphisms variants

ABSTRACT

Background: The underlying mechanisms of incomplete immune reconstitution in treated HIV-positive patients are very complex and may be multifactorial, but perturbation of chemokine secretion could play a key role in CD4⁺ T-cell turnover.

Methods: We evaluated the circulating baseline and 48-week follow-up concentrations of SDF-1/CXCL12, fractalkine/CX3CL1, MCP-1/CCL2, MIP- α /CCL3, MIP- β /CCL4 and RANTES/CCL5, and we estimated their association with CXCL12, CX3CR1, CCR2, CCL5 and CCR5 single nucleotide polymorphisms (SNPs) to investigate multiple chemokine-chemokine receptor signatures associated with immune dysregulation preceding poor immune recovery.

Findings: The circulating concentrations and gene expression patterns of SDF-1/CXCL12 (CXCL12 rs1801157) and MCP-1/CCL2 (CCR2 rs1799864_814) were associated with immune recovery status. CCR2 rs1799864_814 and CCR5 rs333_814 (Δ 32) determine the baseline plasma RANTES and MIP- α concentrations, respectively, in participants with poor immune response.

Interpretation: SDF-1/CXCL12 and MCP-1/CCL2 could be considered prognostic markers of immune failure despite suppressive antiretroviral therapy. The strong linkage disequilibrium (LD) between CCR2 rs1799864_814 and CCR5 rs1800024 indicated that the alleles of each gene are inherited together more often than would be expected by chance.

Funding: This work was supported by Fondo de Investigación Sanitaria and SPANISH AIDS Research Network (ISCIII-FEDER); AGAUR and Gilead Fellowship. FV and YMP are supported by grants from the Programa de Intensificación (ISCIII) and Servicio Andaluz de Salud, respectively. JVG,EY and LR are supported by the Instituto de Salud Carlos III (ISCIII). AR is supported by Departament de Salut, Generalitat de Catalunya and by the Instituto de Salud Carlos III (ISCIII).

© 2020 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)

** Corresponding author: Francesc Vidal Marsal, Department of Internal Medicine and Infectious Diseases, Hospital Universitari de Tarragona Joan XXIII, IISPV, Universitat Rovira i Virgili, c/Mallafre Guasch, 4; Tarragona, Spain 43007
E-mail address: fvidalmarsal.hj23.ics@gencat.cat (F. Vidal).

These authors contributed equally to this paper, and should be considered as primary co-authors.

* These authors contributed equally to this paper, and should both be considered as senior co-authors.

Research in context

Evidence before this study

Chemokines are chemotactic cytokines that signal through cell surface G protein-coupled heptahelical chemokine receptors to control the migration and positioning of immune cells to the sites of infection and injury. They are critical for the function of the innate immune system. Accordingly, the chemokine-chemokine receptor system clearly plays an important role in the HIV life cycle, disease progression, and HIV reservoir establishment. Thus, imbalances of cytokine-chemokine levels were hypothesized to be responsible for a lack of appropriate CD4⁺ T-cell reconstitution after suppressive cART.

Added value of this study

The present study jointly evaluates a specific remarkable network of chemokines as prognostic and follow-up markers of immune recovery status by determining circulating concentrations and performing a genetic polymorphism study. This is the largest, longitudinal study assessing both chemokine genetics and circulating levels in immune restoration.

Implications of all the available evidence

The chemokine-chemokine receptor system is more complex than indicated by the study of a selected chemokine and its natural ligands due to the enormous network existing among the different chemokines and their receptors. However, we conclude that SDF-1/CXCL12, MCP-1/CCL-2 and CCR5 receptors are key effectors of susceptibility to HIV progression, especially in terms of immune reconstitution. Our data open a window for new proof-of-concept studies to explore the individual but also dual blockage of SDF-1 and MCP-1, as well as CCR2 and CCR5, as potential therapeutic options for advanced clinical trials with promising fortunate outcomes.

residues. Chemokines signal through cell surface G protein-coupled heptahelical chemokine receptors to perform a variety of functions aside from chemotaxis, including T cell differentiation and function, as well as angiogenesis. Thus, investigations regarding multiple cytokine-chemokine signatures associated with immune dysregulation preceding poor immune recovery are needed to understand the molecular mechanism involved in this condition and therefore to develop a useful tool for early detection.

In fact, the connection between the expression of different pro-inflammatory cytokines and the discordant response encouraged us to recently explore the role of the IL-7/IL-7R axis in INRs. [10] Since our results confirmed that improved knowledge of this cytokine and its receptor in HIV participants could produce new insights regarding the immune response to ART, we hypothesized that the study of some selected chemokines related to IL-7/IL-7R axis could help to identify the molecular mechanisms associated with immune dysregulation preceding a discordant response to ART. Thus, in this study, we evaluated circulating baseline (pre-ART) and 48-week follow-up concentrations of stromal cell-derived factor 1 (SDF-1), also known as C-X-C motif chemokine 12 (CXCL12) (SDF-1/CXCL12), fractalkine/CX3CL1, monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1/CCL2), macrophage inflammatory protein-1 alpha (MIP- α /CCL3), macrophage inflammatory protein-1 beta (MIP- β /CCL4) and RANTES (regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted), also known as CCL5, and we also determined whether some selected CXCL12, CX3CR1, CCR2, CCL5 and CCR5 single nucleotide polymorphisms (SNPs) are associated with CD4⁺ T-cell recovery in a previously characterized cohort of HIV participants. [10]

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Study design and participants

A multicentre, longitudinal case-controlled study of 502 adult HIV-positive participants who were consecutively recruited between 2011 and 2013 at the HIV outpatient clinics of the participating hospitals who started their first ART and achieved virological suppression after ART was performed. [10] Patients were selected from among those who were receiving a combination of two nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTI) plus a nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor (NNRTI) or a protease inhibitor (PI). A flow-chart of patient selection and enrolment is provided in Fig. 1 with the previously defined inclusion/exclusion criteria. [10] Of the selected patients, 262 were defined as controls (baseline CD4⁺ T-cell counts >200 cells/ μ L), and 240 were cases (baseline CD4⁺ T-cell counts \leq 200 cells/ μ L). Among the cases, 226 could be classified for the immune recovery study: 118 participants had more than 250 CD4⁺ T-cells/ μ L after 48 weeks of ART (“immunological responders”, IRs), and 108 participants did not reach the 250 cells/ μ L CD4⁺ T-cell threshold (“immunological nonresponders”, INRs). The threshold of 250 CD4⁺T-cells/ μ L to classify patients regarding immune recovery status was previously validated by the fact that patients receiving cART with CD4⁺ T-cells persistently below 250 cells/ μ L area associated with worse clinical outcomes [5] and thus, to be consistent with our previous related work, [10] in this study we maintain the same threshold criteria.

2.2. Ethics

The study and all research protocols were carried out in accordance with the recommendations of the Ethical and Scientific Committees from each participating institution and were approved by the Committee for Ethical Clinical Research by following the rules of Good Clinical Practice from the Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili (CEIm IISPV)(CEIC 61p/2013). The CEIm IISPV is an independent committee, made up of health and nonhealth professionals,

1. INTRODUCTION

Combination antiretroviral treatment (cART) in HIV-positive participants aims to suppress HIV replication below detectable levels and restore the CD4⁺ T-cell counts. [1] However, approximately 30% of people living with HIV (PLW) with optimal treatment and fully suppressed viral replication fail to recover their CD4⁺ T-cell counts. [2,3] These patients are referred to as “immunodiscordants” or “immunological nonresponders” (INRs), and are linked to an increased risk of disease progression and death compared with PLW who achieve complete immune reconstitution. [4,5]

The CD4⁺ T-cell count is the result of the production, destruction, and trafficking between secondary lymphoid organs and peripheral tissues of CD4⁺ T-cells, [2,6] and INRs may have both excessive destruction and alterations in the production of CD4⁺ T-cells, resulting in an increase in cycling and proliferation before cART. [7] Although the underlying mechanisms of incomplete immune reconstitution are very complex and may be multifactorial, perturbation of chemokine secretion could play a key role in CD4⁺ T-cell turnover, [8–10] and chemokine modulation has been proposed as a promising therapeutic strategy to improve immune reconstitution. [11,12]

Chemokines are chemotactic cytokines that control the migration and positioning of immune cells, most notably leukocytes, to the sites of infection and injury. [13] They are a large family of small (8–12 kDa) proteins that are characterized by the presence of three to four conserved cysteine residues and that can be classified into four families based on the positioning of the N-terminal cysteine

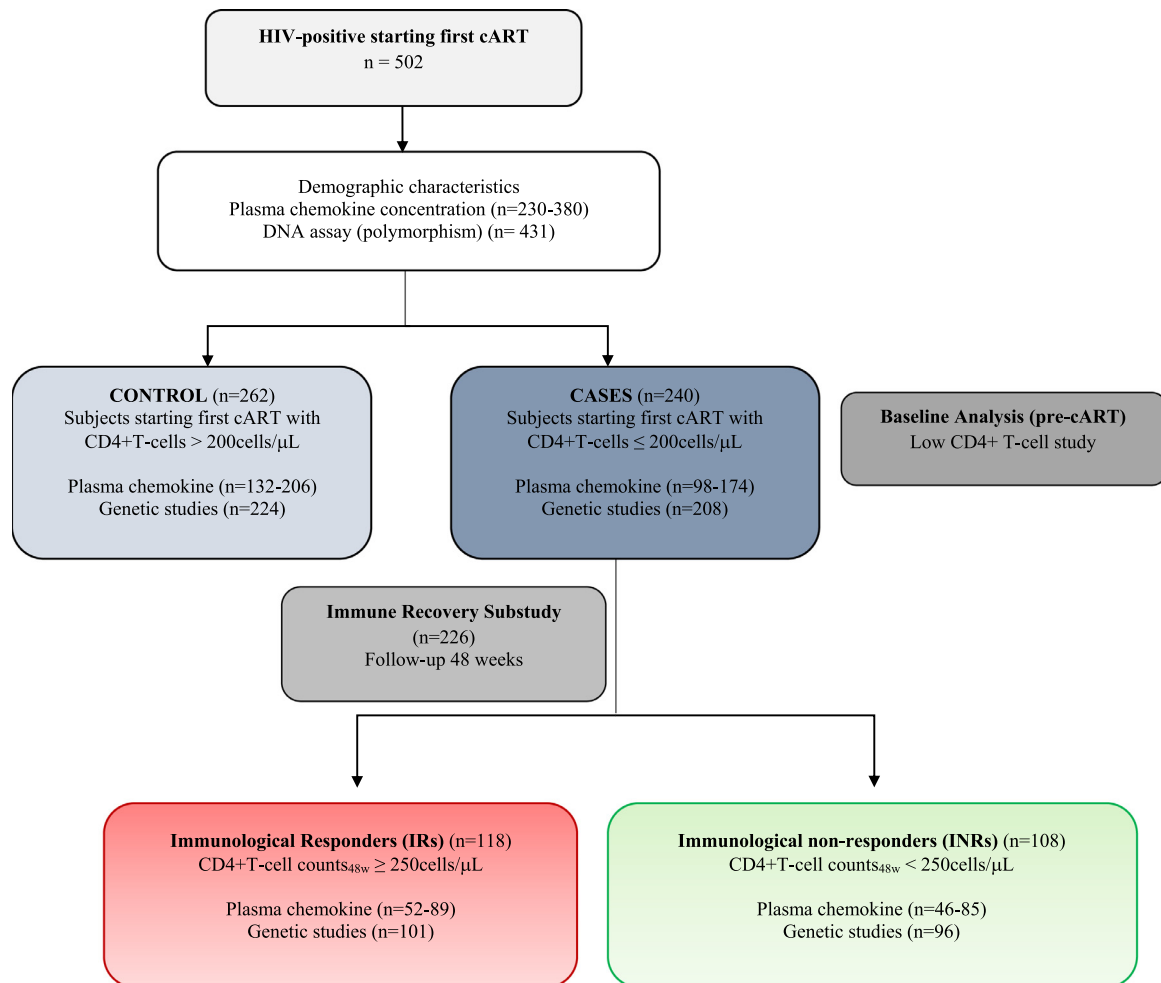


Fig. 1. Flowchart illustrating subject cohort enrolment and analysis. HIV-infected subjects were included and categorized as controls and cases according to the pre-cART CD4⁺ T-cell counts. For the immune recovery sub-study group, cases starting cART with T-cell counts below 200 cells/ μ L were categorized according to their immune status after 48 weeks of follow-up.

which supervises the correct compliance of the ethical principles governing clinical trials and research projects that are carried out in our region, specifically in terms of methodology, ethics and laws. All participants gave written informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki.

2.3. General laboratory measurements

Plasma was obtained by centrifugation and was stored at -80°C in the IISPV-Biobank until use. HIV-1 infection was diagnosed by a positive ELISA result and confirmed by Western blot analysis. The plasma HIV-1 viral load was determined by the Cobas Amplicor HIV-1 Monitoring Test v 1.5 (Roche Diagnostics, Barcelona, Spain). The limit of detectability was <20 copies/ μ L. CD4⁺ T-cell counts were analysed using a FACScan flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA).

2.4. Genetic studies

We chose 13 single nucleotide polymorphisms (SNPs) in selected chemokine and chemokine receptors, with an allelic frequency greater than 20% in the Iberian Population in Spain (IBS) or the European Population (EU) in the NCBI SNP database. In summary, the following 13 SNPs in chemokines were analysed in this study: CXCL12 rs1801157; CCL5rs2280789, CCL5rs2280788 and CCL5rs2107538; in chemokine receptors: CX3CR1rs373278_814, CX3CR1rs3732379, CCR2rs1799864,

CCR5rs2734648, CCR5rs1799987, CCR5rs1799988, CCR5rs1800023, CCR5rs1800024 and CCR5rs333_814 were analysed. Genomic DNA was extracted from peripheral blood with a Qiagen kit (Qiagen, Hilden, Germany) and then the extracted DNA samples (5 ng/ μ L) were sent to LGC Genomics Ltd. (formerly Kbioscience Ltd., Herts, UK) for genotyping. [10] The CCL3/4 copy number variation (CVN) was not considered in the present study due to the high level of discordance between different assays/techniques to measure it and also because CCL3L1–CCL4L1 CVN results will be bias by the study design as mentioned below in limitations of the study.

2.5. Plasma chemokine concentrations

Plasma concentrations of human SDF-1 (CXCL12), fractalkine (CX3CL1), MCP-1 (CCL2), MIP- α (CCL3), MIP- β (CCL4) and RANTES (CCL5) were measured by a double-antibody sandwich one-step process enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) with DuoSet DY350 (R&D Systems Inc), DuoSet DY365 (R&D Systems Inc), BMS281INST (eBioscience, The Affymetrix company), DuoSet DY270 (R&D Systems Inc) and DuoSet DY271 (R&D Systems Inc), respectively, according to the manufacturer's instructions.

2.6. Statistical analyses

Prior to the statistical analyses, the normal distribution and homogeneity of the variances were tested using a Kolmogorov-

Smirnov test. Normally distributed data were expressed as the mean \pm standard deviation (SD), whereas variables with a skewed distribution were represented as the median (25th percentile – 75th percentile) or transformed into a decimal logarithm. Categorical variables were reported as numbers (percentages). Qualitative variables were analysed using the χ^2 test or Fisher's exact test when necessary. Comparisons between groups were performed with nonparametric Kruskal-Wallis (KW) and/or Mann-Whitney (MW) tests for unpaired samples and a Wilcoxon *t*-test for paired samples (W). When applicable, Bonferroni post-hoc approach was used in multiple comparison analyses. Associations between quantitative variables were evaluated using the Spearman correlation. Allele and genotype frequencies and the Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) were evaluated using SNPstats software [14]. To estimate the association between chemokine and chemokine receptor genetic polymorphisms and immune recovery status, we used multiple inheritance models (codominant, dominant, recessive, overdominant and additive). For each SNP, the odds ratios (ORs) and 95% confidence intervals (CIs) were calculated using unconditional logistic regression analysis with adjustment of the baseline pre-ART CD4⁺ T-cell counts. In addition, the HaploReg v4.1 software (<https://pubs.broadinstitute.org/mammals/haploreg/haploreg.php>), a bioinformatic tool designed for exploring the annotations of the noncoding variants in haplotype blocks, was used to evaluate the mechanistic hypothesis of the queried SNP. Statistical analyses were performed using SPSS (version 21.0, SPSS Inc., Chicago, IL), and graphical representations were generated with GraphPad Prism software (version 5.0, GraphPad Inc., San Diego, CA). The results were considered significant at $P < 0.05$.

2.7. Role of funders

Funders had no role in the study design and participants' recruitment, no role in general laboratory measurements, data analysis, and interpretation of data; no role in the writing of the manuscript, and no role in the decision to submit the final manuscript for publication.

3. RESULTS

3.1. Patient characteristics

The pre-cART clinical characteristics of the study cohort of HIV-positive participants ($n = 502$) were categorized according to the baseline CD4⁺ T-cell counts (Fig. 1) and are presented in Table 1. The patients associated with cases (baseline CD4⁺ T-cell ≤ 200 cells/ μ L) were older, presented significantly decreased CD4⁺ T-cell counts and increased plasma viral loads compared to controls (baseline CD4⁺ T-cell > 200 cells/ μ L), and they were categorized according to immune recovery criteria based on CD4⁺ T-cell counts after 48 weeks of suppressive cART (48w ART) as immunological recoverers (IRs, $n = 118$) or immunological nonrecoverers (INRs, $n = 108$). The INRs were older, presented significantly lower CD4⁺ T-cell counts at baseline and were associated with intravenous drug use at enrolment.

3.2. SDF-1 and MCP-1 are prognostic markers of the immune response to cART

Higher SDF-1 ($P = 0.074$), RANTES ($P = 0.006$) and MCP-1 ($P = 0.002$) plasma concentrations (non-parametric Mann-Whitney was used to compare differences between groups, P values < 0.05 considered statistically significant, and P values > 0.05 but < 0.10 were considered relevant for results interpretation) negatively correlated with these chemokines to baseline CD4⁺ T-cell counts (Fig. 2). Of interest, the baseline SDF-1 and MCP-1 plasma concentrations were higher in INRs than in IRs. Therefore, these two molecules are related not only to the pre-cART low CD4⁺ T-cell count but also to immune recovery prognosis. In contrast, MIP-alpha (MIP- α) showed a positive

association with baseline CD4⁺ T-cell counts ($P = 0.004$, Spearman correlation test). In fact, plasma concentrations of MIP- α were significantly higher in controls compared to cases (Table 1, $P = 0.006$, non-parametric Mann-Whitney test), although no differences were observed between INRs and IRs.

The independent association between baseline CD4⁺ T-cell counts and plasma chemokine concentrations was corroborated using stepwise multiple regression analysis with the baseline CD4⁺ T-cell count as the dependent variable. The model was statistically significant ($F(3, 198) = 8.316$, $P < 0.001$) and accounted for approximately 10% of the variance in the baseline CD4⁺ T-cell counts ($R^2 = 0.112$, adjusted $R^2 = 0.098$). These observations suggest that lower CD4⁺ T-cell counts are primarily predicted by higher plasma MCP-1 and SDF-1 concentrations and to a lesser extent by higher plasma viral loads, which accounted for approximately 5%, 4% and 2% of the variance in the baseline CD4⁺ T-cell counts, respectively (Fig. 2b.1). Thus, the potential for the circulating MCP-1 and SDF-1 baseline values to be prognostic markers of immune status due to poor CD4⁺ T-cell count recovery after 48 w cART was analysed using standard regression analysis with 48w cART CD4⁺ T-cell count as the dependent variable. In that case, the model was statistically significant ($F(2, 333) = 7$, $P = 0.001$, standard regression analysis) and accounted for approximately 4% of the variance in the 48w cART CD4⁺ T-cell counts (MCP-1 accounted for approximately 3% of the variance). Thus, we confirmed that these two molecules are related to low CD4⁺T-cell counts pre-cART and at 48w, playing an important role in immune recovery prognosis (Fig. 2b.2). It is important to highlight that the R-squared is a measure of exploratory power, not fit, and for that reason reporting the value of R-squared significantly different from 0, even less than 0.7 (generally considered a model with very good fit), indicated that the regression model had statistically significant exploratory power.

3.3. SDF-1 is a marker of poor progression, and the MCP-1& MIP- α are markers of Δ CD4⁺ T-cells

The circulating plasma SDF-1 and RANTES concentrations remained significantly elevated in cases compared to controls after cART for 48 weeks (Fig. 3). In fact, the level of SDF-1 was significantly different between INRs and IRs at both baseline ($P = 0.036$, non-parametric Mann-Whitney test) and after 48 w of cART ($P = 0.036$, non-parametric Mann-Whitney test), which indicates SDF-1 as not only a prognostic marker of the immune response but also disease progression. On the other hand, circulating plasma MIP- α levels were higher in controls than in cases after 48w of cART, although no differences were observed between INRs and IRs. Regarding plasma MCP-1 concentrations, the initiation of ART decreased the circulating chemokine concentration in all participants. In fact, the percentage decrease in MCP-1 (Δ MCP-1) during cART was significant between cases and controls ($P = 0.001$, non-parametric Mann-Whitney test) but not between INRs and IRs ($P = 0.100$, non-parametric Mann-Whitney test).

Finally, the percentage increase in the CD4⁺ T-cell counts (Δ CD4⁺ T-cell) was calculated to evaluate its association with the percentage increase/decrease in each chemokine during the 48w of cART. The Δ CD4⁺ T-cell count was positively related to the Δ MIP- α concentrations ($\rho = 0.137$, $P = 0.040$, Spearman correlation test), and inversely correlated with the Δ MCP-1 plasma values ($\rho = -0.124$, $P = 0.023$, Spearman correlation test). These results corroborated MCP-1 and MIP- α as general markers of CD4⁺ T-cell responses to cART follow-up.

3.4. Genetic association study of chemokine (CXCL12 and CCL5) gene variants

Table 2 summarizes the distribution of CXCL12 rs1801157, located on chromosome 10, and CCL5 rs2280789, CCL5 rs2280788 and CCL5 rs2107538, located on chromosome 17, among the groups, which

Table 1

Study cohort (n = 502) characteristics of the according classification criteria.

	Control (n = 262)	Cases (n = 240)	P-value*	IR (n = 108)	INR (n = 118)	P-value**
Pre-ART clinical characteristics						
Age at cART initiation (years)	37 [31–45]	39 [34–48]	0.001	37 [33–42]	42 [36–50]	< 0.001
Male	209 (80.38)	192 (80.67)	0.545	94 (79.67)	83 (76.85)	0.610
Risk factor			0.268			0.004
Heterosexual	89 (34.23)	92 (38.65)		43 (37.07)	47 (43.52)	
Homo/Bisexual	128 (49.23)	94 (39.50)		58 (50.00)	35 (32.41)	
Intravenous drug abuse	37 (14.23)	47 (19.75)		13 (11.21)	23 (21.3)	
Other/Unknown	6 (2.29)	5 (2.10)		2 (1.72)	3 (2.78)	
CD4 ⁺ T-cell count (cells/ μ L)	327 [265–439]	92 [37–162]	< 0.001	135 [59–182]	59 [19–116]	< 0.001
Plasma HIV RNA load (log copies/mL)	4.88 [4.30–5.26]	5.15 [4.72–5.61]	< 0.001	5.08 [4.74–5.61]	5.27 [4.77–5.67]	0.587
HCV co-infection (Positive)	38 (16.17)	48 (22.53)	0.257	22 (19.47)	22 (22.68)	0.116
Pre-ART plasma chemokine concentrations						
SDF-1 (pg/mL) (n = 377)	0.25 [0.21–0.30]	0.26 [0.22–0.30]	0.074	0.25 [0.21–0.30]	0.26 [0.24–0.31]	0.036
Log RANTES (pg/mL) (n = 380)	1.45 [0.77–1.91]	1.75 [1.04–1.97]	0.006	1.61 [0.97–1.95]	1.86 [1.11–1.98]	0.104
Log FK (pg/mL) (n = 345)	0.66 [0.57–0.79]	0.67 [0.55–0.76]	0.583	0.66 [0.55–0.76]	0.68 [0.55–0.78]	0.304
Log MCP-1 (pg/mL) (n = 345)	2.40 [2.18–2.61]	2.51 [2.31–2.73]	0.002	2.47 [2.24–2.69]	2.58 [2.39–2.78]	0.037
Log MIP-a (pg/mL) (n = 231)	1.46 [1.24–1.70]	1.34 [1.21–1.50]	0.006	1.31 [1.18–1.49]	1.39 [1.21–1.55]	0.424
Log MIP-b (pg/mL) (n = 223)	1.69 [1.52–1.81]	1.64 [1.49–1.80]	0.471	1.63 [1.49–1.78]	1.66 [1.45–1.81]	0.571

Data are presented as n (%) or median (interquartile range). Categorical data were compared by means of a χ^2 test, whereas continuous data were compared using non-parametric Mann-Whitney test (P* value for comparison between control and cases, P** value for comparison between IR and INR). P value (0.05 was considered significant and is highlighted in bold. All P values) 0.05 but < 0.10 were considered relevant for results interpretation and are italicized. INR, incomplete immune recoverers; IR, immune recoverers.

MCP-1/CCL2, monocyte chemoattractant protein-1; MIP- α /CCL3, macrophage inflammatory protein-1 alpha; MIP- β /CCL4, macrophage inflammatory protein-1 beta; RANTES/CCL5, regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted and SDF-1/CXCL12, stromal cell-derived factor 1.

were in accordance with the data listed in the NCBI SNP database and consistent with the Hardy-Weinberg equilibrium (HWE).

Regarding *CXCL12* rs1801157, our results suggested a potential association between SDF-1 expression and the immune response to cART ($P = 0.065$, Fig. 4a). Five inheritance models were fitted, which correspond to different groupings of the genotypes, and the Akaike's Information Criterion (AIC) and Bayesian Information Criterion (BIC) calculated to select the best model for each specific SNP. In fact, considering the AIC and BIC scores adjusted for the baseline pre-cART CD4⁺ T-cell counts, an association with immune recovery status was detected with the recessive model (Table 3).

No association was found between the selected *CCL5* gene variants and a pre-cART low CD4⁺ T-cell count or immune response to cART. However, a pairwise linkage disequilibrium (LD) estimate was obtained for the *CCL5* gene polymorphisms (Table 3b), revealing that all the SNP marker combinations exhibited perfect LD scores in each of the analysed groups. Any of the possible haplotypes were related to low pre-cART CD4⁺ T-cell counts or to cART-associated immune recovery (data not shown).

3.5. Genetic association study of selected chemokine receptor gene variants

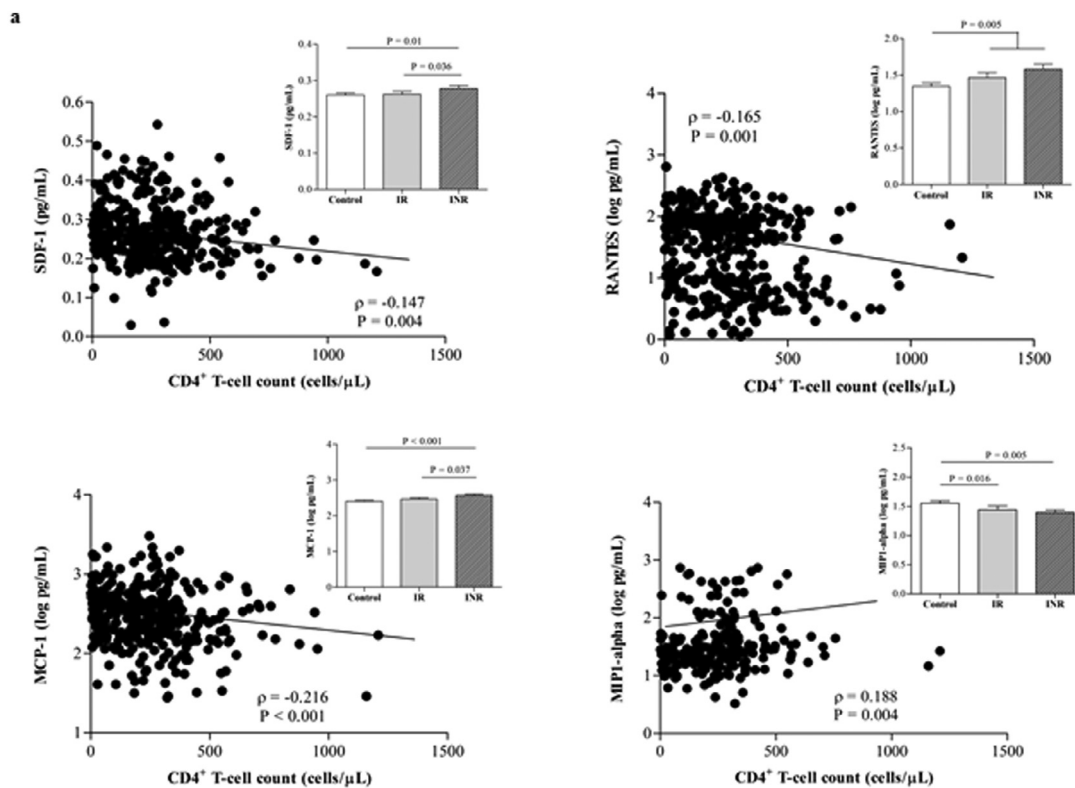
Table 4 summarizes the characteristics of the *CX3CR1* rs3732178_814 and rs3732379, *CCR2* rs1799864_814, and *CCR5* rs2734648, rs1799987, rs1799988, rs1800023, rs1800024 and rs333_814 polymorphisms located on chromosome 3 among the groups, which were in accordance with the data listed in the NCBI SNP database and the HWE. The genotype frequencies for all selected chemokine receptor gene variants explored in this study were consistent with the HWE. No association was found between the *CX3CR1* gene variants, and pre-cART low CD4⁺ T-cell counts or immune recovery status. However, our results suggested a potential association between *CCR2* rs1799864_814 and the immune response to cART ($P = 0.076$, Table 4 and Fig. 4). Considering the AIC and BIC scores (adjusted for the baseline pre-cART CD4⁺ T-cell counts), the association was detected for the codominant model (G/A, OR = 0.48, 95% CI = 0.22–1.06, $P = 0.047$). However, the confidence interval includes 1, and thus there is insufficient evidence to conclude that the groups are statistically significantly different.

Regarding *CCR5* gene variants, only *CCR5* rs1800024 and *CCR5* rs333_814 ($\Delta 32$) were related to immune recovery status (Table 4 and Fig. 4). In the case of *CCR5* rs1800024, considering the AIC and BIC scores (adjusted for baseline pre-ART CD4⁺ T-cell counts), an association was detected with the codominant model (C/T, OR = 0.48, 95% CI = 0.22–1.03, $P = 0.024$ from logistic regression analyses using SNPstats software). We also found a significant relationship between poor immune recovery status and the $\Delta 32$ homozygous genotype (1 allele, Table 5), although the risk was not found to be statistically significant in the SNP analysis (OR = 2.05, 95% CI = 0.79–5.34, $P = 0.13$).

Finally, multiple-SNP analysis was performed for all chemokine receptor variants located on chromosome 3 ordering them by the correlative chromosome position. LD was found between several genetic variants (Fig. 4b). Interestingly, among cases, a strong LD was found between the two chemokine receptor variants, *CCR2* rs1799864_814 and *CCR5* rs1800024, which were associated with the immune response in the single SNP analysis, ($D' = 0.9992$, $P < 0.001$, LD analysis using SNPstats software), indicating that these alleles of each gene are inherited together more often than would be expected by chance (Fig. 4b). The haplotypes GCGTGTGCA (OR = 0.12, 95% CI = 0.02–0.94, $P = 0.044$, haplotype analyses using SNPstats software) and ATGGACACA (OR = 0.11, 95% CI = 0.02–0.61, $P = 0.013$, haplotype analyses using SNPstats software) were associated with the immune response according to the CD4⁺ T-cell counts after 48 weeks of cART (Table 5).

3.6. *CXCL12* rs1801157 and *CCL5* rs2280788 impact the baseline chemokine values

Then, the impact of the selected chemokine gene variants on circulating chemokine concentrations was explored in cases (INR and IR) to establish any possible association with immune recovery status in response to cART (Fig. 5). Interestingly, among the *CCL5* gene variants explored in this study, only *CCL5* rs2280788 was associated with circulating chemokine concentrations. Rather than being associated with plasma *CCL5* values, *CCL5* rs2280788 was strongly related to plasma fractalkine ($P = 0.008$, one-way ANOVA test) and MIP- α ($P < 0.001$, one-way ANOVA test) values in IRs and circulating MIP- β ($P = 0.041$, one-way ANOVA test) in INRs. Regarding *CXCL12* rs1801157, an association was found between this SDF-1 gene



b.1

Model	b	SE-b	Beta	Pearson r	sr ²	P-value
Constant	852.233	127.985				<0.001
Log MCP-1	-111.434	34.599	-0.216	-0.216	0.047	0.001
SDF-1	-527.020	184.913	-0.192	-0.205	0.036	0.005
Log CV	-39.250	17.183	-0.154	-0.169	0.023	0.023

b.2

Model	b	SE-b	Beta	Pearson r	sr ²	P-value
Constant	822.997	104.157				<0.001
SDF-1	-320.096	192.480	-0.089	-0.094	0.007	0.097
Log MCP-1	-123.084	37.179	-0.178	-0.180	0.031	0.001

Fig. 2. a) Correlation analysis between the baseline (pre-cART) CD4⁺ T-cell counts and selected chemokines (Spearman correlation test). Insert shows the baseline circulating concentrations of the selected chemokines in INRs (n = 85) and IRs (n = 89) compared with those in a group of control participants (n = 206) (non-parametric Mann-Whitney test). **b)** Association of plasma chemokine concentrations to pre-cART low CD4⁺ T-cell counts (b.1) and immune recovery status (b.2) (Multiple regression analysis). **b.1)** Stepwise regression results for the prediction of the baseline pre-cART CD4⁺ T-cell counts. The dependent variable was baseline pre-cART CD4⁺ T-cell counts and the independent variables tested initially were log CV, SDF-1/CXCL12, log fractalkine/ CX3CL1, log MCP-1/CCL2, log MIP-α/CCL3, log MIP-β/CCL4 and log RANTES/CCL5. **b.2)** Standard regression results for the prediction of immune recovery status. The dependent variable was CD4⁺ T-cell counts after 48 weeks of cART and the independent variables were SDF-1/CXCL12 and log MCP-1/CCL2. sr² = squared semi-partial correlation used to calculate the percentage of the variance.

variant and the circulating SDF-1 concentration in IRs (P = 0.05, one-way ANOVA test).

3.7. CCR2 rs1799864 and CCR5-Δ32 determine the chemokine concentration in INR

No association was found between the selected CX3CR1 variant and the vast majority of CCR5 gene variants and circulating chemokine

values. Only CCR5-Δ32 was significantly related to the plasma MIP-β concentration in INRs (P = 0.002, one-way ANOVA test), although the expression of this chemokine in the circulation was not related to pre-cART CD4⁺ T-cell counts or to immune response in this study. On the other hand, the expression of CCR2 rs1799864_814 was significantly related to the plasma RANTES concentration in INRs, corroborating the binding of this chemokine to the CCR2 receptor (Fig. 5) and the potential role in the immune response.

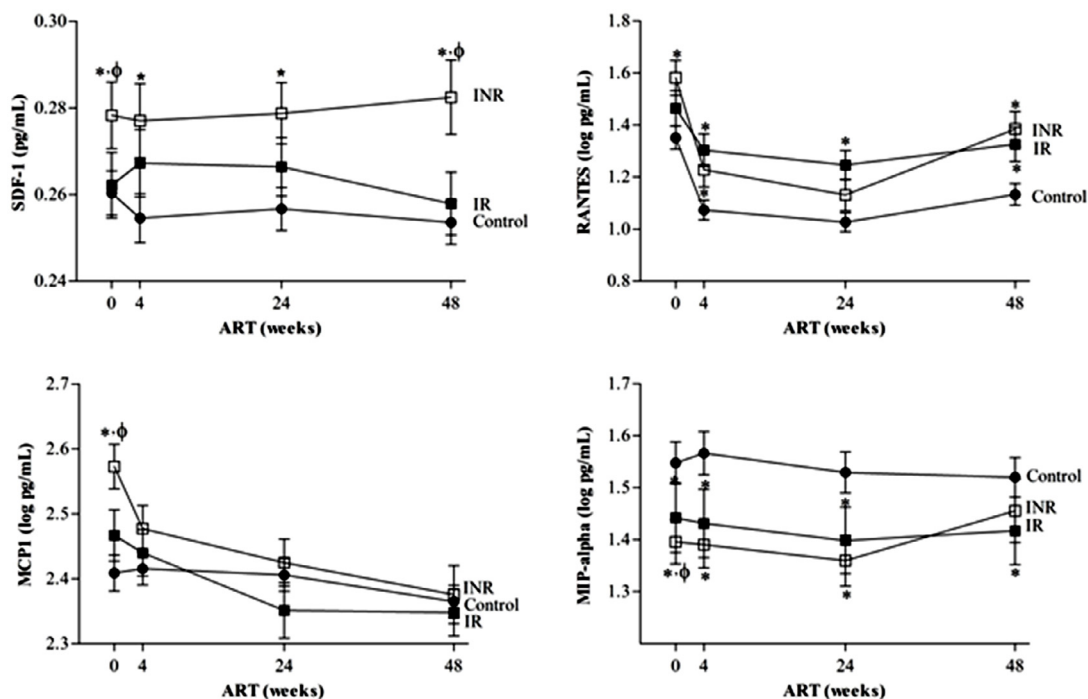


Fig. 3. Longitudinal evaluation of SDF-1/CXCL12 ($n = 208$ controls, $n = 85$ INR and $n = 88$ IR), RANTES/CCL5 ($n = 208$ controls, $n = 85$ INR and $n = 89$ IR), MCP-1/CCL2 ($n = 185$ controls, $n = 77$ INR and $n = 80$ IR) and MIP- α /CCL-3 ($n = 130$ controls, $n = 48$ INR and $n = 53$ IR) during 48 weeks of cART in INRs and IRs compared to a control group of subjects. Data are represented as the mean \pm SEM. Non-parametric Mann-Whitney test, * significant differences to control group and ϕ significant differences to IRs).

Table 2

General characteristics for the genetic study of CXCL12 (SDF-1) and CCL5 (RANTES) gene variants.

Polymorphism	Chr Position	Genotype	Cases	Control	P-value	Cases		P-value	HWE		
						INR	IR		Control	INR	IR
CXCL12 rs1801157 C>T	chr10:44,372,809	CC	144 (68%)	151 (67%)	0.439	64 (67%)	73 (71%)	0.065	0.054	0.33	0.12
		CT	62 (29%)	61 (27%)		27 (28%)	30 (29%)				
		TT	7 (3%)	13 (6%)		5 (5%)	–				
CCL5 rs2280789 T>C	chr17:35,879,999	TT	156 (75%)	176 (80%)	0.177	75 (77%)	73 (74%)	0.812	0.48	0.63	0.43
		TC	47 (23%)	45 (20%)		20 (21%)	23 (23%)				
		CC	5 (2%)	1 (0%)		2 (2%)	3 (3%)				
CCL5 rs2280788 C>G	chr17:35,880,401	CC	205 (95%)	219 (95%)	0.948	98 (95%)	96 (96%)	0.767	1	1	1
		GC	10 (5%)	11 (5%)		5 (5%)	4 (4%)				
CCL5 rs2107538 C>T	chr17:35,880,776	CC	135 (64%)	144 (64%)	0.548	64 (66%)	64 (62%)	0.348	0.41	0.16	1
		CT	66 (31%)	73 (33%)		30 (31%)	31 (30%)				
		TT	11 (5%)	7 (3%)		3 (3%)	8 (8%)				

P-values were calculated by the Chi-square test. HWE, Hardy-Weinberg equilibrium.

4. DISCUSSION

The cytokine-chemokine network is enormously complex with a large number of different involved molecules (ligands, receptors and regulatory proteins, among others) that play fundamental roles in the development and homeostasis of the immune system. [13] Accordingly, the chemokine-chemokine receptor system clearly plays an important role in the HIV life cycle, disease progression, and HIV reservoir establishment, [15–17] presenting new perspective for the development of effective therapeutic approaches in response to HIV/AIDS susceptibility during the last 10 years. [18] In this context, the present study aims to investigate the network associated with the selected CCL chemokines (Fig. 6) which are linked to our previous work focused on immune reconstitution. [9,10] Network modeling elucidated the relationship between glutamate metabolism to CCL2/CCR2, CCL5 and CX3CR1 axis in CD4⁺ T-recovery [9] and we anticipated that the study of IL-7 and its receptor could support new insights regarding T-cell reservoir in HIV-positive participants. [10] Based on these findings we firmly believed that the study of the previously identified chemokines

related to IL-7/IL-7R axis may reveal promising results on immune reconstitution. For that reason, cytokine IL-7 and chemokines CCL2 and CCL5 have been selected as input in the STRING interface to expand the chemokine-chemokine receptor network and to establish which chemokine and chemokine receptor candidates will be included in the present work (Fig. 6). To our knowledge, this is the first work that jointly evaluates this network of chemokines as prognostic and follow-up markers of immune recovery status by determining circulating concentrations and performing a genetic polymorphism study. Concretely, our main findings were that the baseline plasma MCP-1/CCL2 and SDF-1/CXCL12 concentrations accounted for approximately 9% and 4% of the variance of the baseline and 48w cART CD4⁺ T-cell counts, respectively, and that, the CXCL12 rs1801157 was associated with the immune response. Additionally, regarding chemokine receptors, we demonstrated that while CCR2 rs1799864_814 and CCR5 rs1800024 revealed a strong LD, the combination of the different CX3CR1, CCR2 and CCR5 SNPs analyzed in chromosome 3 resulted in two haplotypes that were significantly associated with the immune response according to the CD4⁺ T-cell counts after 48 weeks of cART.

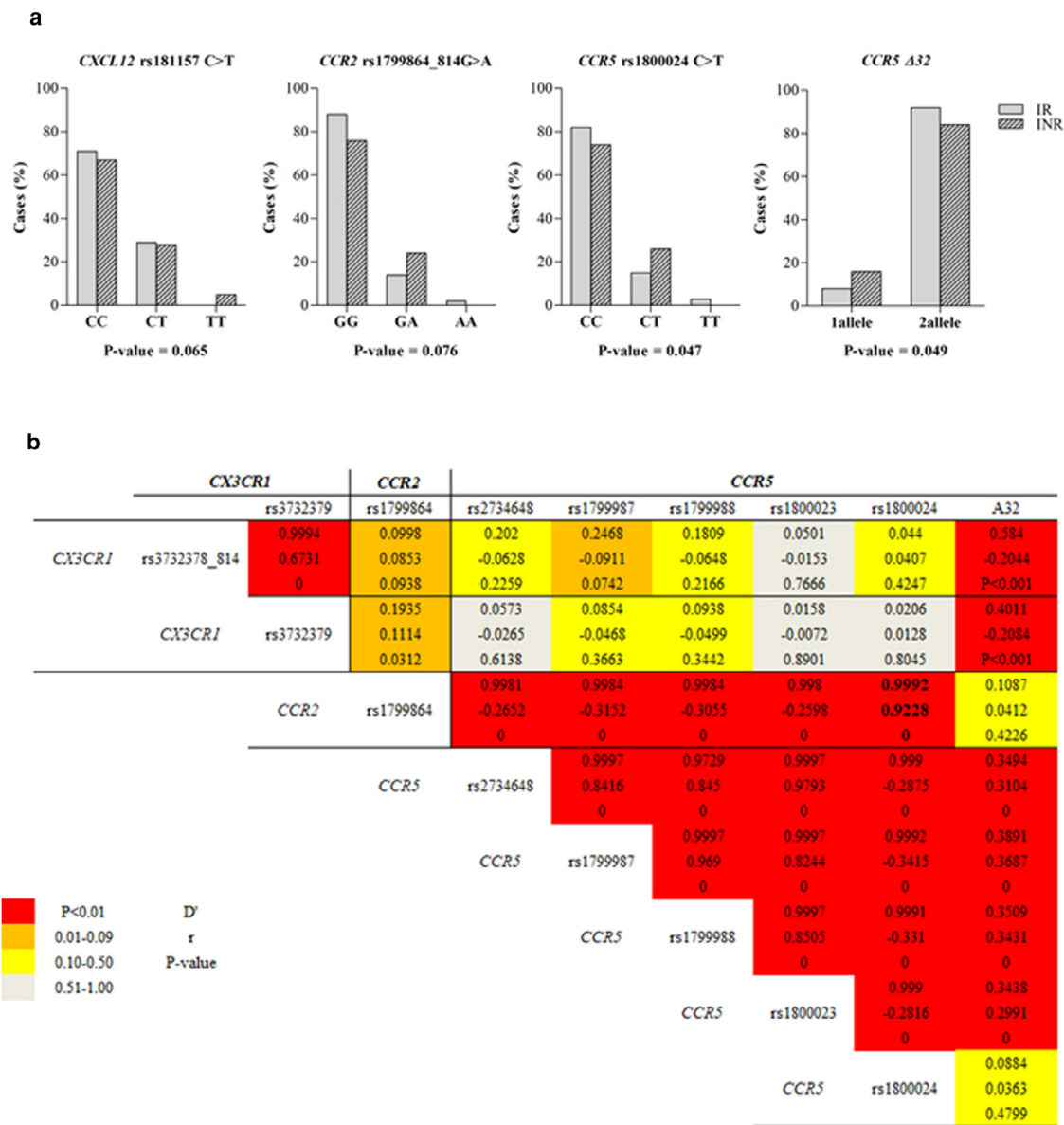


Fig. 4. Genetic association study of selected chemokine and chemokine receptor gene variants. **a)** Distribution of *CXCL12* rs1801157, *CCR2* rs1799864_814, *CCR5* rs1800024 and *CCR5* rs333_814 ($\Delta 32$) among cases ($n = 100$ INR and $n = 100$ in IR) (P-values were calculated by the Chi-square test). **b)** Linkage disequilibrium analysis in cases (INRs versus IRs) for chemokine receptor located on chromosome 3 ($n = 450$) (Multiple SNP-analysis by SNPstats software).

Circulating concentrations of SDF-1/CXCL12 and CCL5/RANTES were higher in cases compared to those in controls at both baseline and after 48w cART, but only SDF-1/CXCL12 was crucial for the differentiation among INRs and IRs. Our results suggest that elevated plasma SDF-1/CXCL12 is a prognostic indicator of low CD4⁺ T-cell counts preceding immune failure in response to cART and a follow-up marker of poor immune reconstitution despite successful virological suppression during cART. Although increased plasma levels of SDF-1/CXCL12 were previously related to HIV infection, [19] data on its role as a prognostic marker of immune status are still scarce. SDF-1/CXCL12 is the most primitive chemokine that regulates development in multiple systems and diverse cell functions, including proliferation and survival in the immune system, through the two known receptors CXCR4 and ACKR3. [13,15,20] Interestingly, the affinity of CXCL12/SDF-1 for CXCR4 correlates well with its action as a suppressor of infection by T-tropic HIV-1

species and its ability to induce CXCR4 internalization. [21] In this context, the observed adverse effect of SDF-1 gene expression on the natural history of HIV-1 disease could be explained by the fact that the SDF-1-3T allele was more likely to be associated with detectable X4- tropic viruses. [22] Consistent with these data, we observed that the expression of the *CXCL12* gene influenced circulating SDF-1 concentrations in IRs, and according to Restrepo et al., [23] the expression of *CXCL12* rs1801157 TT genotypes was associated with a higher probability of CD4 T-cell recovery failure in HIV patients despite complete viral suppression with cART. In fact, we observed that all cases included in the study carrying the *CXCL12* rs1801157 TT genotypes were associated with INRs, and in contrast, the number of participants carrying the *CXCL12* rs1801157 CC genotypes were higher in the group of IRs compared to the group of INRs ($P = 0.065$). By using the HaploReg software, we found that the *CXCL12* rs1801157 is in high LD with SNPs involved

Table 3

Association between *CXCL12* and *CCL5* gene variants to immunological recovery status after 48 weeks of cART.

Polymorphism	IHT model	Genotype	INR	IR	OR (95% CI)	P-value	AIC	BIC
A) <i>CXCL12</i> rs1801177 was associated to the immune recovery status after 48 weeks of cART. Data analysis is summarized with n (%), odds ratio (OR) and 95% confidence interval (CI). The AIC and BIC values were used to choose the inheritance model (IHT) (adjusted by baseline CD4 ⁺ T-cell counts) that best fits the data. AIC, Akaike Information Criteria; BIC, Bayesian Information Criteria.								
rs1801157 C>T	Codominant	C/C	64 (66.7%)	73 (70.9%)	1.00	0.038	249.6	262.8
		C/T	27 (28.1%)	30 (29.1%)	0.86 (0.44–1.68)			
		T/T	5 (5.2%)	0 (0%)	0.00 (0.00-NA)			
	Dominant	C/C	64 (66.7%)	73 (70.9%)	1.00	0.34	253.3	263.2
		C/T-T/T	32 (33.3%)	30 (29.1%)	0.73 (0.38–1.39)			
	Recessive	C/C–C/T	91 (94.8%)	103 (100%)	1.00	0.012	247.8	257.7
		T/T	5 (5.2%)	0 (0%)	0.00 (0.00-NA)			
	Overdominant	C/C-T/T	69 (71.9%)	73 (70.9%)	1.00	0.82	254.1	264
		C/T	27 (28.1%)	30 (29.1%)	0.93 (0.48–1.80)			
	B) Linkage disequilibrium analysis for <i>CCL5</i> gene variants.							
rs2280789- rs2280788	0.9965	0.4176	< 0.001	0.9964	0.3794	< 0.001		
rs2280789- rs2107538	0.9995	0.7398	< 0.001	0.9995	0.7723	< 0.001		
rs2280789- rs2107538	0.9961	0.3090	< 0.001	0.9961	0.2931	< 0.001		

in the promotion and enhancement of histone marks and motif changes. In the light of these results, protective role of the *CXCL12* rs1801157 C-allele and CC genotype in chronic lymphocytic leukaemia development was observed, whereas the presence of the T variant was linked with the higher risk of the disease as well as impaired response to the therapy independently of the regimen used. Interestingly, the presence of the *CXCL12* rs1801157 variant may be related with a decrease of *CXCL12* and increase of its receptor (*CXCR4*) mRNA expression levels. [24]

The other chemokine that played a potential role in immune reconstitution was MCP-1/CCL2; increased baseline values were a

good marker of poor immune prognosis, accounting for approximately 3% of the variance in CD4⁺ T cells after 48 weeks of treatment. MCP-1/CCL2 is an inflammatory chemokine produced by several types of cells and a chemoattractant for CD4⁺ T cells, monocytes/macrophages, and NK cells, recruiting them to the sites of infection and inflammation. [13,15] High *CCL2/CCR2* levels were previously linked to several HIV-associated disorders through leukocyte recruitment and maintenance of the inflammatory status, [13,15,16,25] but their association with previous poor immune reconstitution in HIV participants on ART has been poorly studied, and the results remain unclear. In the present study, we found an association between the *CCR2*

Table 4

General characteristics for the genetic study of *CX3CR1*, *CCR2* and *CCR5* gene variants.

Polymorphism	Chr Position	Genotype	Cases	Control	P-value	Cases		P-value	HWE		
						INR	IR		Control	INR	IR
CX3CR1rs3732378_814 G>A	chr3:39,265,671	GG	153 (73%)	171 (76%)	0.379	68 (72%)	78 (76%)	0.517	0.55	0.68	1
		GA	54 (26%)	49 (22%)		26 (27%)	23 (23%)				
		AA	2 (1%)	5 (2%)		1 (1%)	1 (1%)				
CX3CR1 rs3732379 C>T	chr3:39,265,765	CC	111 (54%)	118 (55%)	0.733	47 (51%)	58 (58%)	0.347	0.49	0.28	0.59
		CT	83 (4%)	80 (37%)		41 (45%)	35 (35%)				
		TT	11 (5%)	17 (8%)		4 (4%)	7 (7%)				
		GG	175 (82%)	184 (83%)		74 (76%)	88 (85%)				
GA	37 (17%)	37 (17%)	23 (24%)	14 (13%)							
AA	2 (1%)	2 (1%)	–	2 (2%)							
CCR5 rs2734648 G>T	chr3:46,370,349	GG	78 (38%)	76 (34%)	0.583	34 (37%)	40 (40%)	0.919	0.58	1	1
		GT	96 (47%)	104 (47%)		44 (47%)	46 (46%)				
		TT	31 (15%)	42 (19%)		15 (16%)	14 (14%)				
CCR5 rs1799987 A>G	chr3:46,370,444	AA	59 (28%)	58 (26%)	0.565	26 (27%)	28 (27%)	0.946	0.79	0.54	1
		AG	107 (51%)	109 (49%)		52 (54%)	52 (51%)				
		GG	44 (21%)	56 (25%)		19 (20%)	22 (22%)				
CCR5 rs1799988 C>T	chr3:46,370,768	CC	59 (30%)	62 (28%)	0.842	28 (30%)	28 (30%)	0.851	0.34	1	1
		CT	98 (49%)	102 (47%)		47 (51%)	46 (49%)				
		TT	41 (21%)	55 (25%)		18 (19%)	20 (21%)				
		AA	82 (40%)	85 (38%)		36 (38%)	42 (42%)				
AG	92 (45%)	107 (45%)	43 (46%)	44 (44%)							
GG	31 (15%)	38 (17%)	15 (16%)	14 (14%)							
CCR5 rs1800024 C>T	chr3:46,371,068	CC	169 (79%)	181 (82%)	0.749	70 (74%)	86 (82%)	0.047	1	0.36	0.08
		CT	41 (19%)	38 (17%)		25 (26%)	16 (15%)				
		TT	3 (1%)	2 (1%)		–	3 (3%)				
		AA	26 (13%)	22 (10%)		15 (16%)	8 (8%)				
2 alleles (AB)	108 (87%)	201 (90%)	76 (84%)	95 (92%)							

Table 5 Haplotype association analysis for the chemokine receptor variants explored in this study with immune recovery status (n = 207). The logistic regression model was adjusted by baseline pre-cART CD4⁺ T-cell counts.

	Haplotype frequencies estimation (n = 207)												Haplotype association with response (n = 207, adjusted by CD4b)		
	CX3CR1			CCR2			CCR5			Δ32			Freq	OR (95% CI)	P-value
	rs3732378	rs3732379	rs1799864	rs2734648	rs1799987	rs1799988	rs1800023	rs1800024	Δ32	INR	IR				
1	G	C	G	T	G	T	C	C	B	0.2237	0.1974	0.2165	1.00	-	
2	G	C	G	G	A	C	C	C	A	0.1821	0.2123	0.1899	0.39 (0.10–1.44)	0.16	
3	G	C	G	G	A	C	C	C	B	0.104	0.0808	0.1019	0.54 (0.15–1.94)	0.35	
4	G	C	G	T	G	T	C	C	A	0.0930	0.1045	0.0886	0.12 (0.02–0.94)	0.044	
5	A	T	G	G	A	C	C	C	A	0.1002	0.0622	0.0688	0.11 (0.02–0.61)	0.013	
6	G	T	G	G	A	C	C	C	A	0.0343	0.0552	0.0578	1.06 (0.25–4.56)	0.94	

For the Δ32 analyses, the homozygous genotype (1 allele) was described as AA and the heterozygous genotype (2 alleles) was described as AB. Only haplotype association with response that showed more than 0.05 frequencies was considered for the results.

rs1799864_814 AG genotype and the probability of presenting poor immune reconstitution after cART, which corroborates the recent work presented by Restrepo et al. [23] By using HaploReg software, we found that CCR2 rs1799864 is in very high LD with numerous SNPs implicated in the promotion and enhancement of histone marks, protein binding and motif changes. In fact, the stability or expression of CCR2 was previously related to Alzheimer's disease (AD) and mild cognitive impairment (MCI) as a consequence of higher MCP-1 levels associated with the A allele of CCR2 rs1799864. [26]

The CCR5 chemokine receptor receives great attention in the context of viral infection due to its role as an HIV-1 coreceptor [27] and because it is a natural ligand of multiple chemokines, including MIP-1α/CCL-3, MIP-1β/CCL-4, and RANTES/CCL-5. [27–29] In fact, chemokine receptors are firmly considered important therapeutic targets for the treatment of many human diseases, [30] and the dual CCR5/CCR2 targeting is emerging as a therapeutic strategy for complex human diseases, including HIV infection. [29] We found that the Δ32 homozygous genotype was related to poor immune recovery status and that the CCR5 rs1800024 CT polymorphism was significantly associated with INRs. CCR5Δ32 exerts a robust phenotypic effect on CCR5, [28] and CCR5Δ32 mutations were previously associated with differential gene expression which in most cases is critical for the immune response. [31] Moreover, the most interesting agreement with the literature is the synergy between CCR2 rs1799864_814 and CCR5 rs1800024, both located on chromosome 3. Mutations in CCR2 rs1799864 and CCR5 rs1800024 were found to predict HIV transmission, [32] but nothing has been described in relation to immune recovery status until now. The multiple SNP analysis showed a high LD between CCR2 rs1799864_814 and CCR5 rs1800024, and the expression of the CCR2 rs1799864_814 AG genotype was significantly related to increased plasma RANTES concentrations in INR participants. In this context, our data also revealed that the alleles of different genes in the same chromosome are inherited together more often than would be expected by chance. Notably, two haplotypes (GCGTGTGCA and ATGGACACA) resulting from combined CX3CR1, CCR2 and CCR5 chemokine receptor gene expression were associated with the immune response based on the CD4⁺ T-cell counts after 48 weeks of cART. Taken all together, our data supports the proof-of-concept studies of experimental chemokine receptors as promising candidates for advanced clinical trials. From the three chemokine antagonist that have been approved yet, one of them is a non-competitive allosteric that targets the chemokine recognition site 2 of CCR5 to stabilize the chemokine receptor in an inactive conformation. [30] It is Maraviroc, a small well-tolerated molecule approved by the US FDA to treat HIV-1 infection with special interest in participants with CCR5 tropism because their capability to prevent the binding of chemokine and HIV gp120. Additionally, other phase 3 trials are ongoing to evaluate this capability of CCR5 to be a potential therapeutic candidate (e.g. leronlimab or cenicriviroc), but of interest is cenicriviroc. Cenicriviroc is a well-tolerated dual CCR2 and CCR5 antagonist that has been evaluated for the treatment of liver fibrosis in HIV-negative adults with alcoholic steatohepatitis (AURORA study). In fact, promising data suggest that cenicriviroc could improve hepatic inflammation, insulin resistance and liver fibrosis by the inhibition of CCR2 monocyte recruitment which directly affects CCL2 signaling.

A limitation of our study is that the number of patients per group in genetic studies is not consistent with the number of samples available for the study of circulating chemokine-chemokine receptor concentrations, which would make our results more consistent in the search for predictive and diseases progression markers. Recently, Norris et al. [33] also evaluated serum levels of 30 different cytokines (including 17 chemokines) at baseline and at one and two years after viral control to determine whether cytokine levels correlated with INR status, and minimal differences were observed between INRs and

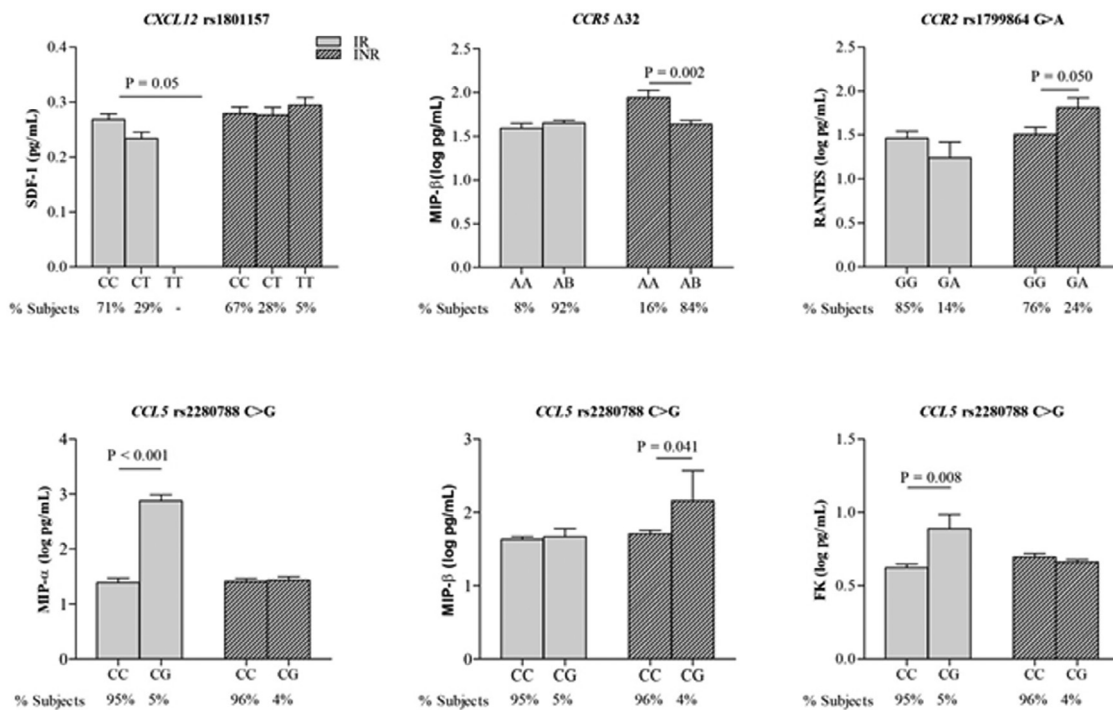


Fig. 5. Influence of chemokine receptor genes in circulating chemokine concentrations in INRs compared to IRs. Data are represented as the mean±SD (One-Way ANOVA testing for association between listed parameters and SNP genotypes).

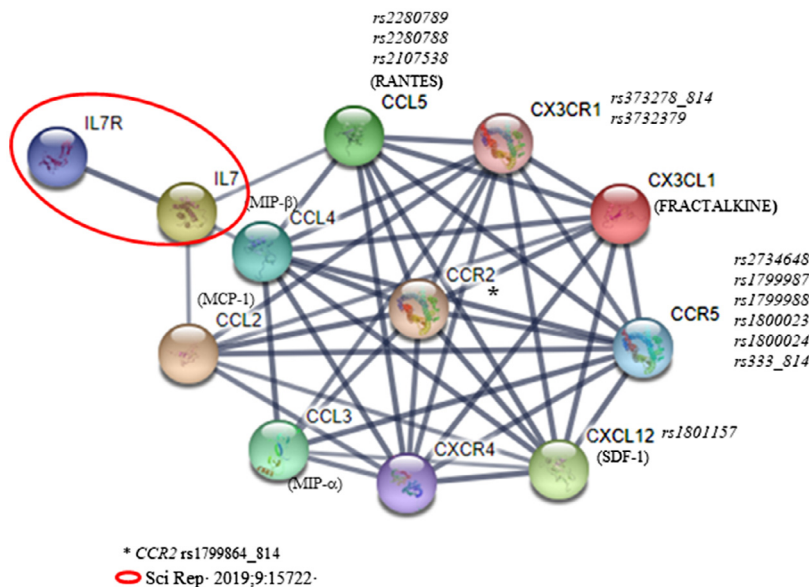


Fig. 6. Chemokine-chemokine receptor interaction analysis based on previously available data [9,10] using the STRING database [38]. The cytokine IL-7 and chemokines CCL2 to CCL5 have been selected as input, expanded by an additional 5 proteins in the STRING interface and the confidence cut-off for showing interactions links has been set to high confidence (0.700).

INRs. The study was performed in a group of 50 INRs compared to 50 IRs from the Women’s Interagency HIV Study and only circulating levels were tested. Thus, the present work is the largest study evaluating circulating chemokine levels and their association to genetic chemokine and chemokine receptor variants ever done. Another characteristic of the present study was that lower pre-cART CD4⁺ T cell counts median values in INR subjects can be observed compared to IR subjects, probably due to the relevance of the CD4⁺ T-cell count before cART onset as an intrinsic risk factor of immune failure to cART as previously described. [9,10] On the other hand, we did not

include CCL3L1–CCL4L1 copy number variation (CVN) due to their complexity and controversial association to HIV infection. Ahuja et al. [34] postulated that variations in the CCL3L1–CCR5 axis influences the recovery of CD4⁺ T-cell counts and that the greatest impact of these genotypes appears to be on sustaining the initial CD4⁺T-cell gains after two years of cART in individuals initiating cART at more than 350 CD4⁺ T-cell counts. Thus, because our study design classified participants by their initial CD4⁺T-cell count, we considered that in this study CCL3L1–CCL4L1 CVN results would be biased by the study design.

In conclusion, taken together, our data corroborated that the chemokine-chemokine receptor system is more complex than indicated by the study of a selected chemokine and its natural ligands due to the network existing among the different chemokines and their receptors. We want to highlight that some therapeutic strategies involving the use of chemokine inhibitors (e.g. IL-2, IL-7) has already been tested but unfortunately the results obtained are still so far away to be effective. Thus, it is very likely that new individual or combinatorial approaches including cytokines and/or chemokines with immune checkpoint blockage are needed to achieve complete immune recovery status in poor immune recovery HIV-positive patients. In the present study, we suggest that the SDF-1/CXCL12, MCP-1/CCL-2 and CCR5 receptors are key effectors of susceptibility to HIV progression, especially in terms of immune reconstitution. Circulating concentrations and gene expression patterns of SDF-1/CXCL12 (*CXCL12* rs1801157) and MCP-1/CCL2 (*CCR2* rs1799864_814) are associated with immune recovery status and could be considered prognostic markers of immune failure despite cART. In fact, circulating concentrations of SDF-1 at 48 weeks of cART follow-up could be considered a marker of disease progression, whereas an increase in MCP-1 values could denote a decline in the CD4⁺ T-cell count. Thus, it is not surprising that targeting CXCL12/CXCR4 axis in tumor immunotherapy has emerged because of its critical role in the regulation of cancer stem cells, and in the activation of multiple signaling pathways (ERK1/2, ras, p38 MAPK, PLC/ MAPK, and SAPK/ JNK) for tumor initiation and progression. [35] Pharmacological inhibition of MCP-1/CCL2 with Spiegelmer mNOX-E36, a mirror-image oligonucleotide with good tolerability, has been investigated as adjunct immunosuppressive therapy in transplantation by their ability to bind to a relevant target molecule in a manner conceptually similar to the way antibodies recognize antigens. [36] Of interest, dual blockade of CCL2/MCP-1 and CXCL12/SDF-1 revealed additive therapeutic effects in murine proliferative lupus nephritis because the anti-inflammatory effects caused by CCL2/MCP-1 blockage and the glomerular filtration barrier protection due to CXCL12/SDF-1 inhibition. [37] Regarding CCR5 gene variants, only *CCR5* rs1800024 and *CCR5* rs333_814 ($\Delta 32$) were related to immune recovery, but interestingly, strong LD between *CCR2* rs1799864_814 and *CCR5* rs1800024 indicates that these alleles of each gene are inherited together more often than would be expected by chance. In summary, our results open a new window to proof-of-concept studies for chemokines (SDF-1/CXCL12 and MCP-1/CCL-2) and chemokine receptors (*CCR2* and *CCR5*) blockage as potential therapeutic options for advanced clinical trials with promising fortunate outcomes.

Further investigation to clarify the synergy between the expression of different chemokines and chemokine receptors could provide new insights regarding the mechanisms implicated in the immune reconstitution, which could be exploited for emerging therapeutic strategies in INRs.

Data availability

The datasets used and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Funding

This work was supported by the Fondo de Investigación Sanitaria [PI10/02635, PI13/0796, PI14/0063, PI14/0700, PI16/00503, PI17/0420, PI17/0498, PI18/01216, PI19/01337 and PI20/00326]-ISCIII-FEDER (co-funded by the European Regional Development Fund/European Social Fund; "A way to make Europe"/"Investing in your future"); Programa de Suport als Grups de Recerca AGAUR (2014SGR250, 2017SGR948); Gilead Fellowship Program GLD14/293and GLD19/00,008; and The SPANISH AIDS Research Network [RD12/0017/0005, RD16/0025/0002, RD16/0025/0006, RD16/0025/

0019]-ISCIII-FEDER (Spain). FV is supported by grants from the Programa de Intensificación de Investigadores (INT20/00031)-ISCIII. PD is supported by grants from the Programa de Intensificación de Investigadores (INT19/00036)-ISCIII. YMP is supported by the Servicio Andaluz de Salud through Programa Nicolás Monardes (C-0013/17). JVG is supported by the Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) under grant agreement "FI19/00330" through the program "Contratos Predoctorales de Formación en Investigación en Salud". EY is supported by the Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) under grant agreement "FI20/00118" through the program "Contratos Predoctorales de Formación en Investigación en Salud". LR is supported by the Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) under grant agreement "CD20/00105" through the program "Sara Borrell". AR is supported by a grant from the Acció Instrumental d'incorporació de científics i tecnòlegs (PERIS SLT002/16/00,101), Departament de Salut, Generalitat de Catalunya, by IISPV through the project "2019/IISPV/05" (Boosting Young Talent), by GeSIDA through the "III Premio para Jóvenes Investigadores 2019" and by the Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) under grant agreement "CP19/00,146" through the Miguel Servet Program.

Author contributions

All authors have seen and approved the submitted version of the manuscript. The authors' contributions are as follows: experimental design (EY, CV, PD, FV, JP, AR) and intellectual guidance (PD, YMP, SV, VF); recruitment of participants (EY, CV, PD, AC, SV, AI, VF, JM, JP) and sample procurement (EY, AC, VA, MV, AM); data collection (CV, JV-G, MP, CP, JM, LR); data analysis and interpretation (EY, VA, JM, LR, AR); manuscript preparation (EY, JM, LR, AR). EY, CV, PD, FV, JP and AR were responsible for the study design, data analysis, and article development. PD, YMP, VF, JM, FV, JP and AR reviewed and edited the manuscript.

Declaration of Competing interest

All authors declare they do not have anything to disclose regarding conflict of interest with respect to this manuscript.

Acknowledgments

This study would not have been possible without the collaboration of all the patients and medical and nursing staff who have taken part in the project. We also acknowledge the BioBanc IISPV (B.0000853 + B.0000854) integrated in the Spanish National Biobanks Platform (PT13/0010/0029 & PT13/0010/0062) for its collaboration. Authors greatly appreciate the comments and criticisms of the anonymous reviewers that greatly helped to improve the manuscript.

References

- [1] Battegay M, Nüesch R, Hirschel B, Kaufmann GR. Immunological recovery and antiretroviral therapy in HIV-1 infection. *Lancet Infect Dis* 2006;6:280–7.
- [2] Yang X, Su B, Zhang X, Liu Y, Wu H, Zhang T. Incomplete immune reconstitution in HIV/AIDS patients on antiretroviral therapy: challenges of immunological non-responders. *J. Leukoc. Biol.* 2020;107:597–612.
- [3] Gaardbo JC, Hartling HJ, Gerstoft J, Nielsen SD. Incomplete immune recovery in HIV infection: mechanisms, relevance for clinical care, and possible solutions. *Clin Dev Immunol* 2012;2012:670957.
- [4] Aldrete S, Jang JH, Easley KA, Okulicz J, Dai T, Chen YN, et al. CD4 rate of increase is preferred to CD4 threshold for predicting outcomes among virologically suppressed HIV-infected adults on antiretroviral therapy. *PLoS ONE* 2020;15:1–16.
- [5] Pacheco YM, Jarrin I, Rosado I, Campins AA, Berenguer J, Iribarren JA, et al. Increased risk of non-AIDS-related events in HIV subjects with persistent low CD4 counts despite cART in the CoRIS cohort. *Antiviral Res.* 2015;117:69–74.
- [6] Buggert M, Nguyen S, McLane LM, Steblyanko M, Anikeeva N, Paquin-Proulx D, et al. Limited immune surveillance in lymphoid tissue by cytolytic CD4⁺ T cells during health and HIV disease. *PLoS Pathog.* 2018;14:1–28.
- [7] Rosado-Sánchez I, I H-F, Al A-R, M G, MA A-C, E R-M, et al. A Lower Baseline CD4/CD8 T-Cell Ratio Is Independently Associated with Immunodiscordant Response

- to Antiretroviral Therapy in HIV-Infected Subjects. *Antimicrob Agents Chemother* 2017;61:8–13.
- [8] Rosado-Sánchez I, Herrero-Fernández I, Tarancon-Diez L, Moreno S, Iribarren JA, Dalmau D, et al. Increased frequencies of Th17 cells and IL17a-producing regulatory T-cells preceding the immunodiscordant response to antiretroviral treatment. *Journal of Infection* 2018;76:86–92.
- [9] Rosado-Sánchez I, Rodríguez-Gallego E, Peraire J, Viladés C, Herrero P, Fanjul F, et al. Glutaminolysis and lipoproteins are key factors in late immune recovery in successfully treated HIV-infected patients. *Clin Sci* 2019;133:997–1010.
- [10] Ceausu A, Rodríguez-Gallego E, Peraire J, López-Dupla M, Domingo P, Viladés C, et al. IL-7/IL-7R gene variants impact circulating IL-7/IL-7R homeostasis and ART-associated immune recovery status. *Sci Rep* 2019;9:1–10.
- [11] Arnold KB, Szeto GL, Alter G, Irvine DJ, Lauffenburger DA. CD4 + T cell–dependent and –independent cytokine-chemokine network changes in the immune responses of HIV-infected individuals HHS Public Access illustrate a broad approach for identifying key disease-associated nodes in a multicellular, multivariate sign. 2015;8. doi:10.1126/scisignal.aab0808.
- [12] Valdívia A, Ly J, Gonzalez L, Hussain P, Saing T, Islamoglu H, et al. Restoring Cytokine Balance in HIV-Positive Individuals with Low CD4 T Cell Counts. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 2017;33:905–18.
- [13] Hughes CE, Nibbs RJB. A guide to chemokines and their receptors. *FEBS Journal* 2018;285:2944–71.
- [14] Solé X, Guinó E, Valls J, Iniesta R, Moreno V. SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics* 2006;22:1928–9.
- [15] Wang Z, Shang H, Jiang Y. Chemokines and chemokine receptors: accomplices for human immunodeficiency virus infection and latency. *Front Immunol* 2017;8:1–12.
- [16] Chatterjee A, Rathore A, Vidyant S, Kakkar K, Dhole TN. Chemokines and Chemokine Receptors in susceptibility to HIV-1 infection and progression to AIDS. *Dis. Markers* 2012;32:143–51.
- [17] Evans VA, Khoury G, Saleh S, Cameron PU, Lewin SR. HIV persistence: chemokines and their signalling pathways. *Cytokine Growth Factor Rev* 2012;23:151–7.
- [18] Lusso P. New EMBO Member's Review - HIV and the chemokine system: 10 years later. *EMBO J* 2006;25:447–56.
- [19] Soriano A, Martínez C, García F, Plana M, Palou E, Lejeune M, et al. Plasma Stromal Cell–Derived Factor (SDF)-1 Levels, SDF1-3'A Genotype, and Expression of CXCR4 on T Lymphocytes: their Impact on Resistance to Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection and Its Progression. *J. Infect. Dis.* 2002;186:922–31.
- [20] Murphy Philip M, Heusinkveld L. Multisystem multitasking by CXCL12 and its receptors CXCR4 and ACKR3. *Cytokine* 2018;109:2–10.
- [21] Arenzana-Seisdedos F. SDF-1/CXCL12: a chemokine in the life cycle of HIV. *Front Immunol* 2015;6:10–3.
- [22] Daar ES, Lynn HS, Donfield SM, Lail A, O'Brien SJ, Huang W, et al. Stromal Cell–Derived Factor–1 Genotype, Coreceptor Tropism, and HIV Type 1 Disease Progression. *J. Infect. Dis.* 2005;192:1597–605.
- [23] Restrepo C, Gutierrez-Rivas M, Pacheco YM, García M, Blanco J, Medrano LM, et al. Genetic variation in CCR2 and CXCL12 genes impacts on CD4 restoration in patients initiating cART with advanced immunosuppression. *PLoS ONE* 2019;14:1–13.
- [24] Butrym A, Gebura K, Iwaszko M, Kuliczowski K, Bogunia-Kubik K, Mazur G. Dual role of the CXCL12 polymorphism in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Hla* 2016;87:432–8.
- [25] Angela Covino D, Sabbatucci M, Fantuzzi L. The CCL2/CCR2 Axis in the Pathogenesis of HIV-1 Infection: a New Cellular Target for Therapy? *Curr Drug Targets* 2015;17:76–110.
- [26] Lee WJ, Liao YC, Wang YF, Lin IF, Wang SJ, Fuh JL. Plasma MCP-1 and cognitive decline in patients with Alzheimer's disease and mild cognitive impairment: a two-year follow-up study. *Sci Rep* 2018;8:4–11.
- [27] Barmania F, Pepper MS. C-C chemokine receptor type five (CCR5): an emerging target for the control of HIV infection. *Applied and Translational Genomics* 2013;2:3–16.
- [28] Ellwanger JH, Kulmann-Leala B, Kaminska V de L, Rodrigues AG, Bragatte MA de S, Chies JAB. Beyond HIV infection: neglected and varied impacts of CCR5 and CCR5Δ32 on viral diseases. *Virus Res.* 2020;286:198040.
- [29] Fantuzzi L, Tagliamonte M, Gauzzi MC, Lopalco L. Dual CCR5/CCR2 targeting: opportunities for the cure of complex disorders. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2019;76:4869–86.
- [30] Miao M, De Clercq E, Li G. Clinical significance of chemokine receptor antagonists. *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology* 2020;16:11–30.
- [31] Hütter G, Neumann M, Nowak D, Klein S, Klüter H, Hofmann WK. The effect of the CCR5-delta32 deletion on global gene expression considering immune response and inflammation. *J. Inflamm.* 2011;8:29.
- [32] Zhu Q, Zhu P, Zhang Y, Li J, Ma X, Li N, et al. Analysis of social and genetic factors influencing heterosexual transmission of HIV within serodiscordant couples in the henan cohort. *PLoS ONE* 2015;10:1–13.
- [33] Norris PJ, Zhang J, Worlock A, Nair SV, Anastos K, Minkoff HL, et al. Systemic cytokine levels do not predict CD4+ T-cell recovery after suppressive combination antiretroviral therapy in chronic human immunodeficiency virus infection. *Open Forum Infect Dis* 2016;3:1–9.
- [34] Ahuja SK, Kulkarni H, Catano G, Agan BK, Camargo JF, He W, et al. CCL3L1-CCR5 genotype influences durability of immune recovery during antiretroviral therapy of HIV-1-infected individuals. *Nat. Med.* 2008;14:413–20.
- [35] Zhou W, Guo S, Liu M, Burow ME, Wang G, District H, et al. HHS Public Access. 2019;26:3026–41.
- [36] Kalnins A, Thomas MN, Andrassy M, Müller S, Wagner A, Pratschke S, et al. Spiegelmer Inhibition of MCP-1/CCR2 - Potential as an Adjunct Immunosuppressive Therapy in Transplantation. *Scand. J. Immunol.* 2015;82:102–9.
- [37] Devarapu SK, Kumar VR S, Rupanagudi KV, Kulkarni OP, Eulberg D, Klusmann S, et al. Dual blockade of the pro-inflammatory chemokine CCL2 and the homeostatic chemokine CXCL12 is as effective as high dose cyclophosphamide in murine proliferative lupus nephritis. *Clinical Immunology* 2016; 169:139–47.
- [38] Szklarczyk D, Gable AL, Lyon D, Junge A, Wyder S, Huerta-Cepas J, et al. STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Res.* 2019;47:D607–13.

Estudio 2:

Adipokines as New Biomarkers of Immune Recovery: Apelin Receptor, RBP4 and ZAG Are Related to CD4⁺ T-Cell Reconstitution in PLHIV on Suppressive Antiretroviral Therapy

International Journal of Molecular Science 2022, 23, 2202

Las adipoquinas son citoquinas producidas principalmente por los adipocitos, y tienen una función paracrina y autocrina, siendo elementos clave en la regulación de la respuesta inmune. En este artículo, se analizó el papel de las adipoquinas en la regulación de la respuesta inmune y sus concentraciones tanto a nivel basal como durante el seguimiento. Las adipoquinas estudiadas fueron la adiponectina, apelina y su receptor, fatty acid-binding protein 4 (FABP4), leptina, omentina, retinol-binding protein 4 (RBP4), resistina, vaspina y zinc-alfa-2-glicoproteína (ZAG). Se empleó un esquema similar al artículo anterior, de modo que 221 pacientes naïve, fueron clasificados como casos o controles según los valores basales de T-CD4⁺ (casos si T-CD4⁺ ≤200 células/μL y controles si T-CD4⁺ >200 células/μL). Los casos a su vez se clasificaron según su respuesta inmune a las 144 semanas de iniciar el TAR como Inmunológicamente respondedores (IR, si T-CD4⁺ ≥250 células/μL) o inmunológicamente no respondedores (INR, si T-CD4⁺ <250 células/μL). De esta manera, se analizaron las concentraciones de las adipoquinas mencionadas a nivel basal, a las 48 semanas y a las 144 semanas.

A nivel basal, los INR mostraron una mayor frecuencia de hipertensión arterial, y un recuento de T-CD4⁺ y ratio CD4/CD8 menores. A nivel basal y a las 144 semanas, los INR presentaban concentraciones inferiores de receptor de apelina y ZAG que los IR, lo que sugiere que concentraciones plasmáticas bajas de estas adipoquinas además de predecir una respuesta inmune discordante son marcadores de progresión de la enfermedad.

Para validar los resultados, los pacientes clasificados como casos fueron reclasificados en dos grupos en función de la ganancia de T-CD4⁺ a las 144 semanas: grupo A los pacientes que recuperaron ≥100 células/μL y grupo B los que recuperaron <100 células/μL. Los pacientes del grupo A mostraron concentraciones más bajas de receptor de apelina y RBP4, lo que valida el receptor de apelina como un marcador predictivo de mala respuesta inmunológica. Por último, se observó que tras el inicio del TAR, las concentraciones de FABP4 aumentaron significativamente en todos los grupos de pacientes.

En conclusión, el receptor de la apelina, RBP4 y ZAG se relacionan con la reconstitución de T-CD4⁺ en personas con VIH con correcta supresión virológica.



Article

Adipokines as New Biomarkers of Immune Recovery: Apelin Receptor, RBP4 and ZAG Are Related to CD4⁺ T-Cell Reconstitution in PLHIV on Suppressive Antiretroviral Therapy

Elena Yeregui ^{1,2,3,4}, Jenifer Masip ^{1,3,4}, Consuelo Viladés ^{1,2,3,4}, Pere Domingo ⁵ , Yolanda M. Pacheco ^{6,7}, Julià Blanco ^{4,8,9,10} , Josep Mallolas ^{4,11}, Verónica Alba ^{1,3,4}, Montserrat Vargas ^{1,4}, Graciano García-Pardo ^{1,2,3,4}, Eugènia Negredo ^{4,10,12}, Montserrat Olona ^{1,3,4} , Judit Vidal-González ¹³, Maria Peraire ³, Anna Martí ^{1,2,4}, Laia Reverté ^{1,2,3,4} , Frédéric Gómez-Bertomeu ^{1,3,4} , Manuel Leal ¹⁴, Francesc Vidal ^{1,2,3,4,*}, Joaquim Peraire ^{1,2,3,4,†} and Anna Rull ^{1,2,3,4,*}

¹ Infection and Immunity Research Group (INIM), Hospital Universitari de Tarragona Joan XXIII (HJ23), 43005 Tarragona, Spain; elena.yeregui@iispv.cat (E.Y.); jenifer.masip@urv.cat (J.M.);

cvilades.hj23.ics@gencat.cat (C.V.); veronica.alba@urv.cat (V.A.); mvargas.hj23.ics@gencat.cat (M.V.); ggarcia.hj23.ics@gencat.cat (G.G.-P.); molona.hj23.ics@gencat.cat (M.O.); anna.marti@iispv.cat (A.M.); laia.reverte@iispv.cat (L.R.); ffgomez.hj23.ics@gencat.cat (F.G.-B.); jperaire@comt.es (J.P.)

² Institut Investigació Sanitària Pere Virgili (IISPV), 43005 Tarragona, Spain

³ Infection and Immunity Research Group (INIM), Universitat Rovira i Virgili (URV), 43003 Tarragona, Spain; mperairelores@gmail.com

⁴ CIBER Enfermedades Infecciosas (CIBERINFEC), Instituto de Salud Carlos III, 28029 Madrid, Spain; jblanco@irsicaixa.es (J.B.); mallolas@clinic.cat (J.M.); enegredo@flsida.org (E.N.)

⁵ Infectious Diseases Unit, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, 08025 Barcelona, Spain; pdomingo@santpau.cat

⁶ Laboratory of Immunology, Institute of Biomedicine of Seville, IBI, 41013 Seville, Spain; ypacheco-ibis@us.es

⁷ UGC Clinical Laboratories, Virgen del Rocío University Hospital/CSIC/University of Seville, 41013 Seville, Spain

⁸ IrsiCaixa AIDS Research Institute, 08916 Badalona, Spain

⁹ Germans Trias i Pujol Research Institute (IGTP), Can Ruti Campus, 08916 Badalona, Spain

¹⁰ Infectious Diseases and Immunity, Faculty of Medicine, Universitat de Vic-Universitat Central de Catalunya (UVic-UCC), 08500 Vic, Spain

¹¹ HIV Unit and Infectious Diseases Service, Hospital Clinic-IDIBAPS, 08036 Barcelona, Spain

¹² Fundació de la Lluita contra les Infeccions, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, 08916 Badalona, Spain

¹³ Universitat de Barcelona (UB), 08007 Barcelona, Spain; judit.vidal.gonzalez@gmail.com

¹⁴ Internal Medicine Service, Hospital Viamed Santa Ángela de la Cruz, 41014 Seville, Spain; mleal@telefonica.net

* Correspondence: fvidalmarsal.hj23.ics@gencat.cat (F.V.); anna.rull@iispv.cat (A.R.)

† These authors contributed equally to this paper, and should both be considered as senior co-authors.



Citation: Yeregui, E.; Masip, J.; Viladés, C.; Domingo, P.; Pacheco, Y.M.; Blanco, J.; Mallolas, J.; Alba, V.; Vargas, M.; García-Pardo, G.; et al. Adipokines as New Biomarkers of Immune Recovery: Apelin Receptor, RBP4 and ZAG Are Related to CD4⁺ T-Cell Reconstitution in PLHIV on Suppressive Antiretroviral Therapy. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 2202. <https://doi.org/10.3390/ijms23042202>

Academic Editor: Aurora Daniele

Received: 13 January 2022

Accepted: 10 February 2022

Published: 17 February 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: A significant proportion of people living with HIV (PLHIV) who successfully achieve virological suppression fail to recover CD4⁺ T-cell counts. Since adipose tissue has been discovered as a key immune organ, this study aimed to assess the role of adipokines in the HIV immunodiscordant response. This is a multicenter prospective study including 221 PLHIV starting the first antiretroviral therapy (ART) and classified according to baseline CD4⁺ T-cell counts/ μ L (controls > 200 cells/ μ L and cases \leq 200 cells/ μ L). Immune failure recovery was considered when cases did not reach more than 250 CD4⁺ T cells/ μ L at 144 weeks (immunological nonresponders, INR). Circulating adipokine concentrations were longitudinally measured using enzyme-linked immunosorbent assays. At baseline, apelin receptor (APLNR) and zinc-alpha-2-glycoprotein (ZAG) concentrations were significantly lower in INRs than in immunological responders ($p = 0.043$ and $p = 0.034$), and they remained lower during all ART follow-up visits ($p = 0.044$ and $p = 0.028$ for APLNR, $p = 0.038$ and $p = 0.010$ for ZAG, at 48 and 144 weeks, respectively). ZAG levels positively correlated with retinol-binding protein 4 (RBP4) levels ($p < 0.01$), and low circulating RBP4 concentrations were related to a low CD4⁺ T-cell gain ($p = 0.018$ and $p = 0.039$ at 48 and 144 weeks, respectively). Multiple regression adjusted for clinical variables and adipokine concentrations confirmed both low APLNR

and RBP4 as independent predictors for CD4⁺ T cells at 144 weeks ($p < 0.001$). In conclusion, low APLNR and RBP4 concentrations were associated with poor immune recovery in treated PLHIV and could be considered predictive biomarkers of a discordant immunological response.

Keywords: adipokines; antiretroviral therapy; HIV; immunodiscordant response; poor immune recovery

1. Introduction

Since the introduction of effective antiretroviral therapy (ART), the morbidity and mortality of people who live with HIV infection (PLHIV) has drastically decreased. However, up to 25–30% of PLHIV receiving ART when they are severely immunosuppressed fail to recover their CD4⁺ T cell counts, although they achieve correct viral suppression (VS) [1–3]. These individuals are known as “immunological nonresponders” or “immunological nonrecoverers” (INRs) and have a worse prognosis and a higher frequency of non-AIDS events [3–8]. Several factors have been traditionally linked to this failure, such as age, male sex, drug consumption, nadir CD4⁺ T cell counts, late ART introduction, or cytokine storm [1–3]. Nevertheless, the specific mechanisms that fully explain immune dysregulation in PLHIV are still unknown, and investigations of the molecular pathways preceding ART-associated poor immune recovery are needed to develop a useful tool for early detection and to ameliorate disease progression.

Recently, interest in adipose tissue and its role in regulating immune function has increased. Adipose tissue has been discovered as a relevant immune organ [9–11], and it may be involved in immune function and immune recovery in PLHIV receiving ART [12]. For instance, in previous years, several investigations have been conducted regarding adipose tissue and its role in HIV, concretely in ART-induced lipodystrophy and metabolic disturbances [13–16]. Both HIV infection and ART modify the adipose tissue composition, distribution, and function [12,17]. The virus itself targets adipose tissue directly by infecting adipose tissue-resident cells (notably CD4⁺ T cells) and indirectly via viral protein release, activation of inflammation, and the immune system and gut disruption [18]. Furthermore, in obese PLHIV, adipose dysfunction is boosted by inflammation, which in turn is an outcome of excess adipose and obesity-induced metabolic disturbances. In obese adipose tissue, the primarily immunoregulatory macrophages (M2 phenotype) increase to over 50% of total adipose tissue and shift to proinflammatory phenotype (M1), a contributing factor to the release of inflammatory cytokines [19]. In fact, among PLHIV, the activation of M1 phenotype is the primary source of low-grade chronic inflammation in the adipose tissue contributing to HIV-associated lipodystrophy [20]. ART introduction mitigates all these inflammatory processes but also contributes to increasing the adipose tissue dysfunction [21]. Indeed, adipose tissue has been advanced as a potential HIV reservoir, and thus viral persistence in adipose tissue after ART initiation might be related to the metabolic and immune dysfunctions of adipose tissue cells [22,23]. In this regard, we hypothesized that the secretion of adipokines, hormones with immunomodulatory effects secreted by adipocytes [10,24–27], may be related to CD4⁺ T cell depletion and restoration in PLHIV. Thus, in this study, we evaluated circulating concentrations of adiponectin, apelin, apelin receptor (APLNR), fatty acid-binding protein (FABP4), leptin, omentin, retinol-binding protein 4 (RBP4), resistin, vaspin, and zinc-alpha-2-glycoprotein (ZAG, also known AZGP1) in samples of ART-naïve patients starting ART and during follow-up at 48 and 144 weeks of ART. We aimed to relate plasma adipokine concentrations to nadir CD4⁺ T cell counts and to anticipate poor immune recovery using circulating adipokines as potential biomarkers.

2. Results

2.1. Patient Characteristics

The preART clinical characteristics of the study cohort are presented in Table 1. First, HIV-positive participants ($n = 221$) were categorized according to baseline CD4⁺ T cell counts (Figure 1A). Cases (baseline CD4⁺ T cell count ≤ 200 cells/ μ L) were older ($p = 0.009$), presented lower CD4⁺ and CD8⁺ T cell counts, and had a lower CD4/CD8 ratio ($p < 0.001$), but had a higher plasma viral load (VL) ($p < 0.001$) and prevalence of high blood pressure (HBP) ($p = 0.043$) than controls (baseline CD4⁺ T cell count > 200 cells/ μ L) at baseline. At 144 weeks, 21.8% of cases were classified as poor immune recoverers (INRs), whereas 76.2% of subjects showed good immunological reconstitution (IR). INRs presented a higher prevalence of HBP ($p = 0.004$).

Table 1. Study cohort baseline characteristics in ART-naïve PLHIV according to baseline CD4⁺ T cell counts (controls vs. cases) and CD4⁺ T cell counts at 144 weeks of ART (IR vs. INR).

	Controls ($n = 120$, 53.8%)	Cases ($n = 101$, 46.2%)	<i>p</i> Value * (Controls vs. Cases)	IR ($n = 77$, 76.2%)	INR ($n = 22$, 21.8%)	<i>p</i> Value ** (IR vs. INR)
Demographic characteristics						
Age (years)	38 (31–45)	41 (35–51)	0.009	40 (35–50)	44 (41–56)	0.063
Male (%)	101 (84.2)	80 (79.2)	0.383	61 (79.22)	16 (72.72)	0.765
BMI	24.72 \pm 2.93	24.07 \pm 3.92	0.535	24.07 \pm 3.91	24.09 \pm 3.85	0.615
CD4 ⁺ T-cell count (cells/mm ³)	328 (260–465)	88 (31–169)	<0.001	116 (43–174.5)	38 (12.5–70)	0.003
CD8 ⁺ T-cell count (cells/mm ³)	1069 (780–1341)	527 (357–1020)	<0.001	521 (359–1058)	436 (222–1015)	0.536
CD4 ⁺ /CD8 ⁺ ratio	0.28 (0.21–0.49)	0.12 (0.06–0.34)	<0.001	0.14 (0.08–0.37)	0.05 (0.028–0.12)	0.010
Alcohol (%)	26 (21.7)	20 (19.8)	0.746	13 (16.88)	6 (27.27)	0.345
Tobacco (%)	51 (42.5)	33 (32.7)	0.070	28 (36.36)	5 (22.72)	0.394
Comorbidities						
High blood pressure (%)	6 (5)	13 (12.9)	0.043	8 (10.39)	4 (18.18)	0.004
Dyslipidaemia (%)	0	1 (1)	0.484	1 (1.29)	0	0.590
Diabetes mellitus (%)	10 (8.3)	8 (7.9)	0.764	4 (5.19)	3 (13.63)	0.093
HIV-related parameters						
Viral Load (log copies/mL)	4.79 (4.21–5.17)	5.29 (4.72–5.61)	<0.001	5.28 (4.73–5.57)	5.39 (4.71–5.71)	0.695
Risk factor			0.492			0.185
Heterosexual (%)	33 (27.5)	38 (37.6)		31 (40.26)	6 (27.27)	
Homosexual (%)	58 (48.3)	45 (44.6)		35 (45.45)	9 (40.91)	
IVDU (%)	9 (7.5)	8 (7.9)		7 (9.09)	1 (4.54)	
Haemophilic (%)	1 (0.8)	1 (1)		0	1 (4.54)	
Unknown/others (%)	19 (15.8)	10 (9.9)		4 (5.19)	5 (22.72)	
HIV-Coinfections						
HBV (%)	37 (30.8)	36 (35.6)	0.778	28 (36.36)	6 (27.27)	0.601
HCV (%)	17 (14.2)	13 (12.9)	0.938	9 (11.69)	4 (18.18)	0.343
HAART						
NRTI+NNRTI (%)	54 (45)	55 (54.5)	0.225	40 (51.95)	12 (54.54)	0.830
NRTI+PI (%)	54 (45)	37 (36.6)	0.218	29 (37.66)	8 (36.36)	0.912
NNRTI+PI (%)	4 (3.3)	4 (3.9)	1	3 (3.90)	1 (4.54)	0.892
Unknown/other (%)	8 (6.7)	6 (5.9)	1	5 (6.49)	1 (4.54)	0.222

Data are presented as n (%) media \pm SD or median (interquartile range). Categorical data were compared through a χ^2 test, whereas continuous data were compared using nonparametric Mann–Whitney test (*p* value * for comparison between controls and cases, *p* value ** for comparison between IRs and INRs). *p*-value < 0.05 was considered significant and is highlighted in bold.

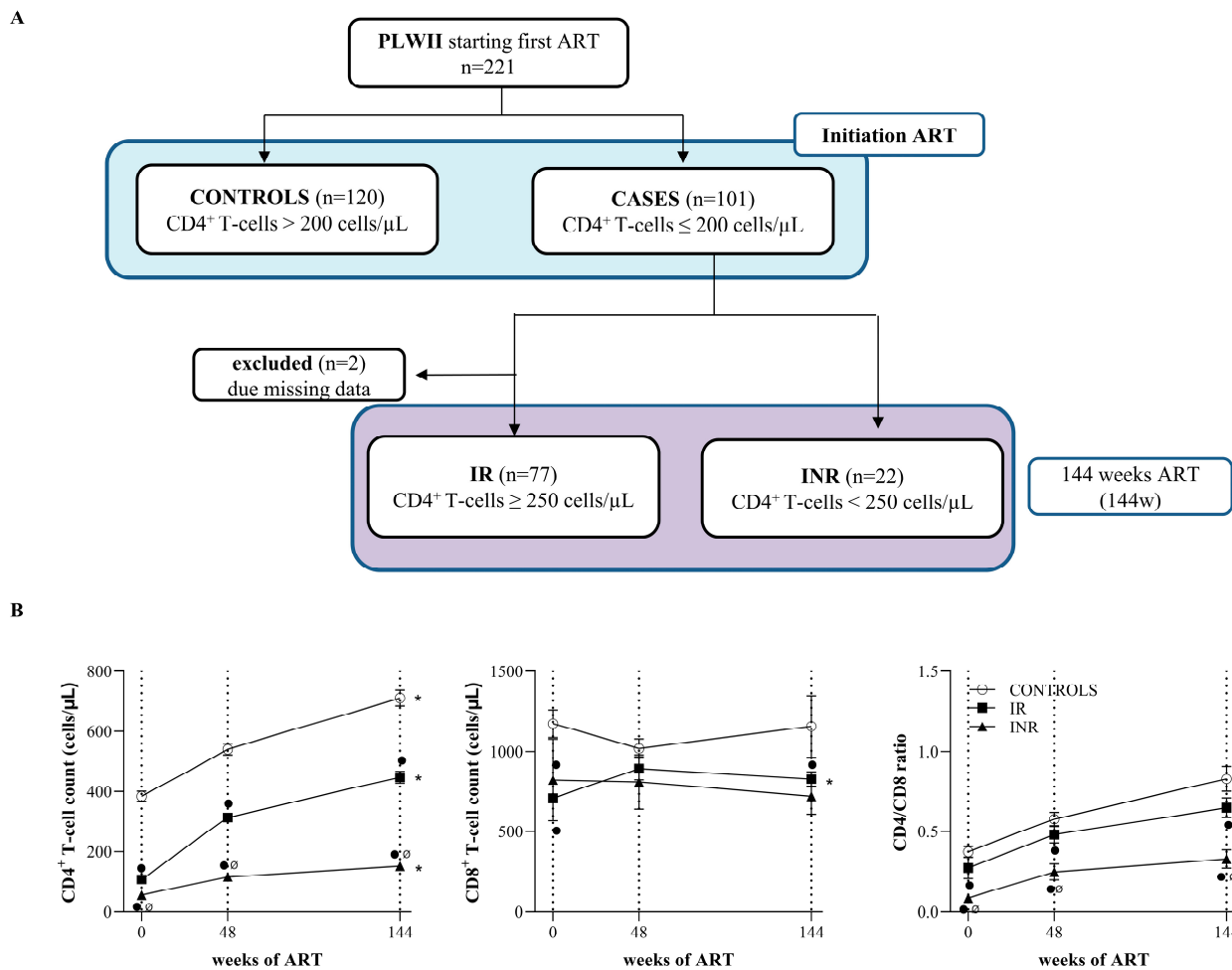


Figure 1. Study design. (A) Flow chart illustrating patient selection and enrolment. HIV-infected subjects were included and categorized as controls and cases according to the baseline ART threshold of 200 CD4⁺ T cell counts. Cases were categorized according to their immune status after 144 weeks of follow-up in “immunological recoverers” (IRs) or “immunological nonrecoverers” (INRs) depending on the threshold of CD4⁺ T cell counts of 250 CD4⁺ T cell counts/ μL . (B) CD4⁺ T cell and CD8⁺ T cell count, and CD4/CD8 ratio in controls, IRs, and INRs during the study follow-up. * indicates significant differences at 144 w compared to baseline values using the Wilcoxon test. • indicates significant differences compared to controls, and ∅ indicates significant differences between INRs and IRs at each point of time, by nonparametric Mann–Whitney test.

PLHIV classified according to baseline CD4⁺ T cell counts as controls (baseline CD4⁺ T cell counts > 200 cells/ μL) or cases (baseline CD4⁺ T cell counts \leq 200 cells/ μL). Cases were classified according to the absolute CD4⁺ T cell counts at 144 weeks of ART in immunological recoverers (IR, more or equal than 250 CD4⁺ T cell counts/ μL) or immunological nonrecoverers (INR, less than 250 CD4⁺ T cell counts/ μL).

As expected, on the basis of the classification criteria, we found that INRs had lower CD4⁺ T cell counts than IRs and controls at both 48 and 144 weeks of ART. The lower CD4⁺ T cell count in INRs was also accompanied by a lower CD4⁺/CD8⁺ ratio compared to IRs ($p = 0.016$ and $p = 0.003$ at 48 and 144 weeks, respectively) and controls ($p < 0.001$ at both 48 and 144 weeks). Both CD4⁺ T cell counts and CD4/CD8 ratio significantly increased in all groups as a consequence of ART adherence, whereas CD8⁺ T cell counts were only improved in IRs ($p = 0.010$) (Figure 1B).

2.2. Low APLNR and ZAG Concentrations Predicted Discordant Responses to ART

Thus, according to the immune recovery status at 144 weeks, pre-ART circulating adiponectin concentrations were significantly higher in both IR and INR groups compared to controls (Figure 2A; $p = 0.022$ and $p = 0.016$, respectively), suggesting that adiponectin represents a marker of low nadir CD4⁺ T cell counts. On the other hand, circulating omentin concentrations were significantly higher in IR than in controls ($p = 0.015$). Interestingly, pre-ART circulating concentrations of APLNR and ZAG were significantly lower in INRs than in both controls and IRs (Figure 2A), suggesting that APLNR and ZAG are predictive markers of poor immune recovery independently related to a low nadir CD4⁺ T cell count. Multiple regression analyses for CD4⁺ T-cell reconstitution after adjusting for age, baseline plasma viral load, baseline CD4⁺ T cell count, and the ratio of CD4/CD8 showed that circulating APLNR concentrations were independently associated with CD4⁺ T-cell reconstitution (CD4⁺ T cell at 144 weeks, $p = 0.041$) (Supplemental Materials). The model (Model 1) was statistically significant ($F(5119) = 19.806$, $p < 0.001$) and accounted for approximately 40% of the variance of CD4⁺ T-cell reconstitution ($R^2 = 0.454$, adjusted $R^2 = 0.431$). In the case of ZAG, after adjusting for confounders, we found that low ZAG concentration was not an independent predictor for CD4⁺ T-cell reconstitution ($p = 0.633$) (Model 2). In fact, the model (Model 3) including both APLNR and ZAG concentration confirmed only APLNR as an independent predictor for CD4⁺ T cells at 144 weeks ($p = 0.013$). Concretely, low APLNR concentrations accounted for approximately 2% of the variance of CD4⁺ T cells at 144 weeks, as indexed by the squared semi-partial correlations.

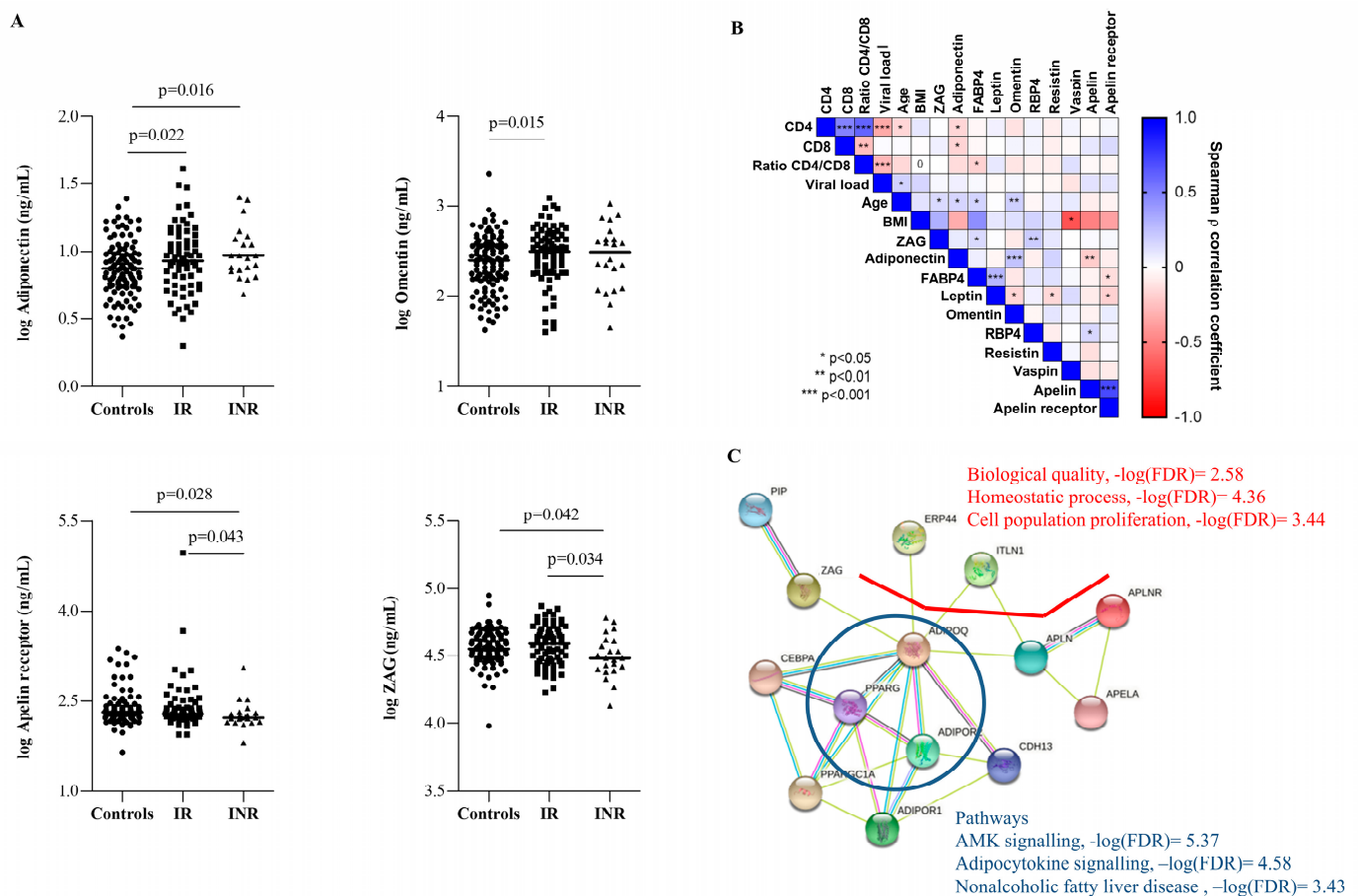


Figure 2. Circulating adipokine concentrations before initiating ART. (A) Baseline concentrations of adiponectin, omentin, APLNR, and ZAG in controls ($n = 120$), IRs ($n = 77$), and INRs ($n = 22$). p -value indicates significant differences among indicated groups by nonparametric Mann–Whitney test.

(B) Heatmap showing the correlation analyses between all adipokines evaluated and clinical characteristics at baseline. Correlation matrix is color-coded according to the Spearman (ρ) correlation coefficient ($-1:1$, red: blue through white), and correlations with statistical significance are indicated. (C) Network interactions generated with the set of the four differentially expressed biomarkers at baseline (adiponectin, apelin receptor, omentin, and ZAG) identified by the STRING database. The STRING database identified different biological processes associated with our network using the false discovery rate (FDR). Adiponectin = ADIPOQ, apelin receptor = APLNR, omentin = ITLN1 and zinc-alpha-2-glycoprotein = ZAG.

Biomarker correlation analyses (Figure 2B) confirmed a negative correlation between both baseline CD4⁺ T cell and CD8⁺ T cell counts and adiponectin levels ($\rho = -0.163$, $p = 0.017$, and $\rho = -0.172$, $p = 0.05$, respectively), but positive correlations were observed between age and adiponectin ($p < 0.05$), omentin ($p < 0.01$), and ZAG concentrations ($p < 0.05$). Moreover, the correlation matrix confirmed a positive association between circulating adiponectin and omentin concentrations ($p < 0.001$). Curiously, both APLNR and ZAG concentrations were positively correlated with FABP4 concentrations ($p < 0.05$). In addition, the positive association of apelin receptor concentrations with circulating apelin concentrations was confirmed ($p < 0.001$), and ZAG concentrations were positively correlated with RBP4 concentrations ($p < 0.01$).

Then, metabolic pathways related to adiponectin, APLNR, omentin, and ZAG were evaluated (Figure 2C). The predicted interactions among the four biomarkers resulted in the enrichment of the response to several metabolic functions including response to stimulus and regulation of cellular process ($-\log(\text{FDR}) = 2.66$ and $-\log(\text{FDR}) = 1.39$, respectively), and may be related to identical protein-binding molecular functions ($-\log(\text{FDR}) = 2.60$). Interestingly, APLNR and ZAG resulted in the enrichment of the regulation of biological quality, homeostatic process, and cell population proliferation ($-\log(\text{FDR}) = 2.58$, $-\log(\text{FDR}) = 4.36$, and $-\log(\text{FDR}) = 3.44$, respectively). As expected, adiponectin was implicated in glucose homeostasis, lipid metabolic processes, and fatty acid oxidation ($-\log(\text{FDR}) = 4.36$, $-\log(\text{FDR}) = 1.72$, and $-\log(\text{FDR}) = 4.36$, respectively). Hence, the predicted interaction between adiponectin and PPAR- γ may be related to the AMK signaling pathway ($-\log(\text{FDR}) = 5.37$), adipocytokine signaling pathway ($-\log(\text{FDR}) = 4.58$), and nonalcoholic fatty liver disease ($-\log(\text{FDR}) = 3.43$).

2.3. APLNR and ZAG Concentrations Were Related to Poor Immune Progression

Circulating apelin, APLNR, and ZAG concentrations were significantly lower in INRs than in controls ($p = 0.011$ for apelin and $p = 0.007$ for APLNR at 144 weeks; $p = 0.038$ and $p = 0.040$ for ZAG at both 48 and 144 weeks, respectively) (Figure 3). In the case of IRs, circulating omentin concentrations remained higher at both 48 and 144 weeks ($p = 0.016$ and $p = 0.042$, respectively) than in controls. From 48 weeks onwards, circulating APLNR and ZAG concentrations were significantly lower in INRs than in IRs ($p = 0.044$ and $p = 0.028$ for APLNR, $p = 0.038$ and $p = 0.01$ for ZAG at 48 and 144 weeks, respectively).

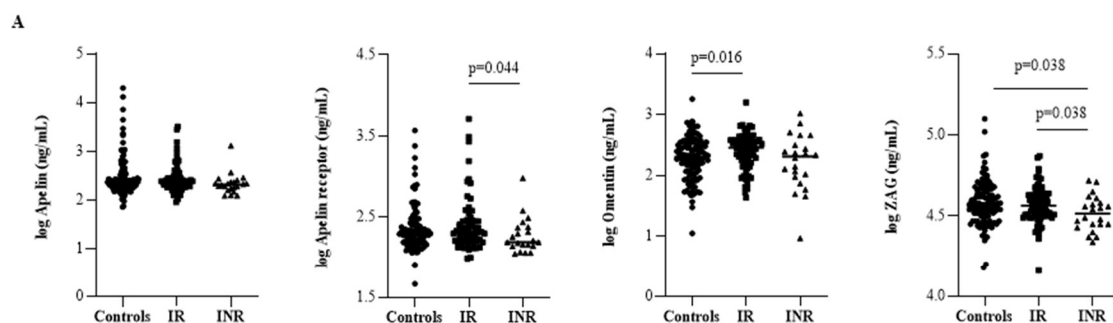


Figure 3. Cont.

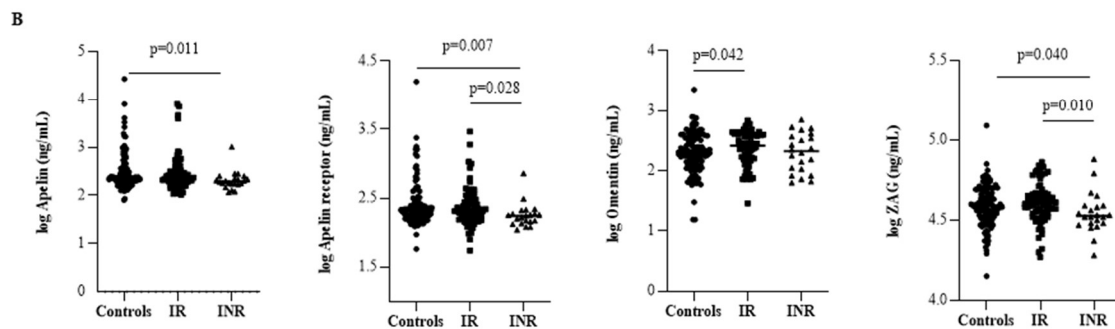


Figure 3. Follow-up circulating adipokine concentrations. Circulating apelin, APJ, omentin, and ZAG concentrations at (A) 48 weeks and (B) 144 weeks after ART in cases (IRs ($n = 77$) and INRs ($n = 22$)) compared to controls ($n = 120$). p -value indicates significant differences among groups by nonparametric Mann–Whitney test.

2.4. APLNR and RBP4 Were Validated as Predictive Biomarkers of a Discordant Response

To avoid a possible bias in the results due to the classification criteria previously selected (absolute number of $CD4^+$ T cell count), we classified cases ($n = 101$) de novo into two groups according to the change in the $CD4^+$ T cell count after 144 weeks of ART: A for individuals with a $CD4^+$ T cell count gain ≥ 100 cells/ μ L after 144 weeks of ART or B for individuals with <100 $CD4^+$ T cell count gain (Figure 4A). At baseline, the A group showed 99.11 ± 70.06 $CD4^+$ T-cell counts/ μ L and a VL of 5.17 ± 0.66 log copies/mL compared to 87.33 ± 57.58 $CD4^+$ T-cell counts/ μ L and a VL of 5.10 ± 0.66 log copies/mL in group B; these differences were not statistically significant. Patients with a worse immune response (B) showed significantly lower baseline ZAG, RBP4, and APLNR concentrations than patients with a more favorable response (A, $CD4^+$ T cell gain ≥ 100) ($p = 0.001$, $p = 0.018$, and $p = 0.042$, respectively; Figure 4B). Interestingly, ZAG, RBP4, and APLNR concentrations remained significantly lower in patients who gained <100 $CD4^+$ T cells/ μ L than those who gained ≥ 100 $CD4^+$ T cells/ μ L ($p = 0.012$, $p = 0.039$, and $p = 0.032$, respectively) after 144 weeks of ART (Figure 4C). Multiple regression analyses for $CD4^+$ T-cell reconstitution after adjusting for age, baseline plasma viral load, and baseline $CD4^+$ T cell count was used to determine whether RBP4 concentrations were independently related with $CD4^+$ T cells at 144 weeks in cases. The model (Model 1) was statistically significant ($F(4,86) = 7.810$, $p < 0.001$) and accounted for approximately 20% of the variance of $CD4^+$ T-cell reconstitution ($R^2 = 0.266$, adjusted $R^2 = 0.232$). Concretely, circulating RBP4 concentrations accounted for approximately 4% of the variance of $CD4^+$ T cells at 144 weeks, as indexed by the squared semi-partial correlations and APLNR concentration. Moreover, Model 2, including all adipokines, confirmed both low APLNR and RBP4 as independent predictors for $CD4^+$ T cells at 144 weeks ($p < 0.001$). These results validated APLNR as predictive markers of poor immune recovery and suggested a potential role for RBP4 in the discordant response.

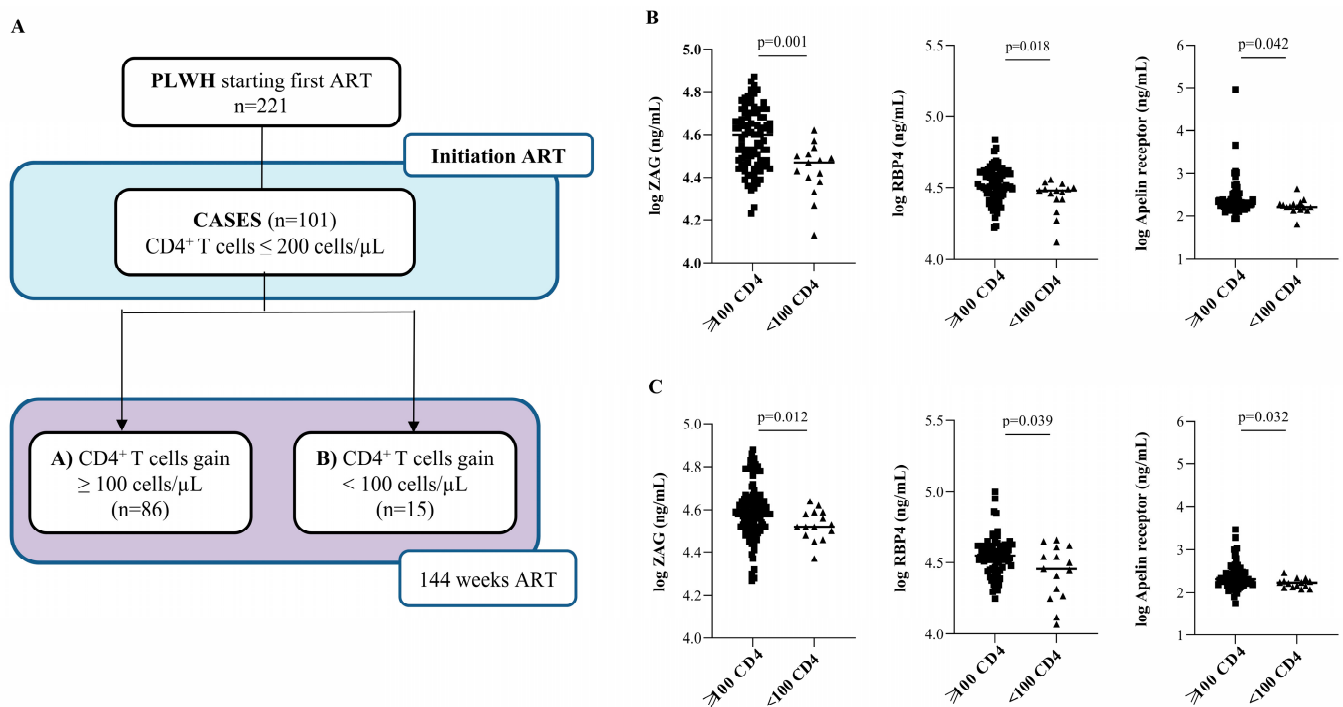


Figure 4. Validation cohort using CD4⁺ T-cell count gain as a marker of immune recovery. (A) Flow chart illustrating cases ($n = 101$) categorized according to CD4⁺ T-cell count gain after 144 weeks of ART initiation instead of 250 cell/ μ L CD4⁺ T-cell count cut-off: A group for those who gained ≥ 100 cells/ μ L, and B group for those who gained < 100 cells/ μ L. (B) Circulating ZAG, RBP4, and APLNR concentrations at baseline (B,C) at 144 weeks of ART. p -value indicates significant differences among indicated groups by nonparametric Mann–Whitney test.

2.5. ART Affected FABP4, Omentin, and Resistin Concentrations

For each group, the circulating concentration of each adipokine was included in follow-up progression curves (Figure 5). From baseline to 144 weeks, all groups exhibited increased circulating FABP4 concentrations, whereas the progressive increase in ZAG concentrations was only statistically significant in controls and IRs. Both controls and IRs also showed significant progressive increases in leptin, RBP4, and vaspin concentrations (data not shown). From baseline to 48 weeks, circulating omentin and resistin concentrations were significantly decreased in all groups. From 48 weeks to 144 weeks, circulating omentin concentrations were only significantly decreased in IRs, whereas circulating resistin concentrations decreased in both controls and IRs.

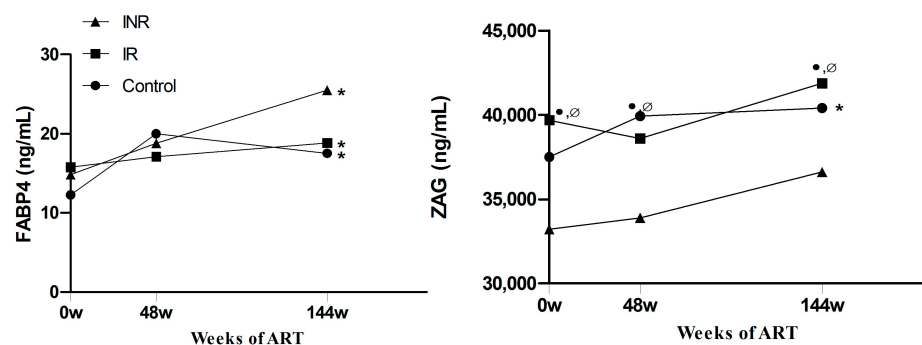


Figure 5. Cont.

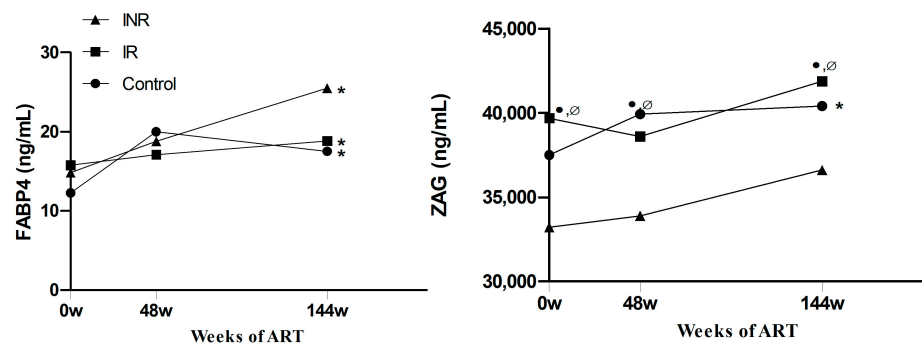


Figure 5. ART effect on circulating adipokine concentrations. Longitudinal study of circulating FABP4, ZAG, omentin, and resistin concentrations during ART follow-up. * indicates significant differences at 144 w compared to baseline values using the Wilcoxon test. • indicates significant differences compared to controls ($n = 120$), ▲ indicates significant differences between controls and IR, and ∅ indicates significant differences between INRs ($n = 22$) and IRs ($n = 77$) at each point of time, by nonparametric Mann–Whitney test.

2.6. The Potential Effects of Different Antiretroviral Drugs on Adipokine Concentrations

Finally, the potential effect of the different antiretroviral therapies on circulating adipokine concentrations and $CD4^+$ and $CD8^+$ T-cell counts were evaluated (Figure 6). As expected, no differences were found in $CD4^+$ and $CD8^+$ T-cell counts or $CD4^+/CD8^+$ ratios when we compared the ART schemes during the follow-up (data not shown). Notably, after 48 weeks of treatment, circulating concentrations of leptin and RBP4 increased in subjects who received ART schemes containing two NRTIs plus a protease inhibitor (PI) ($p = 0.018$ and $p = 0.005$, respectively) (Figure 6A). PLHIV receiving ART schemes that contained two NRTIs + NNRTI presented lower resistin concentrations ($p = 0.016$) at 48 weeks and higher circulating apelin concentrations at 144 weeks ($p = 0.009$) (Figure 6B).

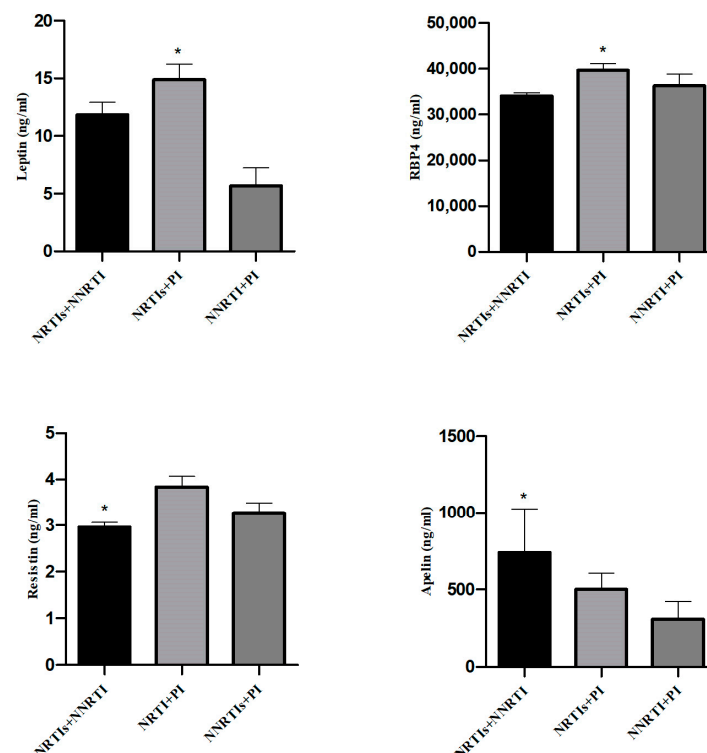


Figure 6. Adipokine concentrations in different ART schemes. (A) Circulating adipokine concentrations affected by the 2 NRTIs + PI scheme ($n = 91$) at 48 weeks. (B) Circulating adipokine concentrations

affected by the 2 NRTIs + NNRTI scheme ($n = 109$) at 48 weeks (resistin) and 144 weeks (apelin). NNRTI + PI group included 8 patients. * indicates significant differences between ART schemes by nonparametric Kruskal–Wallis test.

3. Discussion

Multiple and complex mechanisms are involved in the immunological recovery failure of PLHIV that achieve successful virological suppression. Although some factors that have been traditionally linked to poor immune recovery are being investigated [3,5,24,28], the complete mechanism preceding ART-associated poor immune recovery remains unclear. On the basis of previous results [10,12,29–31], we trust that adipokines may play a key role in immune reconstitution in PLHIV. Indeed, in this study, we postulated that low baseline circulating apelin receptor and ZAG concentrations were related to low CD4⁺ T-cell reconstitution (CD4⁺ T cell at 144 weeks) in PLHIV on ART and that their persistent low concentrations were related to poor immune progression. Low circulating RBP4 concentrations, which were positively associated with ZAG concentrations and related to the NNRTI ART scheme, were associated with a low CD4⁺ T cell gain. To our knowledge, this study is the first that has assessed the association of circulating adipokine concentrations with poor immune recovery in PLHIV that achieved successful virological suppression on ART.

A low CD4⁺ T-cell count (less than 200 cells/ μ L) and high VL in PLHIV initiating ART were strongly related to increased circulating adiponectin and omentin concentrations. Accordingly, low adiponectin levels have previously been related to a low VL and higher CD4⁺ T-cell counts in PLHIV [32,33]. Adiponectin is the richest adipokine found in the circulation [29], whereas omentin, also known as intelectin-1, is an adipokine abundantly present in the stromal vascular fraction of visceral fat depots [30]. Interestingly, both adiponectin and omentin seem to exert both anti-inflammatory and pro-inflammatory effects according to the cell-specific differences in the adiponectin- and omentin-induced secretory process. Indeed, on the one hand, both adiponectin and omentin induce macrophage differentiation towards the M2 phenotype [31] and inhibit the secretion of inflammatory cytokines, such as TNF α and IL-6 [34–37]. On the other hand, adiponectin and omentin promote the secretion of pro-inflammatory cytokines (e.g., IL-6 [38,39], IL-1, IFN γ [40]) and chemokines (e.g., MIP1 α [39]) from activated CD4⁺ T cells [40] and stimulate the activation of inflammatory pathways, such as NF- κ B signaling, or the shift towards the M1 phenotype. High circulating adiponectin levels are positively related to the severity of inflammation in individuals with autoimmune and chronic diseases, such as rheumatoid arthritis, chronic kidney disease, or inflammatory bowel disease [41].

Interestingly, circulating ZAG and apelin receptor concentrations perfectly discriminated poor immune recoverers (INRs) from both PLHIV starting ART with optimal CD4⁺ T-cell counts and PLHIV starting ART with low CD4⁺ T-cell counts who achieved a successful viral and immunological response to the therapy, suggesting that these adipokines are predictive factors of a discordant response in PLHIV. Indeed, both apelin receptor and ZAG concentrations remained significantly lower in INRs than in IRs at both 48 and 144 weeks of ART, which links the inhibition of these adipokines to a worse clinical prognosis of PLHIV.

ZAG is a novel adipokine that is expressed mainly in visceral and subcutaneous adipose tissue [42–44]. Information about its actions is scarce, but its role in the immune system is presumed to be mediated by anti-inflammatory effects on T cells and macrophages [45]. Notably, previous studies reported a negative correlation between ZAG, TNF α , and VCAM-1 concentrations [43]. The results from the present study indicated that untreated PLHIV with low CD4⁺ T-cell counts (less than 200 cells/ μ L) had a low-grade inflammatory background that was probably initiated by the activation of inflammatory pathways (such as NF- κ B and IL1R) and traditional proinflammatory cytokines (such as IL6 and TNF), as well as the secretion of proinflammatory adipokines, such as adiponectin and omentin. Moreover, the release of the proinflammatory adipokines adiponectin and omentin into the circulation might negatively affect the expression of the anti-inflammatory ZAG protein

via the activation of inflammatory pathways such as TNF signaling. Thus, the imbalance of circulating anti- and proinflammatory adipokines in the circulation of untreated and treated PLHIV could be crucial in the reconstitution of the CD4⁺ T-cell count and the subsequent immune response.

Apelin is an endogenous ligand of apelin receptor (APLNR), which is a G protein-coupled seven-transmembrane receptor [46] secreted by adipocytes [47] and is mainly known to be responsible for controlling cardiovascular function [48]. Interestingly, apelin inhibits the entrance of HIV into human cells by binding to APLNR, a coreceptor for T-tropic and dual tropic HIV-1 strains [46,49]. In this sense, both apelin and APLNR were negatively associated with the VL but positively correlated with the CD4⁺ T-cell count, which supports the relation of this adipokine and its receptor to HIV replication. Thus, the lower circulating apelin and apelin receptor concentrations in PLHIV with immune failure might denote a lack of inhibition of HIV entry into the cells and subsequently supports the connection between immune failure and persistent HIV reservoirs [50–52].

Regarding RBP4, although some evidence also confirmed the role of this adipokine in metabolic disturbance [53] in PLHIV, less is known about its potential role in the immune system. In PLHIV, higher levels of RBP4 were detected in those patients with metabolic syndrome (MetS), and a positive correlation between circulating RBP4 concentrations and the number of components of MetS was identified [54,55]. In another recent study, higher RBP4 levels were observed in frail HIV-infected people with VS [56].

The main limitation of this study is the lack of assessment of potential confounders for the measures of adipokine concentrations. Notably, the main objective of this study was to explore the role of adipokines in the immune system and not to study their relationship with metabolic syndrome. The group distribution is uneven, but from our perspective, this is a reflection of the epidemiological reality. The percentage of INRs in the population ranges from 10–40% [2], and thus our classification adjusts to this percentage (27.7%).

4. Materials and Methods

4.1. Study Design and Participants

This multicenter, longitudinal case–control study included 221 adult treatment-naïve HIV-infected subjects who were consecutively recruited between 2011 and 2013 at the HIV outpatient clinic of the participating hospitals and who started their first ART and achieved virological suppression after ART. Patients were selected from among those who were receiving a combination of two nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTIs) plus a nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor (NNRTI) or a protease inhibitor (PI) or 2 NNRTIs plus a PI. A flow chart of the patient selection and enrolment process is provided in Figure 1. Of the selected subjects, 120 were considered controls (baseline CD4⁺ T-cell counts >200 cells/ μ L), and 101 were cases (baseline CD4⁺ T-cell counts \leq 200 cells/ μ L). At 144 weeks, cases were classified according to the cut-off of 250 CD4⁺ T cells [2,57]. Among the cases, 77 subjects (76.2%) achieved a value of more than 250 CD4⁺ T cells/ μ L after 144 weeks of ART (“immunological recoverers”, IR), whereas 22 subjects (21.8%) did not reach the 250 CD4⁺ T cells/ μ L threshold (“immunological nonrecoverers”, INRs). Two subjects included in the case group at baseline were excluded due to missing values. Thus, from the 221 subjects initially included in the study, 219 subjects achieved the 144 weeks follow-up being classified as 120 controls, 77 IRs, and 22 INRs.

All the selected patients were required to fulfil the following inclusion criteria: aged \geq 18 years, presence of HIV-1 infection, on an ART regimen during the 48 weeks of the study, and undetectable plasma HIV-1 viral load (VL) at 48 weeks. The exclusion criteria were the presence of active opportunistic infections, current inflammatory diseases or conditions, changes in the ART regimen, and the use of drugs known to affect/modify CD4⁺ T-cell counts (antineoplastic drugs, steroids, immune response modulators, and colony-stimulating factors, among others).

4.2. General Laboratory Measurements

Blood was drawn from a peripheral vein after an overnight fast. Whole blood was used to determine the CD4⁺ T-cell count and for DNA isolation. HIV-1 infection was diagnosed by a positive ELISA and confirmed by Western blot analysis. The plasma HIV-1 VL was determined using the Cobas Amplicor HIV-1 Monitor Test v 1.5 (Roche Diagnostics, Barcelona, Spain). The limit of detection was <20 copies/ μ L. CD4⁺ T-cell counts were analyzed using a FAC flow cytometer FAC (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). These determinations were carried out in a central laboratory. Plasma was obtained by centrifugation and stored at -80°C at BioBanc IISPV until use.

4.3. Adipokine Measurements

Plasma concentrations of human adiponectin (RD195023100, BioVendor, Brno, Czech Republic), apelin (E00237, QAYEE, Shanghai, China), apelin receptor (E05144, QAYEE, Shanghai, China), fatty acid-binding protein 4 (FABP4) (RD191036200R, BioVendor, Brno, Czech Republic), leptin (EL2001-1, AssayPro, St Charles, MO, USA), omentin (RD191100200R, BioVendor, Brno, Czech Republic), retinol-binding protein 4 (RBP4) (ER3005-1, AssayPro, St Charles, MO, USA), resistin (RD 191016100, BioVendor, Brno, Czech Republic), vaspin (RD191097200R, BioVendor, Brno, Czech Republic), and zinc-alpha-2-glycoprotein (ZAG) (RD191093100R, BioVendor, Brno, Czech Republic) were measured using a one-step double-antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) according to the manufacturer's instructions at baseline, as well as at 48 and 144 weeks of ART follow-up.

4.4. Statistical Analyses

Before the statistical analyses, the normal distribution and homogeneity of the variances were tested using a Kolmogorov–Smirnov test. Normally distributed data are presented as the means \pm standard deviations (SD), whereas variables with a skewed distribution are presented as the medians (25th percentiles–75th percentiles) or were transformed into a decimal logarithm. Categorical variables are reported as numbers (percentages). Qualitative variables were analyzed using the χ^2 test or Fisher's exact test when necessary. Comparisons between groups were performed with nonparametric Kruskal–Wallis (KW) and/or Mann–Whitney (MW) tests for unpaired samples and a Wilcoxon *t*-test for paired samples (W). When applicable, the Bonferroni post hoc test was used for multiple comparisons. Stepwise multiple linear regression analyses were used to determine whether adipokines were independently related with CD4⁺ T-cell reconstitution (CD4⁺ T cell at 144 weeks was used as dependent variable). Correlation analyses were evaluated using the Spearman test. Statistical analyses were performed using SPSS (version 21.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA), and graphical representations were generated with GraphPad Prism software (version 9.0, GraphPad Inc., San Diego, CA, USA). The results were considered significant at $p < 0.05$.

5. Conclusions

Therefore, in conclusion, adipokines are essential factors that contribute to the immune response to HIV infection. Although some adipokines function as proinflammatory molecules and others as anti-inflammatory molecules, a proper balance is needed to maintain a minimum inflammatory environment and might be crucial for the reconstitution of CD4⁺ T-cell count and to promote a good recovery status in PLHIV. To the best of our knowledge, this study is the first to appoint a specific role to some anti-inflammatory and proinflammatory adipokines in the immune response of PLHIV with poor immune recovery. Interestingly, low circulating apelin receptor and RBP4 and ZAG concentrations were related to low CD4⁺ T-cell reconstitution (CD4⁺ T cell at 144 weeks) in PLHIV. Concretely, apelin receptor and RBP4 concentrations resulted in being independently related to CD4⁺ T-cell counts at 144 weeks of successful suppressive antiretroviral therapy, making apelin receptor and RBP4 potential biomarkers of a discordant response in untreated PLHIV.

Further investigations are needed to elucidate the mechanisms by which these adipokines modulate in the immune response.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms23042202/s1>.

Author Contributions: Conceptualization, Y.M.P., J.B., M.L., and F.V.; methodology, E.Y., V.A., M.V., A.M., and J.M. (Jenifer Masip); software, E.Y. and L.R.; validation, C.V., G.G.-P., J.V.-G., M.P., and F.G.-B.; formal analysis, E.Y., C.V., and L.R.; investigation, E.Y., J.P., and A.R.; resources, P.D., J.B., J.M. (Josep Mallolas), G.G.-P., E.N., and M.O.; data curation, E.Y.; writing—original draft preparation, E.Y., J.P., and A.R.; writing—review and editing, E.Y., Y.M.P., J.B., J.M. (Josep Mallolas), F.V., and A.R.; visualization, C.V. and J.P.; supervision, C.V., J.P., F.V., and A.R.; project administration, F.V., J.P., and A.R.; funding acquisition, F.V. and A.R. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Fondo de Investigación Sanitaria (PI16/00503, PI18/01216, PI19/01337, and PI20/00326)-ISCIII-FEDER (co-funded by the European Regional Development Fund/European Social Fund; “A way to make Europe”/“Investing in your future”); Programa de Suport als Grups de Recerca AGAUR (2017SGR948), the SPANISH AIDS Research Network (RD12/0017/0005, RD12/0025/0001, RD16/0025/0006)-ISCIII-FEDER (Spain) and the Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Infecciosas-ISCIII (CIBERINFEC) (CB21/13/00020), Madrid, Spain. E.Y. is supported by the Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) under grant agreement “FI20/00118” through the program “Contratos Predoctorales de Formación en Investigación en Salud”. Y.M.P. is supported by Nicolás Monarde from the Consejería de Salud del Servicio Andaluz de Salud (C-0013-2017). F.V. is supported by grants from the Programa de Intensificación de Investigadores (INT20/00031)-ISCIII and by “Premi a la Trajectòria Investigadora dels Hospitals de l’ICS 2018”. A.R. is supported by a grant from IISPV through the project “2019/IISPV/05” (Boosting Young Talent), by GeSIDA through the “III Premio para Jóvenes Investigadores 2019”, and by the Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) under grant agreement “CP19/00146” through the Miguel Servet Program.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and approved by the Committee for Ethical Clinical Research following the rules of Good Clinical Practice from the Institut d’Investigació Sanitària Pere Virgili (041/2018, CEIm IISPV). The CEIm IISPV is an independent committee, composed of health and non-health professionals that supervise correct compliance with the ethical principles governing clinical trials and research projects conducted in our environment, specifically in its methodology, ethics, and laws.

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: The data that support the finding of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Acknowledgments: This study would not have been possible without the collaboration of all the patients and medical and nursing staff who have taken part in the project. We also acknowledge the BioBanc IISPV (B.0000853 + B.0000854) integrated into the Spanish National Biobanks Platform (PT20/00197) for its collaboration and CERCA Programme (Generalitat de Catalunya) and Institut d’Investigacions Sanitàries Pere Virgili (IISPV).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

References

1. Horta, A.; Nobrega, C.; Amorim-Machado, P.; Coutinho-Teixeira, V.; Barreira-Silva, P.; Boavida, S.; Costa, P.; Sarmiento-Castro, R.; Castro, A.G.; Correia-Neves, M. Poor Immune Reconstitution in HIV-Infected Patients Associates with High Percentage of Regulatory CD4⁺ T Cells. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e57336. [[CrossRef](#)]
2. Yang, X.; Su, B.; Zhang, X.; Liu, Y.; Wu, H.; Zhang, T. Incomplete immune reconstitution in HIV/AIDS patients on antiretroviral therapy: Challenges of immunological non-responders. *J. Leukoc. Biol.* **2020**, *107*, 597–612. [[CrossRef](#)]
3. Massanella, M.; Negro, E.; Clotet, B.; Blanco, J. Immunodiscordant responses to HAART—mechanisms and consequences. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* **2013**, *9*, 1135–1149. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

4. Hocqueloux, L.; Avettand-fènoël, V.; Jacquot, S.; Prazuck, T.; Legac, E.; Mélard, A.; Niang, M.; Mille, C.; Le moal, G.; Viard, J.P.; et al. Long-term antiretroviral therapy initiated during primary HIV-1 infection is key to achieving both low HIV reservoirs and normal T cell counts. *J. Antimicrob. Chemother.* **2013**, *68*, 1169–1178. [[CrossRef](#)]
5. Cenderello, G.; De Maria, A. Discordant responses to cART in HIV-1 patients in the era of high potency antiretroviral drugs: Clinical evaluation, classification, management prospects. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* **2016**, *14*, 29–40. [[CrossRef](#)]
6. Van Lelyveld, S.F.L.; Gras, L.; Kesselring, A.; Zhang, S.; De Wolf, F.; Wensing, A.M.J.; Hoepelman, A.I.M. Long-Term Complications in Patients with Poor Immunological Recovery despite Virological Successful HAART in Dutch ATHENA Cohort. *AIDS* **2012**, *26*, 465–474. [[CrossRef](#)]
7. Pacheco, Y.M.; Jarrin, I.; Rosado, I.; Campins, A.A.; Berenguer, J.; Iribarren, J.A.; Rivero, M.; Muñoz-Medina, L.; Bernal-Morell, E.; Gutiérrez, F.; et al. Increased risk of non-AIDS-related events in HIV subjects with persistent low CD4 counts despite cART in the CoRIS cohort. *Antivir. Res.* **2015**, *117*, 69–74. [[CrossRef](#)]
8. Engsig, F.N.; Zangerle, R.; Katsarou, O.; Dabis, F.; Reiss, P.; Gill, J.; Porter, K.; Sabin, C.; Riordan, A.; Fätkenheuer, G.; et al. Long-term mortality in HIV-positive individuals virally suppressed for >3 years with incomplete CD4 recovery. *Clin. Infect. Dis.* **2014**, *58*, 1312–1321. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Blüher, M.; Mantzoros, C.S. From leptin to other adipokines in health and disease: Facts and expectations at the beginning of the 21st century. *Metab. Clin. Exp.* **2015**, *64*, 131–145. [[CrossRef](#)]
10. Francisco, V.; Pino, J.; Gonzalez-Gay, M.A.; Mera, A.; Lago, F.; Gómez, R.; Mobasher, A.; Gualillo, O. Adipokines and inflammation: Is it a question of weight? *Br. J. Pharmacol.* **2018**, *175*, 1569–1579. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Maximus, P.S.; Al Achkar, Z.; Hamid, P.F.; Hasnain, S.S.; Peralta, C.A. Adipocytokines: Are They the Theory of Everything? *Cytokine* **2020**, *133*. [[CrossRef](#)]
12. Koethe, J.R.; Hulgán, T.; Niswender, K. Adipose tissue and immune function: A review of evidence relevant to HIV infection. *J. Infect. Dis.* **2013**, *208*, 1194–1201. [[CrossRef](#)]
13. Escoté, X.; Megia, A.; López-Dupla, M.; Miranda, M.; Veloso, S.; Alba, V.; Domingo, P.; Pardo, P.; Viladés, C.; Peraire, J.; et al. A study of fatty acid binding protein 4 in HIV-1 infection and in combination antiretroviral therapy-related metabolic disturbances and lipodystrophy. *HIV Med.* **2011**, *12*, 428–437. [[CrossRef](#)]
14. Ceperuelo-Mallafré, V.; Escoté, X.; Viladés, C.; Peraire, J.; Domingo, P.; Solano, E.; Sirvent, J.J.; Pastor, R.; Tinahones, F.; Leal, M.; et al. Zinc alpha-2 glycoprotein is implicated in dyslipidaemia in HIV-1-infected patients treated with antiretroviral drugs. *HIV Med.* **2012**, *13*, 297–303. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Peraire, J.; López-Dupla, M.; Alba, V.; Beltrán-Debón, R.; Martínez, E.; Domingo, P.; Asensi, V.; Leal, M.; Viladés, C.; Inza, M.I.; et al. HIV/antiretroviral therapy-related lipodystrophy syndrome (HALS) is associated with higher RBP4 and lower omentin in plasma. *Clin. Microbiol. Infect.* **2015**, *21*, 711.e1–711.e8. [[CrossRef](#)]
16. Veloso, S.; Escoté, X.; Ceperuelo-Mallafré, V.; López-Dupla, M.; Peraire, J.; Viladés, C.; Domingo, P.; Castro, A.; Olona, M.; Sirvent, J.-J.; et al. Leptin and adiponectin, but not IL18, are related with insulin resistance in treated HIV-1-infected patients with lipodystrophy. *Cytokine* **2012**, *58*, 253–260. [[CrossRef](#)]
17. Tien, P.C.; Benson, C.; Zolopa, A.R.; Sidney, S.; Osmond, D.; Grunfeld, C. The Study of Fat Redistribution and Metabolic Change in HIV Infection (FRAM): Methods, Design, and Sample Characteristics. *Am. J. Epidemiol.* **2006**, *163*, 860. [[CrossRef](#)]
18. Bourgeois, C.; Gorwood, J.; Olivo, A.; Le Pelletier, L.; Capeau, J.; Lambotte, O.; Béréziat, V.; Lagathu, C. Contribution of Adipose Tissue to the Chronic Immune Activation and Inflammation Associated With HIV Infection and Its Treatment. *Front. Immunol.* **2021**, *12*, 1–22. [[CrossRef](#)]
19. Conley, L.J.; Bush, T.J.; Rupert, A.W.; Sereti, I.; Patel, P.; Brooks, J.T.; Baker, J.V. Obesity is associated with greater inflammation and monocyte activation among HIV-infected adults receiving antiretroviral therapy. *AIDS* **2015**, *29*, 2201–2207. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Shikuma, C.M.; Gangcuangco, L.M.A.; Killebrew, D.A.; LiButti, D.E.; Chow, D.C.; Nakamoto, B.K.; Liang, C.Y.; Milne, C.I.P.; Ndhlovu, L.C.; Barbour, J.D.; et al. The role of HIV and monocytes/macrophages in adipose tissue biology. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* **2014**, *65*, 151–159. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Carr, A.; Samaras, K.; Burton, S.; Law, M.; Freund, J.; Chisholm, D.J.; Cooper, D.A. A syndrome of peripheral lipodystrophy, hyperlipidaemia and insulin resistance in patients receiving HIV protease inhibitors. *AIDS* **1998**, *12*. [[CrossRef](#)]
22. Couturier, J.; Suliburk, J.W.; Brown, J.M.; Luke, D.J.; Agarwal, N.; Yu, X.; Nguyen, C.; Lyer, N.; Kozinetz, C.A.; Overbeek, P.A.; et al. Human adipose tissue as a reservoir for memory CD4⁺ T cells and HIV. *AIDS* **2015**, *29*, 667–674. [[CrossRef](#)]
23. Damouche, A.; Lazure, T.; Avettand-Fènoël, V.; Huot, N.; Dejucq-Rainsford, N.; Satie, A.P.; Mélard, A.; David, L.; Gomet, C.; Ghosn, J.; et al. Adipose Tissue Is a Neglected Viral Reservoir and an Inflammatory Site during Chronic HIV and SIV Infection. *PLoS Pathog.* **2015**, *11*, e1005153. [[CrossRef](#)]
24. Richert, Q.; Trajman, A.; Arroyave, L.; Toews, J.; Becker, M.; Kasper, K.; McLaren, P.; Rueda, Z.; Keynan, Y. Systemic Inflammation before and after Antiretroviral Therapy Initiation as a Predictor of Immune Response among HIV-Infected Individuals in Manitoba. *Cytokine* **2017**, *91*, 74–81. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Lago, F.; Dieguez, C.; Gómez-Reino, J.; Gualillo, O. The emerging role of adipokines as mediators of inflammation and immune responses. *Cytokine Growth Factor Rev.* **2007**, *18*, 313–325. [[CrossRef](#)]
26. Cao, H. Adipocytokines in obesity and metabolic disease. *J. Endocrinol.* **2014**, *220*, T47–T59. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Maclaren, R.; Cui, W.; Cianflone, K. Adipokines and the Immune System: An Adipocentric View 2 Endocrine Functions of Adipose Tissue in the Immune System. *System* **2008**, 1–21. [[CrossRef](#)]

28. Gaardbo, J.C.; Hartling, H.J.; Gerstoft, J.; Nielsen, S.D. Incomplete Immune Recovery in HIV Infection: Mechanisms, Relevance for Clinical Care, and Possible Solutions. *Clin. Dev. Immunol.* **2012**, *2012*, 17. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Lago, F.; Dieguez, C.; Gómez-Reino, J.; Gualillo, O. Adipokines as emerging mediators of immune response and inflammation. *Nat. Clin. Pr. Rheumatol.* **2007**, *3*, 716–724. [[CrossRef](#)]
30. Recinella, L.; Orlando, G.; Ferrante, C.; Chiavaroli, A.; Leone, S. Adipokines: New Potential Therapeutic Target for Obesity and Metabolic, Rheumatic, and Cardiovascular Diseases. *Front. physiol.* **2020**, *11*. [[CrossRef](#)]
31. Żelechowska, P.; Brzezińska-Błaszczak, E.; Kusowska, A.; Kozłowska, E. The role of adipokines in the modulation of lymphoid lineage cell development and activity: An overview. *Obes. Rev.* **2020**, *21*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Morimoto, H.K.; Simão, A.N.C.; de Almeida, E.R.D.; Ueda, L.T.; Oliveira, S.R.; de Oliveira, N.B.; Petenucci, D.L.; Panis, C.; Cecchini, R.; Dichi, I.; et al. Role of Metabolic Syndrome and Antiretroviral Therapy in Adiponectin Levels and Oxidative Stress in HIV-1 Infected Patients. *Nutrition* **2014**, *30*, 1324–1330. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Ketlogetswe, K.S.; Post, W.S.; Li, X.; Palella, F.J.; Jacobson, L.P.; Margolick, J.B.; Kingsley, L.A.; Witt, M.D.; Dobs, A.S.; Budoff, M.J.; et al. Lower adiponectin is associated with subclinical cardiovascular disease among HIV-infected men. *AIDS* **2014**, *28*, 901–909. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Niersmann, C.; Röhrig, K.; Blüher, M.; Roden, M.; Herder, C.; Carstensen-Kirberg, M. Increased Release of Proinflammatory Proteins in Primary Human Adipocytes and Activation of the Inflammatory NFκB, p38, and ERK Pathways upon Omentin Treatment. *Obes. facts* **2020**, *13*, 221–236. [[CrossRef](#)]
35. Michalczyk, K.; Niklas, N.; Rychlicka, M.; Cymbaluk-Płoska, A.; Baldassarre, G. diagnostics The Influence of Biologically Active Substances Secreted by the Adipose Tissue on Endometrial Cancer. *Diagnostics* **2021**, *11*. [[CrossRef](#)]
36. Tsang, J.Y.S.; Li, D.; Ho, D.; Peng, J.; Xu, A.; Lamb, J.; Chen, Y.; Tam, P.K.H. Novel immunomodulatory effects of adiponectin on dendritic cell functions. *Int. Immunopharmacol.* **2011**, *11*, 604–609. [[CrossRef](#)]
37. Zabetian-Targhi, F.; Mirzaei, K.; Keshavarz, S.A.; Hossein-Nezhad, A. Modulatory Role of Omentin-1 in Inflammation: Cytokines and Dietary Intake. *J. Am. Coll. Nutr.* **2016**, *35*, 670–678. [[CrossRef](#)]
38. Liu, R.; Zhao, P.; Zhang, Q.; Che, N.; Xu, L.; Qian, J.; Tan, W.; Zhang, M. Adiponectin promotes fibroblast-like synoviocytes producing IL-6 to enhance T follicular helper cells response in rheumatoid arthritis. *Clin. Exp. Rheumatol.* **2020**, *38*, 11–18.
39. Scotece, M.; Pérez, T.; Conde, J.; Abella, V.; López, V.; Pino, J.; Gonzalez-Gay, M.A.; Gomez-Reino, J.J.; Mera, A.; Gomez, R.; et al. Adipokines induce pro-inflammatory factors in activated Cd4⁺ T cells from osteoarthritis patient. *J. Orthop. Res.* **2017**, *35*, 1299–1303. [[CrossRef](#)]
40. Cheng, X.; Folco, E.J.; Shimizu, K.; Libby, P. Adiponectin induces pro-inflammatory programs in human macrophages and CD4⁺ T cells. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 36896–36904. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Choi, H.M.; Doss, H.M.; Kim, K. Multifaceted Physiological Roles of Adiponectin in Inflammation and Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Lei, L.; Li, K.; Li, L.; Fang, X.; Zhou, T.; Zhang, C.; Luo, Y.; Liu, H.; Li, X.; Zheng, H.; et al. Circulating zinc-α2-glycoprotein levels are low in newly diagnosed patients with metabolic syndrome and correlate with adiponectin. *Nutr. Metab.* **2017**, *14*, 53. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Wang, C. Obesity, Inflammation, and Lung Injury (OILI): The Good. *Mediat. Inflamm.* **2014**, *2014*. [[CrossRef](#)]
44. Yang, M.; Liu, R.; Li, S.; Luo, Y.; Zhang, Y.; Zhang, L.; Liu, D.; Wang, Y.; Xiong, Z.; Boden, G.; et al. Zinc-α2-glycoprotein is associated with insulin resistance in humans and is regulated by hyperglycemia, hyperinsulinemia, or liraglutide administration. *Diabetes Care* **2013**, *36*, 1074–1082. [[CrossRef](#)]
45. Noh, J.Y.; Shin, J.U.; Kim, J.H.; Kim, S.H.; Kim, B.M.; Kim, Y.H.; Park, S.; Kim, T.G.; Shin, K.O.; Park, K.; et al. ZAG Regulates the Skin Barrier and Immunity in Atopic Dermatitis. *J. Investig. Dermatol.* **2019**, *139*, 1648–1657. [[CrossRef](#)]
46. Zhou, N.; Zhang, X.; Fan, X.; Argyris, E.; Fang, J.; Acheampong, E.; DuBois, G.C.; Pomerantz, R.J. The N-Terminal Domain of APJ, a CNS-Based Coreceptor for HIV-1, Is Essential for Its Receptor Function and Coreceptor Activity. *Virology* **2003**, *317*, 84–94. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Castan-Laurell, I.; Dray, C.; Attané, C.; Duparc, T.; Knauf, C.; Valet, P. Apelin, diabetes, and obesity. *Endocrine* **2011**, *40*, 1–9. [[CrossRef](#)]
48. Kralisch, S.; Fasshauer, M. Adipocyte fatty acid binding protein: A novel adipokine involved in the pathogenesis of metabolic and vascular disease? *Diabetologia* **2013**, *56*, 10–21. [[CrossRef](#)]
49. Zou, M.X.; Liu, H.Y.; Haraguchi, Y.; Soda, Y.; Tatemoto, K.; Hoshino, H. Apelin peptides block the entry of human immunodeficiency virus (HIV). *FEBS Lett.* **2000**, *473*, 15–18. [[CrossRef](#)]
50. Marchetti, G.; Gori, A.; Casabianca, A.; Magnani, M.; Franzetti, F.; Clerici, M.; Perno, C.F.; Monforte, A.D.A.; Galli, M.; Meroni, L. Comparative Analysis of T-Cell Turnover and Homeostatic Parameters in HIV-Infected Patients with Discordant Immune-Virological Responses to HAART. *AIDS* **2006**, *20*, 1727–1736. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Tincati, C.; Merlini, E.; Braidotti, P.; Ancona, G.; Savi, F.; Tosi, D.; Borghi, E.; Callegari, M.L.; Mangiavillano, B.; Barassi, A.; et al. Impaired gut junctional complexes feature late-treated individuals with suboptimal CD4 + T-cell recovery upon virologically suppressive combination antiretroviral therapy. *AIDS* **2016**, *30*, 991–1003. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Zhang, L.X.; Song, J.W.; Zhang, C.; Fan, X.; Huang, H.H.; Xu, R.N.; Liu, J.Y.; Zhang, J.Y.; Wang, L.F.; Zhou, C.B.; et al. Dynamics of HIV reservoir decay and naïve CD4 T-cell recovery between immune non-responders and complete responders on long-term antiretroviral treatment. *Clin. Immunol.* **2021**, *229*, 108773. [[CrossRef](#)]

-
53. Karamfilova, V.; Gateva, A.; Alexiev, A.; Zheleva, N.; Velikova, T.; Ivanova-Boyanova, R.; Ivanova, R.; Cherkezov, N.; Kamenov, Z.; Mateva, L. The association between retinol-binding protein 4 and prediabetes in obese patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Arch. Physiol. Biochem.* **2019**, *128*, 217–222. [[CrossRef](#)]
 54. Jeong, S.J.; Chin, B.S.; Chae, Y.T.; Jin, S.J.; Ku, N.S.; Baek, J.H.; Han, S.H.; Kim, C.O.; Choi, J.Y.; Song, Y.G.; et al. Serum retinol-binding protein-4 levels are increased in HIV-infected subjects with metabolic syndrome receiving highly active antiretroviral therapy. *Yonsei Med. J.* **2012**, *53*, 1211–1215. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 55. Han, S.H.; Chin, B.S.; Lee, H.S.; Jeong, S.J.; Choi, H.K.; Kim, C.O.; Choi, J.Y.; Song, Y.G.; Lee, H.C.; Kim, J.M. Serum retinol-binding protein 4 correlates with obesity, insulin resistance, and dyslipidemia in HIV-infected subjects receiving highly active antiretroviral therapy. *Metab. Clin. Exp.* **2009**, *58*, 1523–1529. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 56. Blanco, J.R.; Romero, L.; Ramalle-Gómara, E.; Metola, L.; Ibarra, V.; Sanz, M.; Oteo, J.A.; Garcia, A.; Pérez-Martínez, L. Retinol-binding protein 4 (RBP4), a potential biomarker of frailty in HIV-infected people on stable antiretroviral therapy. *HIV Med.* **2020**, *21*, 358–364. [[CrossRef](#)]
 57. Rb-Silva, R.; Goios, A.; Kelly, C.; Teixeira, P.; João, C.; Horta, A.; Correia-Neves, M. Definition of Immunological Nonresponse to Antiretroviral Therapy: A Systematic Review. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* **2019**, *82*, 452–461. [[CrossRef](#)]

Article

Adipokines as new biomarkers of immune recovery: Apelin receptor, RBP4 and ZAG are related to CD4⁺ T cell reconstitution in PLHIV on Suppressive Antiretroviral Therapy

Elena Yeregui ^{1,2,3,14}, Jenifer Masip ^{1,3,14}, Consuelo Viladés ^{1,2,3,14}, Pere Domingo ⁴, Yolanda M. Pacheco ^{5,6}, Julià Blanco ^{7,8,11,14}, Josep Mallolas ^{9,14}, Verónica Alba ^{1,3,14}, Montserrat Vargas ^{1,14}, Graciano García-Pardo ^{1,2,3,14}, Eugènia Negro ^{10,11,14}, Montserrat Olona ^{1,3,14}, Judit Vidal-González ¹², Maria Peraire ³, Anna Martí ^{1,2,14}, Frédéric Gómez-Bertomeu ^{1,3,14}, Manuel Leal ¹³, Francesc Vidal ^{1,2,3,14,*} and Anna Rull ^{1,2,3,14,*}

- ¹ Hospital Universitari de Tarragona Joan XXIII (HJ23), Tarragona, Spain
- ² Institut Investigació Sanitària Pere Virgili (IISPV), Tarragona, Spain
- ³ Universitat Rovira i Virgili (URV), Tarragona, Spain
- ⁴ Infectious Diseases Unit, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain
- ⁵ Laboratory of Immunology, Institute of Biomedicine of Seville, IBIS, Seville, Spain
- ⁶ UGC Clinical Laboratories, Virgen del Rocío University Hospital/CSJC/University of Seville, Seville, Spain
- ⁷ IrsiCaixa AIDS Research Institute, Badalona, Spain
- ⁸ Germans Trias i Pujol Research Institute (IGTP), Can Ruti Campus, Badalona, Spain
- ⁹ HIV Unit and Infectious Diseases Service, Hospital Clinic-IDIBAPS, Barcelona, Spain
- ¹⁰ Fundació de la Lluita contra les Infeccions, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona, Spain
- ¹¹ Universitat de Vic-Universitat Central de Catalunya (UVic-UCC), Vic, Spain
- ¹² Universitat de Barcelona (UB), Barcelona, Spain
- ¹³ Internal medicine Service, Hospital Viamed Santa Àngela de la Cruz, Seville, Spain
- ¹⁴ CIBER Enfermedades Infecciosas (CIBERINFEC), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

† These authors contributed equally to this paper, and should both be considered as senior co-authors.

*Correspondence: fvidalmarsal.hj23.ics@gencat.cat (F.V.); anna.rull@iispv.cat (A.R.)

Supplemental Table S1. Stepwise regression results to determine whether AR and ZAG were independently related to CD4+ T-cell at 144 weeks.

Model	B	SE-b	Beta	Pearson r	sr ²
Model 1 Apelin receptor	Constant	113.391			
	Age*	-3.814	1.919	-0.142	0.018
	Viral Load*	62.968	30.679	0.145	0.031
	CD4+ T-cell*	1.075	0.126	0.624	0.626
	Ratio CD4/CD8 baseline	11.645	58.310	0.015	0.222
	AR baseline*	0.089	0.043	0.143	0.149
Model 2 ZAG	Constant	180.451	170.059		
	Age*	-4.338	1.871	-0.164	0.024
	Viral Load*	65.188	29.199	0.154	0.026
	CD4+ T-cell*	1.094	0.126	0.641	0.634
	Ratio CD4/CD8 basal	-10.911	57.093	-0.014	0.213
	ZAG baseline	-0.001	0.002	-0.033	0.058
Model 3 Apelin receptor +ZAG	Constant	176.764	135.801		
	Age*	-3.738	1.497	-0.148	0.019
	Viral Load*	50.352	23.175	0.132	-0.115
	CD4+ T-cell*	1.028	0.092	0.678	0.656
	ZAG baseline	7.699E-05	0.001	0.003	0.042
	AR baseline*	0.092	0.037	0.142	0.154

The dependent variable was CD4+ T cell counts at 144 weeks.

sr² is the squared semi-partial correlation; *p<0.05

Model 1: F(5,119) = 19.806, p < 0.001, R2=0.454, Adjusted R2=0.431

Model 2: F(5,124) = 19.844, p < 0.001, R2=0.444, Adjusted R2=0.422

Model 3: F(5,164) = 31.549, p < 0.001, R2=0.490, Adjusted R2=0.475

Supplemental Table S2. Stepwise regression results to determine whether RBP4 was independently related to CD4+ T-cell at 144 weeks .

	Model	B	SE-b	Beta	Pearson r	sr²
Model 1 RBP4	Constant	-1.532	158.506			
	Age*	-3.596	1.544	-0.216	-0.182	0.046
	Viral Load*	52.844	23.701	0.215	0.079	0.042
	CD4+ T-cell baseline*	1.276	0.264	0.469	0.380	0.199
	RBP4 baseline*	0.004	0.002	0.211	0.151	0.043
Model 2 Apelin receptor+ RBP4+ZAG	Constant	-150.190	174.376			
	Age*	-4.197	1.569	-0.263	-0.206	0.061
	Viral Load*	69.504	27.713	0.242	0.133	0.053
	CD4+ T-cell*	1.225	0.260	0.447	0.374	0.190
	RBP4 baseline*	0.004	0.002	0.205	0.203	0.038
	Apelin receptor baseline*	0.072	0.034	0.199	0.272	0.037
	ZAG baseline	0.002	0.001	0.134	0.063	0.015

The dependent variable was CD4+ T cell counts at 144 weeks.

sr² is the squared semi-partial correlation; *p<0.05

Model 1: F(4,86) = 7.810, p < 0.001, R2=0.266, Adjusted R2=0.232

Model 2: F(6,75) = 6.970, p < 0.001, R2=0.358, Adjusted R2=0.307

V DISCUSIÓN

La respuesta inmune discordante, a pesar de una correcta supresión virológica tras el inicio del TAR, es un factor de mal pronóstico en la infección por VIH. Los mecanismos implicados son múltiples y complejos, y hasta el momento ninguno de ellos ha podido ser descrito por completo. No obstante, trabajos previos llevados a cabo por el grupo de investigación *Infection and Immunity* (INIM) demostraron que el eje IL-7/IL-7R tiene un papel importante en la pobre recuperación inmune [116] y que las concentraciones circulantes de ciertas adipoquinas se ven alteradas en PLHIV con lipodistrofia [220,227,228]. Estos hallazgos señalaban un papel potencialmente relevante de las citoquinas en la respuesta inmunológica al VIH, con una implicación sustancial en la pobre recuperación inmune. Por ello, se planteó estudiar la implicación de ciertas quimiocinas y adipoquinas en la regulación de la respuesta inmune.

Tanto las quimiocinas como las adipoquinas forman parte de la gran familia de las citoquinas, y juegan un papel esencial en la homeostasis y regulación de la respuesta inmune [181]. De hecho, el descubrimiento reciente de las citoquinas como elementos clave de la respuesta inmune ha abierto nuevos horizontes en cuanto al desarrollo de estrategias terapéuticas innovadoras. Conocer a fondo su funcionamiento puede aportar herramientas para desarrollar biomarcadores de respuesta inmunológica y dianas terapéuticas para optimizar la respuesta discordante. De hecho, los resultados de ambos estudios demostraron que las concentraciones plasmáticas de las quimiocinas y las adipoquinas pueden ser factores pronósticos de una respuesta discordante, así como marcadores de progresión de la infección por VIH debido a los sistemas de señalización complejos en los que existe toda una red de interacciones y moléculas involucradas (proteínas reguladoras, receptores, ligandos etc.).

Estudio 1: Las concentraciones plasmáticas elevadas de SDF-1 y MCP-1 y las variantes genéticas de CXCL12, CCL2 y CCR5 se relacionan con una pobre respuesta inmunológica.

Las quimiocinas y sus receptores tienen una gran importancia en el ciclo vital del VIH, establecimiento del reservorio y en la progresión de la enfermedad [183,229,230]. En este primer estudio se analizó el papel de las quimiocinas y sus receptores en la pobre respuesta inmune, y entre los hallazgos obtenidos, se observó que las concentraciones plasmáticas basales de MCP-1/CCL2 y SDF-1/CXCL12 supusieron el 9% y 4% de varianza a nivel basal y a las 48 semanas, respectivamente. Además, *CXCL12* rs1801157 se asoció con la respuesta inmune. En cuanto a los receptores de quimiocinas, se demostró que mientras que *CCR2* rs1799864_814 y *CCR5* rs1800024 tenían un fuerte desequilibrio de ligamento o *Linkage Disequilibrium* (LD), la combinación de diferentes SNPs analizados en el cromosoma 3 (*CX3CR1*, *CCR2* y *CCR5*) resultaron en dos haplotipos que se asociaron significativamente con la respuesta inmune.

Las concentraciones de SDF-1/CXCL12 y CCL5/RANTES, tanto en el momento basal como tras 48 semanas de TAR, fueron más elevadas en los casos (PLHIV que empezaban TAR con bajo recuento de células CD4⁺) comparado con los controles (PLHIV que empezaban TAR con un recuento óptimo de células CD4⁺), aunque solamente SDF-1/CXCL12 fue la única capaz de distinguir entre IRs y INRs. Estos resultados sugieren que las concentraciones plasmáticas elevadas de SDF-1/CXCL12 son un marcador pronóstico de recuentos bajos de T-CD4⁺ y un marcador de una pobre respuesta inmune durante el seguimiento. A pesar de que estudios previos han relacionado las concentraciones de SDF-1/CXCL12 con la infección por VIH [231], los datos son escasos en cuanto a su función como marcador pronóstico del estado inmunológico. SDF-1/CXCL12 es la quimiocina más primitiva que regula múltiples sistemas y funciones celulares, incluyendo la proliferación y la supervivencia del sistema inmune mediante los receptores CXCR4 y ACKR3 [181,183,232]. La afinidad de CXCL12/SDF-1 por CXCR4 muestra una buena correlación con su acción supresora en la infección por especies de

HIV-1 T-trópicos y su habilidad para inducir la internalización de CXCR4 [233], lo que dificulta la interacción de gp120 con CXCR4 y, por consiguiente, dificulta la entrada del virus en la célula. En este sentido, se observó que la expresión génica de SDF-1 provocaba efectos negativos en la historia natural de la enfermedad por el hecho de que el alelo SDF-1 -3'T se relacionó con niveles detectables de virus X4-trópicos. [234]. En línea con esta información, en este trabajo se detectó que la expresión génica de CXCL12 influyó en las concentraciones plasmáticas de SDF-1 en IRs, y conforme con los trabajos de otros autores, [235] la expresión del genotipo *CXCL12* rs1801157 TT se asoció con una mayor probabilidad de una pobre recuperación de T-CD4⁺ a pesar de una correcta supresión virológica gracias al TAR. De hecho, se observó que todos los casos incluidos en el estudio que eran portadores del genotipo *CXCL12* rs1801157 TT se asociaron con INRs y de lo contrario, los participantes con genotipo *CXCL12* rs1801157 CC eran más frecuentes en el grupo de IR que en el de INRs (P= 0.065). En concordancia con estos resultados, se observó un papel protector del alelo *CXCL12* rs1801157 C y del genotipo CC en el desarrollo de la leucemia linfocítica crónica, mientras que la variante T se relacionó con un mayor riesgo de desarrollar la enfermedad y de una respuesta fallida a la terapia, independientemente del régimen empleado. Además, la presencia de la variante *CXCL12* rs1801157 estaría relacionada con un descenso de CXCL12 y un aumento de la expresión de mRNA de su receptor CXCR4 [236].

Otra de las quimiocinas que jugó un papel potencial en la recuperación inmune fue MCP-1/CCL2. Las concentraciones basales elevadas fueron un buen marcador de un mal pronóstico inmunológico, contribuyendo aproximadamente a un 3% de la varianza de T-CD4⁺ tras 48 semanas de tratamiento. MCP-1/CCL2 es una quimiocina inflamatoria producida por varios tipos celulares, y tiene una función de quimioatracción para las células T-CD4⁺, monocitos/macrófagos y células NK, reclutándolos hacia el lugar de la infección y la inflamación [181,183]. Las concentraciones elevadas de CCL2/CCR2 se relacionaron previamente con alteraciones asociadas con el VIH mediante el reclutamiento de leucocitos y el mantenimiento del estado inflamatorio [181,183,229,237], pero su relación con la recuperación inmune en pacientes con VIH bajo TAR no ha sido estudiada lo suficiente, y los resultados no son claros. En el estudio actual, se encontró una asociación entre el genotipo *CCR2* rs1799864_814 AG y la probabilidad de desarrollar una respuesta inmune discordante tras el TAR, lo que corrobora los hallazgos del estudio de Restrepo et al. [235]. Además, la estabilidad de la expresión de CCR2 se relacionó previamente con la enfermedad de Alzheimer (EA) y deterioro cognitivo leve (DCL) como consecuencia de concentraciones de MCP-1 elevadas asociadas con el alelo A de *CCR2* rs1799864 [238].

El receptor de quimiocinas CCR5 tiene una gran importancia en el contexto de la infección viral gracias a su papel como correceptor de VIH-1 [239] y porque es el ligando natural de múltiples quimiocinas, incluidas MIP-1 α /CCL-3, MIP-1 β /CCL-4 y RANTES/CCL-5 [239–241]. De hecho, los receptores de quimiocinas se han considerado dianas terapéuticas importantes para el tratamiento de diversas enfermedades en humanos [242], y en concreto la diana dual CCR5/CCR2 ha emergido como estrategia terapéutica para patologías complejas, incluida la infección por VIH [240]. En este trabajo se observó que el genotipo homocigoto Δ 32 se relacionó con una pobre recuperación inmune, y que el polimorfismo *CCR5* rs1800024 CT se asociaba significativamente con los INRs. El CCR5 Δ 32 ejerce un efecto fenotípico robusto sobre CCR5 [241] y la mutación CCR5 Δ 32 se relacionó previamente con diferencias en la expresión génica, lo que en la mayoría de las veces es crítica para la respuesta inmune [243]. Además, de acuerdo con la literatura, se observó que existía una sinergia entre *CCR2* rs1799864_814 y *CCR5* rs1800024, ambos localizados en el cromosoma 3. En trabajos previos se vio que las mutaciones de *CCR2* rs1799864 y *CCR5* rs1800024 podían predecir la transmisión del VIH [244], pero hasta el momento no se había descrito nada en relación con la

recuperación inmune. Los análisis de SNPs múltiples mostraron un alto LD entre *CCR2* rs1799864_814 y *CCR5* rs18000024 y que la expresión del genotipo *CCR2* rs1799864_814 AG se relacionó significativamente con concentraciones plasmáticas elevadas de RANTES en los INR. En este contexto, nuestros datos también revelaron que los alelos de distintos genes del mismo cromosoma son heredados juntos más frecuentemente de lo que sería esperable debido al azar. Curiosamente, dos haplotipos (GCGTGTGCA y ATGGACACA) resultantes de la expresión génica combinada de los receptores de quimiocinas *CX3CR1*, *CCR2* y *CCR5* se asociaron con la respuesta inmune según los recuentos de T-CD4⁺ tras 48 semanas de TAR.

En su conjunto, nuestros datos apoyan la teoría de los estudios experimentales que emplean los receptores de quimiocinas como posibles candidatos para ensayos clínicos avanzados. De los agonistas de quimiocinas que han sido aprobados, uno de ellos es un inhibidor alostérico no-competitivo que estabiliza el *CCR5* en una conformación inactiva. Este compuesto es Maraviroc, una pequeña molécula bien tolerada, aprobada por la FDA para tratar la infección por VIH-1, especialmente en aquellos pacientes con tropismo *CCR5* por su capacidad de prevenir la unión de la quimiocina y el gp120 del VIH [242]. Además, se están llevando a cabo ensayos clínicos que analizan la capacidad de *CCR5* como potencial herramienta terapéutica: Entre ellos se encuentra Leronlimab que es un anticuerpo monoclonal IgG4 anti-*CCR5*, y Cenicriviroc que se trata de un antagonista dual de *CCR2* y *CCR5*. No obstante, de éste último hay que tener en cuenta que el ensayo clínico AURORA, que pretendía estudiar el efecto de Cenicriviroc como tratamiento de la esteatohepatitis no alcohólica, fue suspendido en febrero de 2022 ante la ausencia de datos que demostraran su eficacia [245]. Por otro lado, las estrategias que se han estudiado empleando inhibidores de quimiocinas como IL-2 y IL-7 no han demostrado ser efectivas hasta el momento. Es posible que para alcanzar una recuperación inmune satisfactoria se deban bloquear los checkpoint inmunológicos mediante quimiocinas individuales o combinaciones de quimiocinas. De hecho, ya se emplean en otras patologías como por ejemplo en la inmunoterapia para el tratamiento de tumores: la inhibición del eje *CXCL12/CXCR4* ha demostrado su importancia a la hora de regular las células madre en el cáncer y en la activación de múltiples vías de señalización (ERK1/2, ras, p38 MAPK, PLC/MAPK y SAPK/JNK). Además, la inhibición dual de *CCL2/MCP-1* y *CXCL12/SDF-1* mostró un efecto terapéutico añadido en la nefritis lúpica murina, gracias al efecto antiinflamatorio proveniente del bloqueo de *CCL2/MCP-1* y del efecto protector que ejerce el bloque del *CXCL12/SDF-1* en el filtrado glomerular [246]

Por tanto, los datos de este primer estudio concluyen que 1) *SDF-1/CXCL12*, *MCP-1/CCL-2* y el receptor *CCR5* son clave en la susceptibilidad a la progresión del VIH, sobre todo en cuanto a la reconstitución inmune, 2) las concentraciones plasmáticas y la expresión génica de *SDF-1/CXCL12* (*CXCL12* rs1801157) y *MCP-1/CCL2* (*CCR2* rs1799864_814) se asocian con el status de recuperación inmune y se podrían considerar marcadores pronósticos del fracaso inmunológico a pesar del TAR, 3) las concentraciones plasmáticas de *SDF-1* en la semana 48 podrían considerarse marcadores de la progresión de la enfermedad, y un aumento de la concentración de *MCP-1* podría indicar una pérdida de T-CD4⁺ y 4) de entre las variantes genéticas de *CCR5*, únicamente *CCR5* rs18000024 y *CCR5* rs333_814 (Δ 32) se relacionaron con la recuperación inmune.

Estudio 2: Las adipoquinas como nuevos biomarcadores de la recuperación inmune: Receptor de la apelina, RBP4 y ZAG se relacionan con la reconstitución de T-CD4⁺ en PLHIV y terapia antirretroviral supresiva.

El tejido adiposo ha demostrado ser un órgano clave en la regulación de la homeostasis celular y el sistema inmune. Las adipoquinas, hormonas secretadas por el tejido adiposo, han emergido como piezas fundamentales en la regulación de múltiples patologías metabólicas, inflamatorias, e infecciosas, y en concreto en la infección por VIH. Sin embargo, su papel en la respuesta discordante en la infección por VIH no ha sido analizado a fondo.

Hasta el momento este es el primer estudio que analiza las concentraciones de adipoquinas en la respuesta inmune incompleta en PLHIV que alcanzaron supresión virológica. En él se relacionaron las concentraciones bajas del receptor de la apelina y ZAG a nivel basal con una baja reconstitución de T-CD4⁺ (niveles de T-CD4⁺ a las 144 semanas) en PLHIV bajo TAR. En cambio, las concentraciones de adiponectina y omentina fueron más bajas en el grupo de controles, pero no fueron capaces de discernir los IRs de los INRs. Las concentraciones bajas de RBP4 circulante, que además de relacionarse con el esquema de TAR que contenía NNRTI, se correlacionaron positivamente con las concentraciones de ZAG y con una pobre ganancia de T-CD4⁺.

Los niveles circulantes elevados de adiponectina y omentina mostraron una fuerte correlación con recuentos bajos de T-CD4⁺ (<200 células/ μ L) y alta CV en los pacientes con VIH que iniciaron TAR. En la misma línea, concentraciones bajas de adiponectina se relacionaron previamente con una baja CV y mayores recuentos de T-CD4⁺ en PLHIV [247,248]. Adiponectina es la adipoquina más frecuente en la circulación [249], mientras que la omentina, también conocida como intelectina-1, es una adipoquina presente en abundancia en la fracción del estroma vascular de los depósitos de grasa visceral [250]. Curiosamente, la adiponectina y la omentina parecen ejercer efectos tanto antiinflamatorios como proinflamatorios según los efectos específicos derivados de la secreción inducida por estas adipoquinas. De hecho, por un lado, ambas adipoquinas inducen la diferenciación de macrófagos hacia un fenotipo M2 [251] e inhiben la secreción de citoquinas inflamatorias, como TNF α y IL-6 [252–255]. Por otro lado, ambas adipoquinas promueven la secreción de citoquinas proinflamatorias (por ejemplo, IL-6 [256,257], IL-1, IFN γ [258]) y quimiocinas (por ejemplo, MIP1 α [257]) de los T-CD4⁺ activados [258] y estimulan la activación de vías metabólicas proinflamatorias, como la señalización del NF- κ B, o el cambio hacia el fenotipo M1. Las concentraciones circulantes elevadas de adiponectina se relacionan positivamente con la severidad de la inflamación en individuos con enfermedades autoinmunes y crónicas, como la artritis reumatoide, enfermedad renal crónica o enfermedad inflamatoria intestinal [259].

Un dato interesante de este estudio fue que las concentraciones circulantes de ZAG y el receptor de la apelina fueron capaces de diferenciar los INRs tanto de aquellos pacientes que iniciaban TAR con un recuento de T-CD4⁺ óptimo (controles) como de las PLHIV que a pesar de iniciar TAR con recuentos bajos de T-CD4⁺ alcanzaban una correcta respuesta inmunológica y virológica al TAR (IRs), lo que sugiere que estas adipoquinas son factores predictivos de una respuesta discordante en PLHIV. De hecho, las concentraciones del receptor de la apelina y ZAG se mantuvieron significativamente más bajas en INRs que en IRs tanto en la semana 48 como en la semana 144. Esto relaciona la inhibición de las adipoquinas mencionadas con un peor pronóstico clínico en PLHIV.

ZAG es una adipoquina novedosa que se expresa principalmente en el tejido adiposo visceral y subcutáneo [224,260,261]. La información sobre su acción es escasa, pero se cree que su papel en el sistema inmune lo ejerce a través de acciones antiinflamatorias en las células T y macrófagos [262]. En particular, los estudios anteriores reportaron una correlación negativa entre concentraciones de ZAG, TNF α y VCAM-1 [261]. Los resultados del presente estudio indicaron que las PLHIV no tratadas con recuentos bajos de T-CD4⁺ (<200 células/ μ L) tenían un entorno de inflamación crónica de bajo grado que probablemente se habría iniciado gracias a la activación de vías inflamatorias (como NF-

κ B y IL1R) y citoquinas proinflamatorias tradicionales (como IL6 y TNF), junto con la secreción de adipoquinas proinflamatorias, como la adiponectina y la omentina. Además, la liberación de las adipoquinas proinflamatorias adiponectina y omentina en la circulación, podría afectar negativamente la expresión de la proteína antiinflamatoria ZAG mediante la activación de vías inflamatorias, como la señalización TNF α . Por eso, el desequilibrio de adipoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias en la circulación de PLHIV tratadas y no tratadas podría ser crucial en la reconstitución de los recuentos de T-CD4⁺ y la subsecuente respuesta inmune.

La apelina es un ligando endógeno de su receptor, el receptor de la apelina (APLNR) que es un receptor transmembrana de siete dominios acoplado a proteína G [226] secretado por adipocitos [263] y es conocido principalmente como responsable del control de la función cardiovascular [221]. Curiosamente, la apelina inhibe la entrada del VIH en las células humanas mediante su unión a APLNR, que es un correceptor de las cepas de VIH-1 de tropismo T y tropismo dual [221,226,263,264]. En este sentido, tanto la apelina como su receptor se asociaron negativamente con la carga viral, pero se correlacionaron positivamente con el recuento de T-CD4⁺, lo que apoya la relación de esta adipoquina y su receptor con la replicación del VIH. Por eso, las concentraciones bajas de apelina y su receptor en PLHIV con fracaso inmunológico, podría denotar una falta de inhibición de la entrada de VIH en las células y por tanto apoya la conexión entre el fracaso inmunológico y los reservorios persistentes de VIH [265–267].

En cuanto a RBP4, aunque algunas evidencias también confirmar el rol de esta adipoquina en alteraciones metabólicas [268] en PLHIV, su papel potencial en el sistema inmune es desconocido. En PLHIV, se detectaron concentraciones más elevadas de RBP4 en aquellos pacientes con SM, y se observó una correlación positiva entre las concentraciones circulantes de RBP4 y el número de componentes de SM [269,270]. En otro estudio reciente, se detectaron concentraciones más elevadas de RBP4 en pacientes frágiles con VIH y supresión virológica [271].

Por tanto, los datos de este segundo estudio concluyeron que 1) las adipoquinas son elementos esenciales en la respuesta inmune, 2) es imprescindible mantener un equilibrio entre las adipoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias, ya que es necesario un entorno mínimamente proinflamatorio, pero un exceso de inflamación puede ser dañino para la recuperación inmune en PLHIV, 3) las concentraciones bajas de receptor de apelina, RBP4 y ZAG se relacionaron con una pobre recuperación inmune y 4) las concentraciones del receptor de la apelina y RBP4 se correlacionaron independientemente con los recuentos de T-CD4⁺ a las 144 semanas de haber iniciado TAR.

Finalmente, en cuanto a las limitaciones de los estudios hay que tener en cuenta el número de participantes incluidos en cada grupo de estudio. En el estudio 1 el número de muestras disponibles por grupo para los estudios genéticos no era consistente con el número de muestras disponibles para el estudio de concentraciones circulantes de quimiocinas y sus receptores. En este sentido, un estudio reciente llevado a cabo por Norris et al. analizó las concentraciones de 30 citoquinas distintas (incluidas 17 quimiocinas) a nivel basal y al año y a los dos años de alcanzar el control virológico, para evaluar si las concentraciones de las quimiocinas se relacionaban con el estatus de INR, objetivando diferencias mínimas entre IRs y INRs. Concretamente, se compararon un grupo de 50 INRs con 50 IRs del Women's Interagency HIV Study y se analizaron únicamente niveles circulantes. Por tanto, podemos afirmar que el estudio 1 es el mayor estudio realizado hasta la fecha de su publicación que evalúa los niveles circulantes de quimiocinas y su asociación con las variantes genéticas de las quimiocinas y sus receptores. En el caso del Estudio 2 debemos reconocer que la distribución entre grupos fue irregular, pero desde nuestro punto de vista, esto es un reflejo de la

realidad epidemiológica. El porcentaje de INRs en la población oscila entre el 10% y el 40% [90], lo que está en consonancia con nuestra clasificación. No obstante, sí que debemos destacar la falta de identificación de potenciales factores de confusión a la hora de medir las concentraciones de adipoquinas. Aunque puesto que el objetivo principal de este estudio fue explorar el papel de las adipoquinas en el sistema inmune, y no estudiar su relación con el síndrome metabólico podemos considerar que no era relevante para nuestro estudio disponer de dicha información.

VI CONCLUSIONES GLOBALES

- ✓ Las quimiocinas y las adipoquinas son factores clave en la respuesta inmune a la infección por VIH.
- ✓ Las concentraciones plasmáticas y las expresiones genéticas de SDF-1/CSCL12 (*CXCL12* rs1801157) y MCP-1/CCL2 (*CCR2* rs1799864_814) se han asociado con el estado de recuperación inmune y podrían considerarse marcadores pronósticos de fracaso inmunológico a pesar de una buena supresión virológica con TAR.
- ✓ Las concentraciones circulantes de SDF-1 a las 48 semanas de seguimiento podrían considerarse un marcador de progresión de la enfermedad, mientras que un aumento en las concentraciones de MCP-1 podría denotar un descenso en el recuento de T-CD4⁺.
- ✓ Las variantes genéticas de *CCR5* rs1800024 y *CCR5* rs333_814 ($\Delta 32$) se relacionaron con una pobre recuperación inmune.
- ✓ Los alelos de las variantes genéticas *CCR2* rs1799864_814 y *CCR5* rs1800024 se heredaron de forma conjunta de manera más frecuente que lo que se esperaría por azar, y se relacionaron con una recuperación inmune discordante.
- ✓ Concentraciones plasmáticas bajas de ZAG, receptor de la apelina y RBP4 se relacionan con una pobre reconstitución de T-CD4⁺ a las 144 semanas.
- ✓ El receptor de la apelina y RBP4 se relacionaron independientemente con los recuentos de T-CD4⁺ a las 144 semanas, lo que los hace potenciales biomarcadores de la respuesta discordante en PLHIV sin tratamiento.
- ✓ Es necesario un entorno mínimamente proinflamatorio, pero un exceso de inflamación puede tener efectos negativos en la respuesta inmune. Por eso, el equilibrio entre citoquinas con función proinflamatoria y función antiinflamatoria es imprescindible para conseguir una correcta recuperación inmune.

VII BIBLIOGRAFÍA

1. Wise, J. HIV Pandemic Originated in Kinshasa around 1920, Say Scientists. *BMJ (Online)* 2014, 349.
2. Faria, N.R.; Rambaut, A.; Suchard, M.A.; Baele, G.; Bedford, T.; Ward, M.J.; Tatem, A.J.; Sousa, J.D.; Arinaminpathy, N.; Pépin, J.; et al. The Early Spread and Epidemic Ignition of HIV-1 in Human Populations. *Science (1979)* **2014**, 346, 56–61, doi:10.1126/science.1256739.
3. Centers for Disease Control (CDC). Pneumocystis Pneumonia--Los Angeles. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 1981 Jun 5;30(21):250-2. PMID: 6265753.
4. Friedman-Kien, A.; Laubenstein, L.; Marmor, M.; Hymes, K.; Green, J.; Ragaz, A.; Gottlieb, J.; Muggia, F.; Demopoulos, R.; Weintraub, M. Kaposi's Sarcoma and Pneumocystis Pneumonia among Homosexual Men--New York City and California. *undefined* **1981**.
5. Masur, H.; Michelis, M.A.; Greene, J.B.; Onorato, I.; Vande Stouwe, R.A.; Holzman, R.S.; Wormser, G.; Brettman, L.; Lange, M.; Murray, H.W.; et al. An Outbreak of Community-Acquired Pneumocystis Carinii Pneumonia . *New England Journal of Medicine* **1981**, 305, 1431–1438, doi:10.1056/nejm198112103052402.
6. Centers for Disease Control (CDC). A Cluster of Kaposi's Sarcoma and Pneumocystis Carinii Pneumonia among Homosexual Male Residents of Los Angeles and Orange Counties, California. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 1982 Jun 18;31(23):305-7. PMID: 6811844.
7. Epidemiologic Notes and Reports Pneumocystis Carinii Pneumonia among Persons with Hemophilia A Available online: <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/00001126.htm> (accessed on 1 June 2021).
8. Centers for Disease Control (CDC). Update on Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS)--United States. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 1982 Sep 24;31(37):507-8, 513-4. PMID: 6815471.
9. Centers for Disease Control (CDC). Immunodeficiency among Female Sexual Partners of Males with Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS) - New York. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 1983 Jan 7;31(52):697-8. PMID: 6402650.
10. Centers for Disease Control (CDC). Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS) Update--United States. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 1983 Jun 24;32(24):309-11. PMID: 6408376.
11. Barré-Sinoussi, F.; Chermann, J.C.; Rey, F.; Nugeyre, M.T.; Chamaret, S.; Gruest, J.; Dautuet, C.; Axler-Blin, C.; Vézinet-Brun, F.; Rouzioux, C.; et al. Isolation of a T-Lymphotropic Retrovirus from a Patient at Risk for Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS). *Science (1979)* **1983**, 220, 868–871, doi:10.1126/science.6189183.
12. Marx, J.L. Strong New Candidate for AIDS Agent. *Science (1979)* **1984**, 224, 475–477, doi:10.1126/science.6324344.
13. Case, K. Nomenclature: Human Immunodeficiency Virus. *Annals of Internal Medicine* 1986, 105, 133.
14. Centers for Disease Control (CDC). Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS): Precautions for Health-Care Workers and Allied Professionals. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 1983 Sep 2;32(34):450-1. PMID: 6412048.

15. Des Jarlais, D.C.; Marmor, M.; Cohen, H. Antibodies to a Retrovirus Etiologically Associated with Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS) in Populations with Increased Incidences of the Syndrome. *J Am Med Assoc* **1984**, *252*, 608–609, doi:10.1001/jama.252.5.608.
16. Witteveen, E.; Schippers, G. Needle and Syringe Exchange Programs in Amsterdam. *Substance Use and Misuse* 2006, *41*, 835–836.
17. Centers for Disease Control (CDC). Recommendations for Assisting in the Prevention of Perinatal Transmission of Human T-Lymphotropic Virus Type III/Lymphadenopathy-Associated Virus and Acquired Immunodeficiency Syndrome. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 1985 De.
18. Centers for Disease Control (CDC). Guidelines for Prophylaxis against *Pneumocystis Carinii* Pneumonia for Persons Infected with Human Immunodeficiency Virus. *MMWR Suppl.* 1989 Jun 16;38(5):1-9. PMID: 2524643.
19. U.S. APPROVES DRUG TO PROLONG LIVES OF AIDS PATIENTS - The New York Times Available online: <https://www.nytimes.com/1987/03/21/us/us-approves-drug-to-prolong-lives-of-aids-patients.html> (accessed on 3 June 2021).
20. FDA Approves the Distribution of AZT for Children. *J Pract Nurs* **1989**, *39*, 9.
21. Recommendations of the U.S. Public Health Service Task Force on the Use of Zidovudine to Reduce Perinatal Transmission of Human Immunodeficiency Virus. *MMWR Recomm Rep.* 1994 Aug 5;43(RR-11):1-20. PMID: 7913986.
22. James JS. Saquinavir (Invirase): First Protease Inhibitor Approved--Reimbursement, Information Hotline Numbers. *AIDS Treat News.* 1995 Dec 22;(No 237):1-2. PMID: 11363073.
23. FDA Approves First New Class of HIV Drugs. Food and Drug Administration. *AIDS Alert.* 1996 Aug;11(8):89. PMID: 11363655.
24. Vazquez, E. Two Drugs in One Pill. *Posit Aware* **1997**, *8*, 19.
25. WTO | Ministerial Conferences - Doha 4th Ministerial - TRIPS Declaration Available online: https://www.wto.org/english/thewto_e/minist_e/min01_e/mindecl_trips_e.htm (accessed on 10 January 2022).
26. The World Health Report 2003: Shaping the Future - R. Beaglehole, World Health Organization - Google Libros Available online: https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=Vv-rOQZs_e0C&oi=fnd&pg=PR7&dq=WHO+2003+THE+WORLD+HEALTH+REPORT&ots=2BmYgUb4ab&sig=dQ0biyqFATbWudw6-25wOzbUNfc#v=onepage&q=WHO+2003+THE+WORLD+HEALTH+REPORT&f=false (accessed on 10 January 2022).
27. Grant, R.M.; Lama, J.R.; Anderson, P.L.; McMahan, V.; Liu, A.Y.; Vargas, L.; Goicochea, P.; Casapía, M.; Guanira-Carranza, J.V.; Ramirez-Cardich, M.E.; et al. Preexposure Chemoprophylaxis for HIV Prevention in Men Who Have Sex with Men. *New England Journal of Medicine* **2010**, *363*, 2587–2599, doi:10.1056/NEJMOA1011205/SUPPL_FILE/NEJMOA1011205_DISCLOSURES.PDF.

28. FDA Approves First Drug for Reducing the Risk of Sexually Acquired HIV Infection | HIV.Gov Available online: <https://www.hiv.gov/blog/fda-approves-first-drug-for-reducing-the-risk-of-sexually-acquired-hiv-infection> (accessed on 24 February 2022).
29. Treat All People Living with HIV, Offer Antiretrovirals as Additional Prevention Choice for People at “Substantial” Risk | WHO | Regional Office for Africa Available online: <https://www.afro.who.int/news/treat-all-people-living-hiv-offer-antiretrovirals-additional-prevention-choice-people> (accessed on 24 February 2022).
30. FDA Approves Cabenuva and Vocabria for the Treatment of HIV-1 Infection | FDA Available online: <https://www.fda.gov/drugs/human-immunodeficiency-virus-hiv/fda-approves-cabenuva-and-vocabria-treatment-hiv-1-infection> (accessed on 24 February 2022).
31. Trials of Long-Acting Islatravir for HIV Treatment and Prevention Placed on Hold | Aidsmap Available online: <https://www.aidsmap.com/news/dec-2021/trials-long-acting-islatravir-hiv-treatment-and-prevention-placed-hold> (accessed on 24 February 2022).
32. IPM Statement on US Food and Drug Administration Review of Dapivirine Vaginal Ring | International Partnership For Microbicides Available online: <https://www.ipmglobal.org/content/ipm-statement-us-food-and-drug-administration-review-dapivirine-vaginal-ring> (accessed on 24 February 2022).
33. Cheney, L.; Barbaro, J.M.; Berman, J.W. Antiretroviral Drugs Impact Autophagy with Toxic Outcomes. *Cells* 2021, Vol. 10, Page 909 **2021**, 10, 909, doi:10.3390/CELLS10040909.
34. 90-90-90: Avanzamos, Pero El Mundo Sigue Lejos de Conseguir Los Objetivos Para 2020 | ONUSIDA Available online: https://www.unaids.org/es/resources/presscentre/featurestories/2020/september/20200921_90-90-90 (accessed on 24 February 2022).
35. No Title Available online: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hiv-aids#:~:text=There were an estimated 37.7,2.0 million%5D people acquired HIV.](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hiv-aids#:~:text=There%20were%20an%20estimated%2037.7,2.0%20million%20people%20acquired%20HIV.)
36. No Title Available online: <https://www.hiv.gov/hiv-basics/overview/data-and-trends/global-statistics>.
37. Retrovirus | NHGRI Available online: <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Retrovirus> (accessed on 23 February 2022).
38. Fan, H. Retroviruses. *Encyclopedia of Microbiology* **2009**, 519–534, doi:10.1016/B978-012373944-5.00315-1.
39. Ryu, W.-S. Retroviruses. In *Molecular Virology of Human Pathogenic Viruses*; Elsevier, 2017; pp. 227–246.
40. Voisset, C.; Weiss, R.A.; Griffiths, D.J. Human RNA “Rumor” Viruses: The Search for Novel Human Retroviruses in Chronic Disease. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **2008**, 72, 157–196, doi:10.1128/MMBR.00033-07.
41. Saxena, S.K.; Chitti, S. v. Molecular Biology and Pathogenesis of Retroviruses. *Advances in Molecular Retrovirology* **2016**, doi:10.5772/62885.

42. MacLachlan, N.J.; Dubovi, E.J.; Barthold, S.W.; Swayne, D.E.; Winton, J.R. *Fenner's Veterinary Virology: Fifth Edition*; Elsevier Inc., 2016; ISBN 9780128009468.
43. Ganser-Pornillos, B.K.; Yeager, M.; Pornillos, O. Assembly and Architecture of HIV. *Advances in Experimental Medicine and Biology* **2012**, *726*, 441–465, doi:10.1007/978-1-4614-0980-9_20.
44. Steckbeck, J.D.; Kuhlmann, A.S.; Montelaro, R.C. C-Terminal Tail of Human Immunodeficiency Virus Gp41: Functionally Rich and Structurally Enigmatic. *Journal of General Virology* **2013**, *94*, 1–19, doi:10.1099/VIR.0.046508-0/CITE/REFWORKS.
45. Chan, D.C.; Fass, D.; Berger, J.M.; Kim, P.S. Core Structure of Gp41 from the HIV Envelope Glycoprotein. *Cell* **1997**, *89*, 263–273, doi:10.1016/S0092-8674(00)80205-6.
46. Fiorentini, S.; Marini, E.; Caracciolo, S.; Caruso, A. *Functions of the HIV-1 Matrix Protein P17*; 2006; Vol. 29;.
47. Bukrinskaya, A. HIV-1 Matrix Protein: A Mysterious Regulator of the Viral Life Cycle. *Virus Res* **2007**, *124*, 1–11, doi:10.1016/J.VIRUSRES.2006.07.001.
48. Pornillos, O.; Ganser-Pornillos, B.K.; Yeager, M. Atomic-Level Modelling of the HIV Capsid. *Nature* **2011**, *469*:7330 **2011**, *469*, 424–427, doi:10.1038/nature09640.
49. Toccafondi, E.; Lener, D.; Negroni, M. HIV-1 Capsid Core: A Bullet to the Heart of the Target Cell. *Frontiers in Microbiology* **2021**, *12*, 755, doi:10.3389/FMICB.2021.652486/BIBTEX.
50. Campbell, E.M.; Hope, T.J. HIV-1 Capsid: The Multifaceted Key Player in HIV-1 Infection. *Nat Rev Microbiol* **2015**, *13*, 471, doi:10.1038/NRMICRO3503.
51. Clinical Information Human Immunodeficiency Virus (HIV). **2016**, doi:10.1159/000445852.
52. Kirchhoff, F. Encyclopedia of AIDS. *Encyclopedia of AIDS* **2016**, doi:10.1007/978-1-4614-9610-6.
53. Mohamed, H.; Gurrola, T.; Berman, R.; Collins, M.; Sariyer, I.K.; Nonnemacher, M.R.; Wigdahl, B. Targeting CCR5 as a Component of an HIV-1 Therapeutic Strategy. *Frontiers in Immunology* **2022**, *12*, 5686, doi:10.3389/FIMMU.2021.816515/BIBTEX.
54. Aiken, C.; Rousso, I. The HIV-1 Capsid and Reverse Transcription. *Retrovirology* **2021**, *18*, 1–9, doi:10.1186/S12977-021-00566-0/FIGURES/2.
55. Rankovic, S.; Varadarajan, J.; Ramalho, R.; Aiken, C.; Rousso, I. Reverse Transcription Mechanically Initiates HIV-1 Capsid Disassembly. *J Virol* **2017**, *91*, doi:10.1128/JVI.00289-17.
56. Weichselderfer, M.; Reitz, M.; Latinovic, O.S. Past HIV-1 Medications and the Current Status of Combined Antiretroviral Therapy Options for HIV-1 Patients. *Pharmaceutics* **2021**, *Vol. 13*, Page 1798 **2021**, *13*, 1798, doi:10.3390/PHARMACEUTICS13111798.
57. K. Saxena, S.; Gupta, A.; Bhagyashree, K.; Saxena, R.; Arora, N.; K. Banerjee, A.; K. Tripathi, A.; J.N. Chandrasekar, M.; Gandhi, N.; P.N. Nair, M. Targeting Strategies for Human Immunodeficiency Virus: A Combinatorial Approach. *Mini Rev Med Chem* **2012**, *12*, 236–254, doi:10.2174/1389557511209030236.

58. Engelman, A.; Cherepanov, P. Retroviral Integrase Structure and DNA Recombination Mechanism. *Microbiol Spectr* **2014**, *2*, 1, doi:10.1128/microbiolspec.mdna3-0024-2014.
59. Liu, R.D.; Wu, J.; Shao, R.; Xue, Y.H. Mechanism and Factors That Control HIV-1 Transcription and Latency Activation. *J Zhejiang Univ Sci B* **2014**, *15*, 455, doi:10.1631/JZUS.B1400059.
60. Qu, N.; Ying, Y.; Qin, J.; Chen, A.K. Rational Design of Self-Assembled RNA Nanostructures for HIV-1 Virus Assembly Blockade. *Nucleic Acids Research* **2021**, 1–11, doi:10.1093/nar/gkab1282.
61. Freed, E.O. HIV-1 Assembly, Release and Maturation. *Nat Rev Microbiol* **2015**, *13*, 484, doi:10.1038/NRMICRO3490.
62. Sundquist, W.I.; Kräusslich, H.G. HIV-1 Assembly, Budding, and Maturation. *Cold Spring Harb Perspect Med* **2012**, *2*, doi:10.1101/CSHPERSPECT.A006924.
63. Moir, S.; Chun, T.W.; Fauci, A.S. Pathogenic Mechanisms of HIV Disease*. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-pathol-011110-130254> **2011**, *6*, 223–248, doi:10.1146/ANNUREV-PATHOL-011110-130254.
64. Volume 32 | HIV Surveillance | Reports | Resource Library | HIV/AIDS | CDC Available online: <https://www.cdc.gov/hiv/library/reports/hiv-surveillance/vol-32/index.html> (accessed on 2 March 2022).
65. Picker, L.J.; Watkins, D.I. HIV Pathogenesis: The First Cut Is the Deepest. *Nature Immunology* **2005**, *6*, 430–432, doi:10.1038/ni0505-430.
66. HIV Infection and AIDS: Practice Essentials, Background, Pathophysiology Available online: <https://emedicine.medscape.com/article/211316-overview#a3> (accessed on 28 February 2022).
67. Maartens, G.; Celum, C.; Lewin, S.R. Seminar HIV Infection: Epidemiology, Pathogenesis, Treatment, and Prevention. *The Lancet* **2014**, *384*, 258–271, doi:10.1016/S0140-6736(14)60164-1.
68. Quantitation of Human Immunodeficiency Virus Type 1 in the Blood of Infected Persons: Comment. *Disease Markers* **1990**, *8*, 159–161, doi:10.1056/NEJM198912143212401.
69. Lewin-Smith, M.R.; Klassen, M.K.; Frankel, S.S.; Nelson, A.M. Pathology of Human Immunodeficiency Virus Infection: Infectious Conditions. *Ann Diagn Pathol* **1998**, *2*, 181–194, doi:10.1016/S1092-9134(98)80006-3.
70. Rodger, A.J.; Lodwick, R.; Schechter, M.; Deeks, S.; Amin, J.; Gilson, R.; Paredes, R.; Bakowska, E.; Engsig, F.N.; Phillips, A. Mortality in Well Controlled HIV in the Continuous Antiretroviral Therapy Arms of the SMART and ESPRIT Trials Compared with the General Population. *AIDS* **2013**, *27*, 973–979, doi:10.1097/QAD.0B013E32835CAE9C.
71. Walker, B.D.; Hirsch, M.S. Antiretroviral Therapy in Early HIV Infection. *N Engl J Med* **2013**, *368*, 279–281, doi:10.1056/NEJME1213734.
72. Deeks, S.G.; Kitchen, C.M.R.; Liu, L.; Guo, H.; Gascon, R.; Narváez, A.B.; Hunt, P.; Martin, J.N.; Kahn, J.O.; Levy, J.; et al. Immune Activation Set Point during Early HIV Infection Predicts

- Subsequent CD4+ T-Cell Changes Independent of Viral Load. *Blood* **2004**, *104*, 942–947, doi:10.1182/BLOOD-2003-09-3333.
73. Stacey, A.R.; Norris, P.J.; Qin, L.; Haygreen, E.A.; Taylor, E.; Heitman, J.; Lebedeva, M.; DeCamp, A.; Li, D.; Grove, D.; et al. Induction of a Striking Systemic Cytokine Cascade Prior to Peak Viremia in Acute Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection, in Contrast to More Modest and Delayed Responses in Acute Hepatitis B and C Virus Infections. *Journal of Virology* **2009**, *83*, 3719–3733, doi:10.1128/JVI.01844-08/ASSET/3DFFCD27-73E5-4B35-9731-BD533D86C987/ASSETS/GRAPHIC/ZJV0080917240005.JPEG.
 74. McMichael, A.J.; Borrow, P.; Tomaras, G.D.; Goonetilleke, N.; Haynes, B.F. The Immune Response during Acute HIV-1 Infection: Clues for Vaccine Development. *Nature Reviews Immunology* **2009**, *10*, 11–23, doi:10.1038/nri2674.
 75. Tomaras, G.D.; Yates, N.L.; Liu, P.; Qin, L.; Fouda, G.G.; Chavez, L.L.; Decamp, A.C.; Parks, R.J.; Ashley, V.C.; Lucas, J.T.; 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. *Journal of Virology* **2008**, *82*, 12449–12463, doi:10.1128/JVI.01708-08/SUPPL_FILE/JVI01708_08_SUPPORTING_ONLINE_MATERIALS_.ZIP.
 76. Gray, E.S.; Moore, P.L.; Choge, I.A.; Decker, J.M.; Bibollet-Ruche, F.; Li, H.; Leseka, N.; Treurnicht, F.; Mlisana, K.; Shaw, G.M.; et al. Neutralizing Antibody Responses in Acute Human Immunodeficiency Virus Type 1 Subtype C Infection. *Journal of Virology* **2007**, *81*, 6187–6196, doi:10.1128/JVI.00239-07/ASSET/C8D11440-2496-4A18-8A85-693AAFF81BEC/ASSETS/GRAPHIC/ZJV0120792560009.JPEG.
 77. Baker, J. v.; Peng, G.; Rapkin, J.; Krason, D.; Reilly, C.; Cavert, W.P.; Abrams, D.I.; MacArthur, R.D.; Henry, K.; Neaton, J.D. Poor Initial CD4+ Recovery With Antiretroviral Therapy Prolongs Immune Depletion and Increases Risk for AIDS and Non-AIDS Diseases. *J Acquir Immune Defic Syndr* **2008**, *48*, 541, doi:10.1097/QAI.0B013E31817BEBB3.
 78. Young, J.; Psychogiou, M.; Meyer, L.; Ayayi, S.; Grabar, S.; Raffi, F.; Reiss, P.; Gazzard, B.; Sharland, M.; Gutierrez, F.; et al. CD4 Cell Count and the Risk of AIDS or Death in HIV-Infected Adults on Combination Antiretroviral Therapy with a Suppressed Viral Load: A Longitudinal Cohort Study from COHERE. *PLOS Medicine* **2012**, *9*, e1001194, doi:10.1371/JOURNAL.PMED.1001194.
 79. Pacheco, Y.M.; Jarrin, I.; Rosado, I.; Campins, A.A.; Berenguer, J.; Iribarren, J.A.; Rivero, M.; Muñoz-Medina, L.; Bernal-Morell, E.; Gutiérrez, F.; et al. Increased Risk of Non-AIDS-Related Events in HIV Subjects with Persistent Low CD4 Counts despite CART in the CoRIS Cohort. *Antivir. Res.* **2015**, *117*, 69–74, doi:10.1016/j.antiviral.2015.03.002.
 80. Engsig, F.N.; Zangerle, R.; Katsarou, O.; Dabis, F.; Reiss, P.; Gill, J.; Porter, K.; Sabin, C.; Riordan, A.; Fätkenheuer, G.; et al. Long-Term Mortality in HIV-Positive Individuals Virally Suppressed for >3 Years with Incomplete CD4 Recovery. *Clin. Infect. Dis.* **2014**, *58*, 1312–1321, doi:10.1093/cid/ciu038.
 81. Zoufaly, A.; An Der Heiden, M.; Kollan, C.; Bogner, J.R.; Fätkenheuer, G.; Wasmuth, J.C.; Stoll, M.; Hamouda, O.; van Lunzen, J. Clinical Outcome of HIV-Infected Patients with Discordant

- Virological and Immunological Response to Antiretroviral Therapy. *The Journal of Infectious Diseases* **2011**, *203*, 364–371, doi:10.1093/JINFDIS/JIQ055.
82. Deeks, S.G. HIV Infection, Inflammation, Immunosenescence, and Aging. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-042909-093756> **2011**, *62*, 141–155, doi:10.1146/ANNUREV-MED-042909-093756.
 83. FEASIBILITY, EFFICACY, AND SAFETY OF DOLUTEGRAVIR/LAMIVUDINE (DTG/3TC) AS A FIRST-LINE REGIMEN IN A TEST-AND-TREAT SETTING FOR NEWLY DIAGNOSED PEOPLE LIVING WITH HIV (PLWH): 48-WEEK RESULTS OF THE STAT STUDY Available online: https://www.natap.org/2021/IAS/IAS_21.htm (accessed on 1 April 2022).
 84. Rolle, C.P.; Berhe, M.; Singh, T.; Ortiz, R.; Wurapa, A.; Ramgopal, M.; Leone, P.A.; Matthews, J.E.; Dalessandro, M.; Underwood, M.R.; et al. Dolutegravir/Lamivudine as a First-Line Regimen in a Test-and-Treat Setting for Newly Diagnosed People Living with HIV. *AIDS* **2021**, *35*, 1957–1965, doi:10.1097/QAD.0000000000002979.
 85. Efficacy and Safety of Using Bictegravir / Emtricitabine / Tenofovir Alafenamide (BIC/FTC/TAF) in a Test and Treat Model: The FAST Study Available online: https://www.natap.org/2021/EACS/EACS_86.htm (accessed on 1 April 2022).
 86. Unidad de vigilancia de VIH, I. y hepatitis Vigilancia Epidemiológica Del VIH y Sida En España 2020: Sistema de Información Sobre Nuevos Diagnósticos de VIH y Registro Nacional de Casos de Sida. *Plan Nacional sobre el Sida-DG de Salud Pública-Centro Nacional de Epidemiología - ISCIII* **2021**.
 87. Ledergerber, B.; Lundgren, J.; Sarah Walker, A.; Sabin, C.A.; Justice, A.; Reiss, P.; Mussini, C.; Wit, F.; d'Arminio Monforte, A.; Weber, R.; et al. Predictors of Trend in CD4-Positive T-Cell Count and Mortality among HIV-1-Infected Individuals with Virological Failure to All Three Antiretroviral-Drug Classes. *The Lancet* **2004**, *364*, 51–62, doi:10.1016/S0140-6736(04)16589-6.
 88. Pakker, N.G.; Notermans, D.W.; de Boer, R.J.; Roos, M.T.L.; de Wolf, F.; Hill, A.; Leonard, J.M.; Danner, S.A.; Miedema, F.; Schellekens, P.T.A. Biphasic Kinetics of Peripheral Blood T Cells after Triple Combination Therapy in HIV-1 Infection: A Composite of Redistribution and Proliferation. *Nature Medicine* **1998**, *4*, 208–214, doi:10.1038/nm0298-208.
 89. Rb-Silva, R.; Goios, A.; Kelly, C.; Teixeira, P.; João, C.; Horta, A.; Correia-Neves, M. Definition of Immunological Nonresponse to Antiretroviral Therapy: A Systematic Review. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes* **2019**, *82*, 452–461, doi:10.1097/QAI.0000000000002157.
 90. Yang, X.; Su, B.; Zhang, X.; Liu, Y.; Wu, H.; Zhang, T. Incomplete Immune Reconstitution in HIV/AIDS Patients on Antiretroviral Therapy: Challenges of Immunological Non-Responders. *J. Leukoc. Biol.* **2020**, *107*, 597–612, doi:10.1002/JLB.4MR1019-189R.
 91. Yeregui, E.; Masip, J.; Vilad, C.; Domingo, P.; Pacheco, Y.M. Adipokines as New Biomarkers of Immune Recovery : Apelin Receptor , RBP4 and ZAG Are Related to CD4 + T-Cell Reconstitution in PLHIV on Suppressive Antiretroviral Therapy. **2022**, *4*, 1–16.
 92. Yeregui, E.; Viladés, C.; Domingo, P.; Ceausu, A.; Pacheco, Y.M.; Veloso, S.; Inciarte, A.; Vidal-González, J.; Peraire, M.; Perpiñán, C.; et al. High Circulating SDF-1and MCP-1 Levels and

- Genetic Variations in CXCL12, CCL2 and CCR5: Prognostic Signature of Immune Recovery Status in Treated HIV-Positive Patients. *EBioMedicine* **2020**, *62*, doi:10.1016/j.ebiom.2020.103077.
93. Nakanjako, D.; Kiragga, A.N.; Musick, B.S.; Yiannoutsos, C.T.; Wools-Kaloustian, K.; Diero, L.; Oyaro, P.; Lugina, E.; Ssali, J.C.; Kambugu, A.; et al. Frequency and Impact of Suboptimal Immune Recovery on First-Line Antiretroviral Therapy within the International Epidemiologic Databases to Evaluate AIDS in East Africa. *AIDS* **2016**, *30*, 1913–1922, doi:10.1097/QAD.0000000000001085.
94. van Lelyveld, S.F.L.; Gras, L.; Kesselring, A.; Zhang, S.; de Wolf, F.; Wensing, A.M.J.; Hoepelman, A.I.M. Long-Term Complications in Patients with Poor Immunological Recovery despite Virological Successful HAART in Dutch ATHENA Cohort. *AIDS* **2012**, *26*, 465–474, doi:10.1097/QAD.0B013E32834F32F8.
95. Gaardbo, J.C.; Hartling, H.J.; Gerstoft, J.; Nielsen, S.D. Incomplete Immune Recovery in HIV Infection: Mechanisms, Relevance for Clinical Care, and Possible Solutions. *Clin. Dev. Immunol.* **2012**, *2012*, *17*, doi:10.1155/2012/670957.
96. Spits, H.; Blom, B.; Jaleco, A.C.; Weijer, K.; Verschuren, M.C.M.; van Dongen, J.J.M.; Heemskerk, M.H.M.; Res, P.C.M. Early Stages in the Development of Human T, Natural Killer and Thymic Dendritic Cells. *Immunol Rev* **1998**, *165*, 75–86, doi:10.1111/J.1600-065X.1998.TB01231.X.
97. Alexaki, A.; Wigdahl, B. HIV-1 Infection of Bone Marrow Hematopoietic Progenitor Cells and Their Role in Trafficking and Viral Dissemination. *PLoS Pathog* **2008**, *4*, doi:10.1371/JOURNAL.PPAT.1000215.
98. Nixon, C.C.; Vatakis, D.N.; Reichelderfer, S.N.; Dixit, D.; Kim, S.G.; Uittenbogaart, C.H.; Zack, J.A. HIV-1 Infection of Hematopoietic Progenitor Cells in Vivo in Humanized Mice. *Blood* **2013**, *122*, 2195–2204, doi:10.1182/BLOOD-2013-04-496950.
99. Isgrò, A.; Leti, W.; de Santis, W.; Marziali, M.; Esposito, A.; Fimiani, C.; Luzi, G.; Pinti, M.; Cossarizza, A.; Aiuti, F.; et al. Altered Clonogenic Capability and Stromal Cell Function Characterize Bone Marrow of HIV-Infected Subjects with Low CD4+ T Cell Counts despite Viral Suppression during HAART. *Clin Infect Dis* **2008**, *46*, 1902–1910, doi:10.1086/588480.
100. Clark, D.R.; Ampel, N.M.; Hallett, C.A.; Yedavalli, V.R.K.; Ahmad, N.; DeLuca, D. Peripheral Blood from Human Immunodeficiency Virus Type 1-Infected Patients Displays Diminished T Cell Generation Capacity. *J Infect Dis* **1997**, *176*, 649–654, doi:10.1086/514086.
101. Sauce, D.; Larsen, M.; Fastenackels, S.; Pauchard, M.; Ait-Mohand, H.; Schneider, L.; Guihot, A.; Boufassa, F.; Zaunders, J.; Iguertsira, M.; et al. HIV Disease Progression despite Suppression of Viral Replication Is Associated with Exhaustion of Lymphopoiesis. *Blood* **2011**, *117*, 5142–5151, doi:10.1182/BLOOD-2011-01-331306.
102. Jamieson, B.D.; Douek, D.C.; Killian, S.; Hultin, L.E.; Scripture-Adams, D.D.; Giorgi, J. v.; Marelli, D.; Koup, R.A.; Zack, J.A. Generation of Functional Thymocytes in the Human Adult. *Immunity* **1999**, *10*, 569–575, doi:10.1016/S1074-7613(00)80056-4.

103. Rosado-Sánchez, I.; Herrero-Fernández, I.; Genebat, M.; Ruiz-Mateos, E.; Leal, M.; Pacheco, Y.M. Thymic Function Impacts the Peripheral CD4/CD8 Ratio of HIV-Infected Subjects. *Clin Infect Dis* **2017**, *64*, 152–158, doi:10.1093/CID/CIW711.
104. Ruiz-Mateos, E.; Rubio, A.; Vallejo, A.; de La Rosa, R.; Sanchez-Quijano, A.; Lissen, E.; Leal, M. Thymic Volume Is Associated Independently with the Magnitude of Short- and Long-Term Repopulation of CD4+ T Cells in HIV-Infected Adults after Highly Active Antiretroviral Therapy (HAART). *Clinical and Experimental Immunology* **2004**, *136*, 501–506, doi:10.1111/j.1365-2249.2004.02474.x.
105. Khoury, G.; Rajasuriar, R.; Cameron, P.U.; Lewin, S.R. The Role of Naïve T-Cells in HIV-1 Pathogenesis: An Emerging Key Player. *Clin Immunol* **2011**, *141*, 253–267, doi:10.1016/J.CLIM.2011.09.002.
106. Douek, D.C.; Vescio, R.A.; Betts, M.R.; Brenchley, J.M.; Hill, B.J.; Zhang, L.; Berenson, J.R.; Collins, R.H.; Koup, R.A. Assessment of Thymic Output in Adults after Haematopoietic Stem-Cell Transplantation and Prediction of T-Cell Reconstitution. *Lancet* **2000**, *355*, 1875–1881, doi:10.1016/S0140-6736(00)02293-5.
107. Douek, D.C.; McFarland, R.D.; Keiser, P.H.; Gage, E.A.; Massey, J.M.; Haynes, B.F.; Polis, M.A.; Haase, A.T.; Feinberg, M.B.; Sullivan, J.L.; et al. Changes in Thymic Function with Age and during the Treatment of HIV Infection. *Nature* **1998**, *396*, 690–695, doi:10.1038/25374.
108. Autran, B.; Carcelain, G.; Li, T.S.; Blanc, C.; Mathez, D.; Tubiana, R.; Katlama, C.; Debré, P.; Leibowitch, J. Positive Effects of Combined Antiretroviral Therapy on CD4+ T Cell Homeostasis and Function in Advanced HIV Disease. *Science* **1997**, *277*, 112–116, doi:10.1126/SCIENCE.277.5322.112.
109. Vrisekoop, N.; van Gent, R.; de Boer, A.B.; Otto, S.A.; Borleffs, J.C.C.; Steingrover, R.; Prins, J.M.; Kuijpers, T.W.; Wolfs, T.F.W.; Geelen, S.P.M.; et al. Restoration of the CD4 T Cell Compartment after Long-Term Highly Active Antiretroviral Therapy without Phenotypical Signs of Accelerated Immunological Aging. *J Immunol* **2008**, *181*, 1573–1581, doi:10.4049/JIMMUNOL.181.2.1573.
110. Park, L.S.; Friend, D.J.; Schmierer, A.E.; Dower, S.K.; Namen, A.E. Murine Interleukin 7 (IL-7) Receptor. Characterization on an IL-7-Dependent Cell Line. *Journal of Experimental Medicine* **1990**, *171*, 1073–1089, doi:10.1084/JEM.171.4.1073.
111. Rethi, B.; Fluor, C.; Atlas, A.; Krzyzowska, M.; Mowafi, F.; Grützmeier, S.; de Milito, A.; Bellocco, R.; Falk, K.I.; Rajnavölgyi, É.; et al. Loss of IL-7R α Is Associated with CD4 T-Cell Depletion, High Interleukin-7 Levels and CD28 down-Regulation in HIV Infected Patients. *AIDS* **2005**, *19*, 2077–2086, doi:10.1097/01.AIDS.0000189848.75699.0F.
112. Llano, A.; Barretina, J.; Gutiérrez, A.; Blanco, J.; Cabrera, C.; Clotet, B.; Esté, J.A. Interleukin-7 in Plasma Correlates with CD4 T-Cell Depletion and May Be Associated with Emergence of Syncytium-Inducing Variants in Human Immunodeficiency Virus Type 1-Positive Individuals. *Journal of Virology* **2001**, *75*, 10319–10325, doi:10.1128/JVI.75.21.10319-10325.2001/ASSET/6CAE2720-B632-4FF0-8BB9-CCA780E6649B/ASSETS/GRAPHIC/JV2110053007.JPEG.

113. Hartling, H.J.; Jespersen, S.; Gaardbo, J.C.; Samleben, C.; Thorsteinsson, K.; Gerstoft, J.; Ullum, H.; Nielsen, S.D. Reduced IL-7R T Cell Expression and Increased Plasma SCD127 in Late Presenting HIV-Infected Individuals. *J Acquir Immune Defic Syndr* **2017**, *74*, 81–90, doi:10.1097/QAI.0000000000001153.
114. Marziali, M.; de Santis, W.; Carello, R.; Leti, W.; Esposito, A.; Isgrò, A.; Fimiani, C.; Sirianni, M.C.; Mezzaroma, I.; Aiuti, F. T-Cell Homeostasis Alteration in HIV-1 Infected Subjects with Low CD4 T-Cell Count despite Undetectable Virus Load during HAART. *AIDS* **2006**, *20*, 2033–2041, doi:10.1097/01.AIDS.0000247588.69438.FD.
115. Bellistri, G.M.; Casabianca, A.; Merlini, E.; Orlandi, C.; Ferrario, G.; Meroni, L.; Galli, M.; Magnani, M.; D’Arminio Monforte, A.; Marchetti, G. Increased Bone Marrow Interleukin-7 (IL-7)/IL-7R Levels but Reduced IL-7 Responsiveness in HIV-Positive Patients Lacking CD4+ Gain on Antiviral Therapy. *PLoS One* **2010**, *5*, doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0015663.
116. Ceasu, A.; Rodríguez-Gallego, E.; Peraire, J.; López-Dupla, M.; Domingo, P.; Viladés, C.; Vidal-Gonzalez, J.; Peraire, M.; Perpiñán, C.; Pacheco, Y.M.; et al. IL-7/IL-7R Gene Variants Impact Circulating IL-7/IL-7R Homeostasis and ART-Associated Immune Recovery Status. *Scientific Reports* **2019**, *9*, 1–10, doi:10.1038/s41598-019-52025-8.
117. Leone, A.; Picker, L.; Sodora, D. IL-2, IL-7 and IL-15 as Immuno-Modulators during SIV/HIV Vaccination and Treatment. *Curr HIV Res* **2009**, *7*, 83–90, doi:10.2174/157016209787048519.
118. Erikstrup, C.; Kronborg, G.; Lohse, N.; Rye, O.S.; Gerstoft, J.; Ullum, H. T-Cell Dysfunction in HIV-1-Infected Patients with Impaired Recovery of CD4 Cells despite Suppression of Viral Replication. *J Acquir Immune Defic Syndr* **2010**, *53*, 303–310, doi:10.1097/QAI.0B013E3181CA3F7C.
119. Zicari, S.; Sessa, L.; Cotugno, N.; Ruggiero, A.; Morrocchi, E.; Concato, C.; Rocca, S.; Zangari, P.; Manno, E.C.; Palma, P. Immune Activation, Inflammation, and Non-AIDS Co-Morbidities in HIV-Infected Patients under Long-Term ART. *Viruses* **2019**, *11*, doi:10.3390/V11030200.
120. Picker, L.J.; Reed-Inderbitzin, E.F.; Hagen, S.I.; Edgar, J.B.; Hansen, S.G.; Legasse, A.; Planer, S.; Piatak, M.; Lifson, J.D.; Maino, V.C.; et al. IL-15 Induces CD4 Effector Memory T Cell Production and Tissue Emigration in Nonhuman Primates. *J Clin Invest* **2006**, *116*, 1514–1524, doi:10.1172/JCI27564.
121. Pett, S.L.; Kelleher, A.D.; Emery, S. Role of Interleukin-2 in Patients with HIV Infection. *Drugs* **2010**, *70*, 1115–1130, doi:10.2165/10898620-000000000-00000.
122. Yasuma-Mitobe, K.; Matsuoka, M. The Roles of Coinhibitory Receptors in Pathogenesis of Human Retroviral Infections. *Front Immunol* **2018**, *9*, doi:10.3389/FIMMU.2018.02755.
123. Banga, R.; Procopio, F.A.; Noto, A.; Pollakis, G.; Cavassini, M.; Ohmiti, K.; Corpataux, J.M.; de Leval, L.; Pantaleo, G.; Perreau, M. PD-1(+) and Follicular Helper T Cells Are Responsible for Persistent HIV-1 Transcription in Treated Aviremic Individuals. *Nat Med* **2016**, *22*, 754–761, doi:10.1038/NM.4113.
124. Day, C.L.; Kaufmann, D.E.; Kiepiela, P.; Brown, J.A.; Moodley, E.S.; Reddy, S.; Mackey, E.W.; Miller, J.D.; Leslie, A.J.; DePierres, C.; et al. PD-1 Expression on HIV-Specific T Cells Is Associated with T-Cell Exhaustion and Disease Progression. *Nature* **2006**, *443*, 350–354, doi:10.1038/NATURE05115.

125. Cockerham, L.R.; Jain, V.; Sinclair, E.; Glidden, D. v.; Hartogenesis, W.; Hatano, H.; Hunt, P.W.; Martin, J.N.; Pilcher, C.D.; Sekaly, R.; et al. Programmed Death-1 Expression on CD4⁺ and CD8⁺ T Cells in Treated and Untreated HIV Disease. *AIDS* **2014**, *28*, 1749–1758, doi:10.1097/QAD.0000000000000314.
126. Saidakova, E. v.; Shmagel, K. v.; Korolevskaya, L.B.; Shmagel, N.G.; Chereshev, V.A. Lymphopenia-Induced Proliferation of CD4 T-Cells Is Associated with CD4 T-Lymphocyte Exhaustion in Treated HIV-Infected Patients. *Indian J Med Res* **2018**, *147*, 376–383, doi:10.4103/IJMR.IJMR_1801_15.
127. Hazenberg, M.D.; Otto, S.A.; van Benthem, B.H.B.; Roos, M.T.L.; Coutinho, R.A.; Lange, J.M.A.; Hamann, D.; Prins, M.; Miedema, F. Persistent Immune Activation in HIV-1 Infection Is Associated with Progression to AIDS. *AIDS* **2003**, *17*, 1881–1888, doi:10.1097/00002030-200309050-00006.
128. Delobel, P.; Nugeyre, M.-T.; Cazabat, M.; Sandres-Sauné, K.; Pasquier, C.; Cuzin, L.; Marchou, B.; Massip, P.; Cheynier, R.; Barré-Sinoussi, F.; et al. Naive T-Cell Depletion Related to Infection by X4 Human Immunodeficiency Virus Type 1 in Poor Immunological Responders to Highly Active Antiretroviral Therapy. *J Virol* **2006**, *80*, 10229–10236, doi:10.1128/JVI.00965-06.
129. Gougeon, M.L.; Leconte, H.; Dulioust, A.; Enouf, M.G.; Crouvoiser, M.; Goujard, C.; Debord, T.; Montagnier, L. Programmed Cell Death in Peripheral Lymphocytes from HIV-Infected Persons: Increased Susceptibility to Apoptosis of CD4 and CD8 T Cells Correlates with Lymphocyte Activation and with Disease Progression. *The Journal of Immunology* **1996**, *156*.
130. Hunt, P.W.; Martin, J.N.; Sinclair, E.; Bredt, B.; Hagos, E.; Lampiris, H.; Deeks, S.G. T Cell Activation Is Associated with Lower CD4⁺ T Cell Gains in Human Immunodeficiency Virus-Infected Patients with Sustained Viral Suppression during Antiretroviral Therapy. *J Infect Dis* **2003**, *187*, 1534–1543, doi:10.1086/374786.
131. Khoury, G.; Fromentin, R.; Solomon, A.; Hartogenesis, W.; Killian, M.; Hoh, R.; Somsouk, M.; Hunt, P.W.; Girling, V.; Sinclair, E.; et al. Human Immunodeficiency Virus Persistence and T-Cell Activation in Blood, Rectal, and Lymph Node Tissue in Human Immunodeficiency Virus-Infected Individuals Receiving Suppressive Antiretroviral Therapy. *J Infect Dis* **2017**, *215*, 911–919, doi:10.1093/INFDIS/JIX039.
132. Stiksrud, B.; Aass, H.C.D.; Lørvik, K.B.; Ueland, T.; Trøseid, M.; Dyrhol-Riise, A.M. Activated Dendritic Cells and Monocytes in HIV Immunological Nonresponders: HIV-Induced Interferon-Inducible Protein-10 Correlates with Low Future CD4⁺ Recovery. *AIDS* **2019**, *33*, 1117–1129, doi:10.1097/QAD.0000000000002173.
133. Luo, Z.; Li, Z.; Martin, L.; Hu, Z.; Wu, H.; Wan, Z.; Kilby, M.; Heath, S.L.; Huang, L.; Jiang, W. Increased Natural Killer Cell Activation in HIV-Infected Immunologic Non-Responders Correlates with CD4⁺ T Cell Recovery after Antiretroviral Therapy and Viral Suppression. *PLoS One* **2017**, *12*, doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0167640.
134. Hazra, R.; Mackall, C. Thymic Function in HIV Infection. *Curr HIV/AIDS Rep* **2005**, *2*, 24–28, doi:10.1007/S11904-996-0005-2.

135. Lim, A.; Tan, D.; Price, P.; Kamarulzaman, A.; Tan, H.Y.; James, I.; French, M.A. Proportions of Circulating T Cells with a Regulatory Cell Phenotype Increase with HIV-Associated Immune Activation and Remain High on Antiretroviral Therapy. *AIDS* **2007**, *21*, 1525–1534, doi:10.1097/QAD.0B013E32825EAB8B.
136. Tsunemi, S.; Iwasaki, T.; Imado, T.; Higasa, S.; Kakishita, E.; Shirasaka, T.; Sano, H. Relationship of CD4+CD25+ Regulatory T Cells to Immune Status in HIV-Infected Patients. *AIDS* **2005**, *19*, 879–886, doi:10.1097/01.AIDS.0000171401.23243.56.
137. Read, S.; Mauze, S.; Asseman, C.; Bean, A.; Coffman, R.; Powrie, F. CD38 + CD45RB Low CD4 + T Cells: A Population of T Cells with Immune Regulatory Activities in Vitro., doi:10.1002/(SICI)1521-4141(199811)28:11.
138. Kolte, L.; Gaardbo, J.C.; Skogstrand, K.; Ryder, L.P.; Ersbøll, A.K.; Nielsen, S.D. Increased Levels of Regulatory T Cells (Tregs) in Human Immunodeficiency Virus-Infected Patients after 5 Years of Highly Active Anti-Retroviral Therapy May Be Due to Increased Thymic Production of Naive Tregs. *Clinical and Experimental Immunology* **2009**, *155*, 44, doi:10.1111/J.1365-2249.2008.03803.X.
139. Franzese, O.; Adamo, R.; Pollicita, M.; Comandini, A.; Laudisi, A.; Perno, C.F.; Aquaro, S.; Bonmassar, E. Telomerase Activity, HTERT Expression, and Phosphorylation Are Downregulated in CD4(+) T Lymphocytes Infected with Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1). *J Med Virol* **2007**, *79*, 639–646, doi:10.1002/JMV.20855.
140. Meyaard, L.; Otto, S.A.; Jonker, R.R.; Mijster, M.J.; Keet, R.P.M.; Miedema, F. Programmed Death of T Cells in HIV-1 Infection. *Science (1979)* **1992**, *257*, 217–219, doi:10.1126/science.1352911.
141. Meyaard, L.; Otto, S.A.; Keet, I.P.M.; Roos, M.T.L.; Miedema, F. Programmed Death of T Cells in Human Immunodeficiency Virus Infection. No Correlation with Progression to Disease. *Journal of Clinical Investigation* **1994**, *93*, 982–988, doi:10.1172/JCI117105.
142. Mudd, J.C.; Brenchley, J.M. Gut Mucosal Barrier Dysfunction, Microbial Dysbiosis, and Their Role in HIV-1 Disease Progression. *J Infect Dis* **2016**, *214 Suppl 2*, S58–S66, doi:10.1093/INFDIS/JIW258.
143. Dillon, S.M.; Frank, D.N.; Wilson, C.C. The Gut Microbiome and HIV-1 Pathogenesis: A Two-Way Street. *AIDS* **2016**, *30*, 2737–2751, doi:10.1097/QAD.0000000000001289.
144. Gootenberg, D.B.; Paer, J.M.; Luevano, J.M.; Kwon, D.S. HIV-Associated Changes in the Enteric Microbial Community: Potential Role in Loss of Homeostasis and Development of Systemic Inflammation. *Curr Opin Infect Dis* **2017**, *30*, 31–43, doi:10.1097/QCO.0000000000000341.
145. Shive, C.L.; Mudd, J.C.; Funderburg, N.T.; Sieg, S.F.; Kyi, B.; Bazdar, D.A.; Mangioni, D.; Gori, A.; Jacobson, J.M.; Brooks, A.D.; et al. Inflammatory Cytokines Drive CD4+ T-Cell Cycling and Impaired Responsiveness to Interleukin 7: Implications for Immune Failure in HIV Disease. *J Infect Dis* **2014**, *210*, 619–629, doi:10.1093/INFDIS/JIU125.
146. Vázquez-Castellanos, J.F.; Serrano-Villar, S.; Latorre, A.; Artacho, A.; Ferrús, M.L.; Madrid, N.; Vallejo, A.; Sainz, T.; Martínez-Botas, J.; Ferrando-Martínez, S.; et al. Altered Metabolism of Gut Microbiota Contributes to Chronic Immune Activation in HIV-Infected Individuals. *Mucosal Immunol* **2015**, *8*, 760–772, doi:10.1038/MI.2014.107.

147. Serpa, J.A.; Rueda, A.M.; Somasunderam, A.; Utay, N.S.; Lewis, D.; Couturier, J.P.; Breaux, K.G.; Rodriguez-Barradas, M. Long-Term Use of Proton Pump Inhibitors Is Associated With Increased Microbial Product Translocation, Innate Immune Activation, and Reduced Immunologic Recovery in Patients With Chronic Human Immunodeficiency Virus-1 Infection. *Clin Infect Dis* **2017**, *65*, 1638–1643, doi:10.1093/CID/CIX609.
148. Potter, M.; Oduyungbo, A.; Yang, H.; Saeed, S.; Klein, M.B. Impact of Hepatitis C Viral Replication on CD4+ T-Lymphocyte Progression in HIV-HCV Coinfection before and after Antiretroviral Therapy. *AIDS* **2010**, *24*, 1857–1865, doi:10.1097/QAD.0B013E32833ADB5.
149. Hawkins, C.; Christian, B.; Ye, J.; Nagu, T.; Aris, E.; Chalamilla, G.; Spiegelman, D.; Mugusi, F.; Mehta, S.; Fawzi, W. Prevalence of Hepatitis B Co-Infection and Response to Antiretroviral Therapy among HIV-Infected Patients in Tanzania. *AIDS* **2013**, *27*, 919–927, doi:10.1097/QAD.0B013E32835CB9C8.
150. Appay, V.; Fastenackels, S.; Katlama, C.; Ait-Mohand, H.; Schneider, L.; Guihot, A.; Keller, M.; Grubeck-Loebenstein, B.; Simon, A.; Lambotte, O.; et al. Old Age and Anti-Cytomegalovirus Immunity Are Associated with Altered T-Cell Reconstitution in HIV-1-Infected Patients. *AIDS* **2011**, *25*, 1813–1822, doi:10.1097/QAD.0B013E32834640E6.
151. Taya, N.; Torimoto, Y.; Shindo, M.; Hirai, K.; Hasebe, C.; Kohgo, Y. Fas-Mediated Apoptosis of Peripheral Blood Mononuclear Cells in Patients with Hepatitis C. *Br J Haematol* **2000**, *110*, 89–97, doi:10.1046/J.1365-2141.2000.01945.X.
152. Appay, V.; Fastenackels, S.; Katlama, C.; Ait-Mohand, H.; Schneider, L.; Guihot, A.; Keller, M.; Grubeck-Loebenstein, B.; Simon, A.; Lambotte, O.; et al. Old Age and Anti-Cytomegalovirus Immunity Are Associated with Altered T-Cell Reconstitution in HIV-1-Infected Patients. *AIDS* **2011**, *25*, 1813–1822, doi:10.1097/QAD.0B013E32834640E6.
153. Wood, E.; Montaner, J.S.G.; Yip, B.; Tyndall, M.W.; Schechter, M.T.; O’Shaughnessy, M. v.; Hogg, R.S. Adherence to Antiretroviral Therapy and CD4 T-Cell Count Responses among HIV-Infected Injection Drug Users. *Antivir Ther* **2004**, *9*, 229–235.
154. Cavert, W.; Notermans, D.W.; Staskus, K.; Wietgreffe, S.W.; Zupancic, M.; Gebhard, K.; Henry, K.; Zhang, Z.Q.; Mills, R.; McDade, H.; et al. Kinetics of Response in Lymphoid Tissues to Antiretroviral Therapy of HIV-1 Infection. *Science* **1997**, *276*, 960–964, doi:10.1126/SCIENCE.276.5314.960.
155. Chomont, N.; El-Far, M.; Ancuta, P.; Trautmann, L.; Procopio, F.A.; Yassine-Diab, B.; Boucher, G.; Boulassel, M.R.; Ghattas, G.; Brenchley, J.M.; et al. HIV Reservoir Size and Persistence Are Driven by T Cell Survival and Homeostatic Proliferation. *Nat Med* **2009**, *15*, 893–900, doi:10.1038/NM.1972.
156. Estes, J.D. Pathobiology of HIV/SIV-Associated Changes in Secondary Lymphoid Tissues. *Immunol Rev* **2013**, *254*, 65–77, doi:10.1111/IMR.12070.
157. Schacker, T.W.; Nguyen, P.L.; Beilman, G.J.; Wolinsky, S.; Larson, M.; Reilly, C.; Haase, A.T. Collagen Deposition in HIV-1 Infected Lymphatic Tissues and T Cell Homeostasis. *J Clin Invest* **2002**, *110*, 1133–1139, doi:10.1172/JCI16413.

158. MW, C.; JJ, C.; P, A.; L, W. How Does HIV Cause Depletion of CD4 Lymphocytes? A Mechanism Involving Virus Signaling through Its Cellular Receptors. *Curr Mol Med* **2001**, *1*, 545–550, doi:10.2174/1566524013363320.
159. Massanella, M.; Negredo, E.; Clotet, B.; Blanco, J. Immunodiscordant Responses to HAART – Mechanisms and Consequences. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* **2013**, *9*, 1135–1149, doi:10.1586/1744666X.2013.842897.
160. Negredo, E.; Massanella, M.; Puig, J.; Pérez-Álvarez, N.; Gallego-Escuredo, J.M.; Villarroya, J.; Villarroya, F.; Moltó, J.; Santos, J.R.; Clotet, B.; et al. Nadir CD4 T Cell Count as Predictor and High CD4 T Cell Intrinsic Apoptosis as Final Mechanism of Poor CD4 T Cell Recovery in Virologically Suppressed HIV-Infected Patients: Clinical Implications. *Clinical Infectious Diseases* **2010**, *50*, 1300–1308, doi:10.1086/651689.
161. Moore, R.D.; Keruly, J.C. CD4+ Cell Count 6 Years after Commencement of Highly Active Antiretroviral Therapy in Persons with Sustained Virologic Suppression. *Clinical Infectious Diseases* **2007**, *44*, 441–446, doi:10.1086/510746/2/44-3-441-TBL003.GIF.
162. D’Amico, R.; Yang, Y.; Mildvan, D.; Evans, S.R.; Schnizlein-Bick, C.T.; Hafner, R.; Webb, N.; Basar, M.; Zackin, R.; Jacobson, M.A. Lower CD4+ T Lymphocyte Nadirs May Indicate Limited Immune Reconstitution in HIV-1 Infected Individuals on Potent Antiretroviral Therapy: Analysis of Immunophenotypic Marker Results of AACTG 5067. *Journal of Clinical Immunology* *2005* **25**:2 **2005**, *25*, 106–115, doi:10.1007/S10875-005-2816-0.
163. Ahuja, S.K.; Kulkarni, H.; Catano, G.; Agan, B.K.; Camargo, J.F.; He, W.; O’Connell, R.J.; Marconi, V.C.; Delmar, J.; Eron, J.; et al. CCL3L1-CCR5 Genotype Influences Durability of Immune Recovery during Antiretroviral Therapy of HIV-1-Infected Individuals. *Nat Med* **2008**, *14*, 413–420, doi:10.1038/NM1741.
164. Yong, Y.K.; Shankar, E.M.; Solomon, A.; Spelman, T.; Fairley, C.K.; Elliott, J.H.; Hoy, J.; Cameron, P.U.; Kamarulzaman, A.; Lewin, S.R. Polymorphisms in the CD14 and TLR4 Genes Independently Predict CD4+ T-Cell Recovery in HIV-Infected Individuals on Antiretroviral Therapy. *AIDS* **2016**, *30*, 2159–2168, doi:10.1097/QAD.0000000000001179.
165. Guzmán-Fulgencio, M.; Rallón, N.; Berenguer, J.; Fernández-Rodríguez, A.; Soriano, V.; Miralles, P.; Jiménez-Sousa, M.A.; Restrepo, C.; López, J.C.; García-Álvarez, M.; et al. European Mitochondrial Haplogroups Are Not Associated with Hepatitis C Virus (HCV) Treatment Response in HIV/HCV-Coinfected Patients. *HIV Med* **2014**, *15*, 425–430, doi:10.1111/HIV.12126.
166. Andrade-Santos, J.L.; Carvalho-Silva, W.H.V.; Coelho, A.V.C.; Souto, F.O.; Crovella, S.; Brandão, L.A.C.; Guimarães, R.L. IL18 Gene Polymorphism and Its Influence on CD4+ T-Cell Recovery in HIV-Positive Patients Receiving Antiretroviral Therapy. *Infect Genet Evol* **2019**, *75*, doi:10.1016/J.MEEGID.2019.103997.
167. Greenblatt, R.; Bacchetti, P.; Boylan, R.; Kober, K.; Springer, G.; Anastos, K.; Busch, M.; Cohen, M.; Kassaye, S.; Gustafson, D.; et al. Genetic and Clinical Predictors of CD4 Lymphocyte Recovery during Suppressive Antiretroviral Therapy: Whole Exome Sequencing and Antiretroviral Therapy Response Phenotypes. *PLoS One* **2019**, *14*, doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0219201.

168. Palermo, B.; Bosch, R.J.; Bennett, K.; Jacobson, J.M. Body Mass Index and CD4+ T-Lymphocyte Recovery in HIV-Infected Men with Viral Suppression on Antiretroviral Therapy. *HIV Clin Trials* **2011**, *12*, 222–227, doi:10.1310/HCT1204-222.
169. Jiménez-Sousa, M. ángeles; Martínez, I.; Medrano, L.M.; Fernández-Rodríguez, A.; Resino, S. Vitamin D in Human Immunodeficiency Virus Infection: Influence on Immunity and Disease. *Front Immunol* **2018**, *9*, doi:10.3389/FIMMU.2018.00458.
170. Zhang, J.M.; An, J. Cytokines, Inflammation and Pain. *Int Anesthesiol Clin* **2007**, *45*, 27, doi:10.1097/AIA.0B013E318034194E.
171. Zwerina, J.; Redlich, K.; Schett, G.; Smolen, J.S. Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis: Targeting Cytokines. *Ann N Y Acad Sci* **2005**, *1051*, 716–729, doi:10.1196/ANNALS.1361.116.
172. Zwicky, P.; Unger, S.; Becher, B. Targeting Interleukin-17 in Chronic Inflammatory Disease: A Clinical Perspective. *J Exp Med* **2020**, *217*, doi:10.1084/JEM.20191123.
173. Swingler, S.; Mann, A.; Jacqué, J.M.; Brichacek, B.; Sasseville, V.G.; Williams, K.; Lackner, A.A.; Janoff, E.N.; Wang, R.; Fisher, D.; et al. HIV-1 Nef Mediates Lymphocyte Chemotaxis and Activation by Infected Macrophages. *Nat Med* **1999**, *5*, 997–1003, doi:10.1038/12433.
174. Osborn, L.; Kunkel, S.; Nabel, G.J. Tumor Necrosis Factor Alpha and Interleukin 1 Stimulate the Human Immunodeficiency Virus Enhancer by Activation of the Nuclear Factor Kappa B. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1989**, *86*, 2336–2340, doi:10.1073/PNAS.86.7.2336.
175. Nilsson, J.; Kinloch-De-Loes, S.; Granath, A.; Sönnernborg, A.; Goh, L.E.; Andersson, J. Early Immune Activation in Gut-Associated and Peripheral Lymphoid Tissue during Acute HIV Infection. *AIDS* **2007**, *21*, 565–574, doi:10.1097/QAD.0B013E3280117204.
176. Kotler, D.P.; Reka, S.; Clayton, F. Intestinal Mucosal Inflammation Associated with Human Immunodeficiency Virus Infection. *Dig Dis Sci* **1993**, *38*, 1119–1127, doi:10.1007/BF01295730.
177. McGowan, I.; Elliott, J.; Fuerst, M.; Taing, P.; Boscardin, J.; Poles, M.; Anton, P. Increased HIV-1 Mucosal Replication Is Associated with Generalized Mucosal Cytokine Activation. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes* **2004**, *37*, 1228–1236, doi:10.1097/01.QAI.0000131846.12453.29.
178. Roberts, L.; Passmore, J.A.S.; Williamson, C.; Little, F.; Bebell, L.M.; Mlisana, K.; Burgers, W.A.; van Loggerenberg, F.; Walzl, G.; Djoba Siawaya, J.F.; et al. Plasma Cytokine Levels during Acute HIV-1 Infection Predict HIV Disease Progression. *AIDS* **2010**, *24*, 819, doi:10.1097/QAD.0B013E3283367836.
179. Katsikis, P.D.; Mueller, Y.M.; Villinger, F. The Cytokine Network of Acute HIV Infection: A Promising Target for Vaccines and Therapy to Reduce Viral Set-Point? *PLOS Pathogens* **2011**, *7*, e1002055, doi:10.1371/JOURNAL.PPAT.1002055.
180. Zlotnik, A.; Yoshie, O. Chemokines: A New Classification System and Their Role in Immunity. *Immunity* **2000**, *12*, 121–127, doi:10.1016/S1074-7613(00)80165-X.
181. Hughes, C.E.; Nibbs, R.J.B. A Guide to Chemokines and Their Receptors. *The FEBS Journal* **2018**, *285*, 2944–2971, doi:10.1111/FEBS.14466.

182. Griffith, J.W.; Sokol, C.L.; Luster, A.D. Chemokines and Chemokine Receptors: Positioning Cells for Host Defense and Immunity. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-immunol-032713-120145> **2014**, *32*, 659–702, doi:10.1146/ANNUREV-IMMUNOL-032713-120145.
183. Wang, Z.; Shang, H.; Jiang, Y. Chemokines and Chemokine Receptors: Accomplices for Human Immunodeficiency Virus Infection and Latency. *Frontiers in Immunology* **2017**, *8*, 1274, doi:10.3389/FIMMU.2017.01274/BIBTEX.
184. Charo, I.F.; Ransohoff, R.M. The Many Roles of Chemokines and Chemokine Receptors in Inflammation. <https://doi.org/10.1056/NEJMra052723> **2009**, *354*, 610–621, doi:10.1056/NEJMRA052723.
185. Lee, B.; Montaner, L.J. Chemokine Immunobiology in HIV-1 Pathogenesis. *Journal of Leukocyte Biology* **1999**, *65*, 552–565, doi:10.1002/JLB.65.5.552.
186. Samson, M.; Libert, F.; Doranz, B.J.; Rucker, J.; Liesnard, C.; Farber, M.; Saragosti, S.; Lapoumeroulie, C.; Cognaux, J.; Forceille, C.; et al. Resistance to HIV-1 Infection in Caucasian Individuals Bearing Mutant Alleles of the CCR-5 Chemokine Receptor Gene. *Nature* **1996**, *382*, 6593–6596, doi:10.1038/382722a0.
187. Gulick, R.M.; Fatkenheuer, G.; Burnside, R.; Hardy, W.D.; Nelson, M.R.; Goodrich, J.; Mukwaya, G.; Portsmouth, S.; Heera, J.R. Five-Year Safety Evaluation of Maraviroc in HIV-1–Infected Treatment-Experienced Patients. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes (1999)* **2014**, *65*, 78, doi:10.1097/QAI.0B013E3182A7A97A.
188. Xu, F.; Acosta, E.P.; Liang, L.; He, Y.; Yang, J.; Kerstner-Wood, C.; Zheng, Q.; Huang, J.; Wang, K. Current Status of the Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of HIV-1 Entry Inhibitors and HIV Therapy. *Curr Drug Metab* **2017**, *18*, doi:10.2174/1389200218666170724112412.
189. Connor, R.I.; Sheridan, K.E.; Ceradini, D.; Choe, S.; Landau, N.R. Change in Coreceptor Use Correlates with Disease Progression in HIV-1–Infected Individuals. *Journal of Experimental Medicine* **1997**, *185*, 621–628, doi:10.1084/JEM.185.4.621.
190. Cameron, P.U.; Saleh, S.; Sallmann, G.; Solomon, A.; Wightman, F.; Evans, V.A.; Boucher, G.; Haddad, E.K.; Sekaly, R.P.; Harman, A.N.; et al. Establishment of HIV-1 Latency in Resting CD4+ T Cells Depends on Chemokine-Induced Changes in the Actin Cytoskeleton. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2010**, *107*, 16934–16939, doi:10.1073/PNAS.1002894107/SUPPL_FILE/PNAS.201002894SI.PDF.
191. Suresh, P.; Wanchu, A. Chemokines and Chemokine Receptors in HIV Infection: Role in Pathogenesis and Therapeutics. *Journal of Postgraduate Medicine* **2006**, *52*, 210.
192. Damås, J.K.; Øktedalen, O.; Ueland, T.; Landrø, L.; Barstad, J.; Müller, F.; Frøland, S.S.; Flo, T.H.; Aukrust, P. Enhanced Levels of CCL19 in Patients with Advanced Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS). *Clin Exp Immunol* **2012**, *167*, 492–498, doi:10.1111/J.1365-2249.2011.04524.X.
193. Siliciano, J.D.; Kajdas, J.; Finzi, D.; Quinn, T.C.; Chadwick, K.; Margolick, J.B.; Kovacs, C.; Gange, S.J.; Siliciano, R.F. Long-Term Follow-up Studies Confirm the Stability of the Latent Reservoir for HIV-1 in Resting CD4+ T Cells. *Nature Medicine* **2003**, *9*, 727–728, doi:10.1038/nm880.

194. Gosselin, A.; Monteiro, P.; Chomont, N.; Diaz-Griffero, F.; Said, E.A.; Fonseca, S.; Wacleche, V.; El-Far, M.; Boulassel, M.-R.; Routy, J.-P.; et al. Peripheral Blood CCR4+CCR6+ and CXCR3+CCR6+ CD4+ T Cells Are Highly Permissive to HIV-1 Infection. *The Journal of Immunology* **2010**, *184*, 1604–1616, doi:10.4049/JIMMUNOL.0903058.
195. Yadav, A.; Saini, V.; Arora, S. MCP-1: Chemoattractant with a Role beyond Immunity: A Review. *Clin Chim Acta* **2010**, *411*, 1570–1579, doi:10.1016/J.CCA.2010.07.006.
196. Campbell, G.R.; Spector, S.A. CCL2 Increases X4-Tropic HIV-1 Entry into Resting CD4+ T Cells. *Journal of Biological Chemistry* **2008**, *283*, 30745–30753, doi:10.1074/JBC.M804112200.
197. Ramirez, L.A.; Arango, T.A.; Thompson, E.; Naji, M.; Tebas, P.; Boyer, J.D. High IP-10 Levels Decrease T Cell Function in HIV-1-Infected Individuals on ART. *Journal of Leukocyte Biology* **2014**, *96*, 1055–1063, doi:10.1189/JLB.3A0414-232RR.
198. Wang, Z.; Wu, T.; Ma, M.; Zhang, Z.; Fu, Y.; Liu, J.; Xu, J.; Ding, H.; Han, X.; Chu, Z.; et al. Elevated Interferon- γ -Induced Protein 10 and Its Receptor CXCR3 Impair NK Cell Function during HIV Infection. *Journal of Leukocyte Biology* **2017**, *102*, 163–170, doi:10.1189/JLB.5A1016-444R.
199. Roberts, L.; Passmore, J.A.S.; Williamson, C.; Little, F.; Bebell, L.M.; Mlisana, K.; Burgers, W.A.; van Loggerenberg, F.; Walzl, G.; Djoba Siawaya, J.F.; et al. Plasma Cytokine Levels during Acute HIV-1 Infection Predict HIV Disease Progression. *AIDS* **2010**, *24*, 819–831, doi:10.1097/QAD.0B013E3283367836.
200. Lane, B.R.; King, S.R.; Bock, P.J.; Strieter, R.M.; Coffey, M.J.; Markovitz, D.M. The C-X-C Chemokine IP-10 Stimulates HIV-1 Replication. *Virology* **2003**, *307*, 122–134, doi:10.1016/S0042-6822(02)00045-4.
201. Cecchinato, V.; Bernasconi, E.; Speck, R.F.; Proietti, M.; Sauermann, U.; D'Agostino, G.; Danelon, G.; Rezzonico Jost, T.; Grassi, F.; Raeli, L.; et al. Impairment of CCR6 + and CXCR3 + Th Cell Migration in HIV-1 Infection Is Rescued by Modulating Actin Polymerization . *The Journal of Immunology* **2017**, *198*, 184–195, doi:10.4049/JIMMUNOL.1600568/-/DCSUPPLEMENTAL.
202. Damås, J.K.; Landrø, L.; Fevang, B.; Heggelund, L.; Frøland, S.S.; Aukrust, P. Enhanced Levels of the CCR7 Ligands CCL19 and CCL21 in HIV Infection: Correlation with Viral Load, Disease Progression and Response to Highly Active Antiretroviral Therapy. *AIDS* **2009**, *23*, 135–138, doi:10.1097/QAD.0B013E32831CF595.
203. Caron-Debarle, M.; Lagathu, C.; Boccara, F.; Vigouroux, C.; Capeau, J. HIV-Associated Lipodystrophy: From Fat Injury to Premature Aging. *Trends Mol Med* **2010**, *16*, 218–229, doi:10.1016/J.MOLMED.2010.03.002.
204. Kosmiski, L.; Kuritzkes, D.; Hamilton, J.; Sharp, T.; Lichtenstien, K.; Hill, J.; Eckel, R. Fat Distribution Is Altered in HIV-Infected Men without Clinical Evidence of the HIV Lipodystrophy Syndrome. *HIV Med* **2003**, *4*, 235–240, doi:10.1046/J.1468-1293.2003.00151.X.
205. Jan, V.; Cervera, P.; Maachi, M.; Baudrimont, M.; Kim, M.; Vidal, H.; Girard, P.M.; Levan, P.; Rozenbaum, W.; Lombès, A.; et al. Altered Fat Differentiation and Adipocytokine Expression Are Inter-Related and Linked to Morphological Changes and Insulin Resistance in HIV-1-

- Infected Lipodystrophic Patients: <https://doi.org/10.1177/135965350400900412> **2003**, *9*, 555–564, doi:10.1177/135965350400900412.
206. Kratz, M.; Purnell, J.Q.; Breen, P.A.; Thomas, K.K.; Utzschneider, K.M.; Carr, D.B.; Kahn, S.E.; Hughes, J.P.; Rutledge, E.A.; van Yserloo, B.; et al. Reduced Adipogenic Gene Expression in Thigh Adipose Tissue Precedes Human Immunodeficiency Virus-Associated Lipoatrophy. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **2008**, *93*, 959, doi:10.1210/JC.2007-0197.
207. Deiluiis, J.; Shah, Z.; Shah, N.; Needleman, B.; Mikami, D.; Narula, V.; Perry, K.; Hazey, J.; Kampfrath, T.; Kollengode, M.; et al. Visceral Adipose Inflammation in Obesity Is Associated with Critical Alterations in Tregulatory Cell Numbers. *PLoS One* **2011**, *6*, doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0016376.
208. Nishimura, S.; Manabe, I.; Nagasaki, M.; Eto, K.; Yamashita, H.; Ohsugi, M.; Otsu, M.; Hara, K.; Ueki, K.; Sugiura, S.; et al. CD8+ Effector T Cells Contribute to Macrophage Recruitment and Adipose Tissue Inflammation in Obesity. *Nat Med* **2009**, *15*, 914–920, doi:10.1038/NM.1964.
209. Thewissen, M.M.; Damoiseaux, J.G.; Duijvestijn, A.M.; van Greevenbroek, M.M.; van der Kallen, C.J.; Feskens, E.J.; Blaak, E.E.; Schalkwijk, C.G.; Stehouwer, C.D.; Tervaert, J.W.C.; et al. Abdominal Fat Mass Is Associated with Adaptive Immune Activation: The CODAM Study. *Faculty of Science, Medicine and Health - Papers: part A* **2011**, *19*, 1690, doi:10.1038/oby.2010.337.
210. Couturier, J.; Suliburk, J.; Brown, J.; et al. Human Adipose Tissue as a Reservoir for Memory CD4+ T Cells and HIV. *AIDS* **2015**, *29*, 667–674, doi:10.1097/QAD.0000000000000599.
211. Koethe, J.R.; Hulgan, T.; Niswender, K. Adipose Tissue and Immune Function: A Review of Evidence Relevant to HIV Infection. *J. Infect. Dis.* **2013**, *208*, 1194–1201, doi:10.1093/infdis/jit324.
212. Koethe, J.R.; Jenkins, C.A.; Shepherd, B.E.; Stinnette, S.E.; Sterling, T.R. An Optimal Body Mass Index Range Associated With Improved Immune Reconstitution Among HIV-Infected Adults Initiating Antiretroviral Therapy. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* **2011**, *53*, 952, doi:10.1093/CID/CIR606.
213. Crum-Cianflone, N.F.; Roediger, M.; Eberly, L.E.; Vyas, K.; Landrum, M.L.; Ganesan, A.; Weintrob, A.C.; Barthel, R.V.; Agan, B.K. Obesity among HIV-Infected Persons: Impact of Weight on CD4 Cell Count. *AIDS* **2010**, *24*, 1069–1072, doi:10.1097/QAD.0B013E328337FE01.
214. Lord, G.M.; Matarese, G.; Howard, J.K.; Baker, R.J.; Bloom, S.R.; Lechler, R.I. Leptin Modulates the T-Cell Immune Response and Reverses Starvation- Induced Immunosuppression. *Nature* **1998**, *394*, 897–901, doi:10.1038/29795.
215. Matarese, G. Leptin and the Immune System: How Nutritional Status Influences the Immune Response. *European Cytokine Network* **2000**, *11*, 7–13.
216. Tucureanu, M.M.; Butoi, E.; Gan, A.M.; Stan, D.; Constantinescu, C.A.; Calin, M.; Simionescu, M.; Manduteanu, I. Amendment of the Cytokine Profile in Macrophages Subsequent to Their Interaction with Smooth Muscle Cells: Differential Modulation by Fractalkine and Resistin. *Cytokine* **2016**, *83*, 250–261, doi:10.1016/J.CYTO.2016.04.019.

217. Kosmiski, L.A.; Bacchetti, P.; Kotler, D.P.; Heymsfield, S.B.; Lewis, C.E.; Shlipak, M.G.; Scherzer, R.; Grunfeld, C. Relationship of Fat Distribution with Adipokines in Human Immunodeficiency Virus Infection. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **2008**, *93*, 216, doi:10.1210/JC.2007-1155.
218. Tilg, H.; Moschen, A.R. Adipocytokines: Mediators Linking Adipose Tissue, Inflammation and Immunity. *Nature Reviews Immunology* **2006**, *6*, 772–783, doi:10.1038/nri1937.
219. Coll, B.; Cabre, A.; Alonso-Villaverde, C.; Lazaro, I.; Aragonés, G.; Parra, S.; Girona, J.; Masana, L. The Fatty Acid Binding Protein-4 (FABP4) Is a Strong Biomarker of Metabolic Syndrome and Lipodystrophy in HIV-Infected Patients. *Atherosclerosis* **2008**, *199*, 147–153, doi:10.1016/j.atherosclerosis.2007.09.032.
220. Peraire, J.; López-Dupla, M.; Alba, V.; Beltrán-Debón, R.; Martinez, E.; Domingo, P.; Asensi, V.; Leal, M.; Viladés, C.; Inza, M.I.; et al. HIV/Antiretroviral Therapy-Related Lipodystrophy Syndrome (HALS) Is Associated with Higher RBP4 and Lower Omentin in Plasma. *Clin. Microbiol. Infect.* **2015**, *21*, 711.e1-711.e8, doi:10.1016/j.cmi.2015.04.002.
221. Kralisch, S.; Fasshauer, M. Adipocyte Fatty Acid Binding Protein: A Novel Adipokine Involved in the Pathogenesis of Metabolic and Vascular Disease? *Diabetologia* **2013**, *56*, 10–21, doi:10.1007/s00125-012-2737-4.
222. Watanabe, K.; Watanabe, R.; Konii, H.; Shirai, R.; Sato, K.; Matsuyama, T.A.; Ishibashi-Ueda, H.; Koba, S.; Kobayashi, Y.; Hirano, T.; et al. Counteractive Effects of Omentin-1 against Atherogenesis†. *Cardiovasc Res* **2016**, *110*, 118–128, doi:10.1093/CVR/CVW016.
223. Ceperuelo-Mallafré, V.; Escoté, X.; Viladés, C.; Peraire, J.; Domingo, P.; Solano, E.; Sirvent, J.J.; Pastor, R.; Tinahones, F.; Leal, M.; et al. Zinc Alpha-2 Glycoprotein Is Implicated in Dyslipidaemia in HIV-1-Infected Patients Treated with Antiretroviral Drugs. *HIV Medicine* **2012**, *13*, 297–303, doi:10.1111/j.1468-1293.2011.00976.x.
224. Yang, M.; Liu, R.; Li, S.; Luo, Y.; Zhang, Y.; Zhang, L.; Liu, D.; Wang, Y.; Xiong, Z.; Boden, G.; et al. Zinc-A2-Glycoprotein Is Associated with Insulin Resistance in Humans and Is Regulated by Hyperglycemia, Hyperinsulinemia, or Liraglutide Administration. *Diabetes Care* **2013**, *36*, 1074–1082, doi:10.2337/dc12-0940.
225. Żelechowska, P.; Kozłowska, E.; Pastwińska, J.; Agier, J.; Brzezińska-Błaszczuk, E. Adipocytokine Involvement in Innate Immune Mechanisms. *Journal of Interferon and Cytokine Research* **2018**, *38*, 527–538, doi:10.1089/jir.2018.0102.
226. Zhou, N.; Zhang, X.; Fan, X.; Argyris, E.; Fang, J.; Acheampong, E.; DuBois, G.C.; Pomerantz, R.J. The N-Terminal Domain of APJ, a CNS-Based Coreceptor for HIV-1, Is Essential for Its Receptor Function and Coreceptor Activity. *Virology* **2003**, *317*, 84–94, doi:10.1016/j.virol.2003.08.026.
227. Escoté, X.; Megia, A.; López-Dupla, M.; Miranda, M.; Veloso, S.; Alba, V.; Domingo, P.; Pardo, P.; Viladés, C.; Peraire, J.; et al. A Study of Fatty Acid Binding Protein 4 in HIV-1 Infection and in Combination Antiretroviral Therapy-Related Metabolic Disturbances and Lipodystrophy. *HIV Med.* **2011**, *12*, 428–437, doi:10.1111/j.1468-1293.2010.00903.x.
228. Veloso, S.; Escoté, X.; Ceperuelo-Mallafré, V.; López-Dupla, M.; Peraire, J.; Viladés, C.; Domingo, P.; Castro, A.; Olona, M.; Sirvent, J.-J.; et al. Leptin and Adiponectin, but Not IL18,

- Are Related with Insulin Resistance in Treated HIV-1-Infected Patients with Lipodystrophy. *Cytokine* **2012**, *58*, 253–260, doi:10.1016/j.cyto.2012.01.013.
229. Chatterjee, A.; Rathore, A.; Vidyant, S.; Kakkar, K.; Dhole, T.N. Chemokines and Chemokine Receptors in Susceptibility to HIV-1 Infection and Progression to AIDS. *Disease Markers* **2012**, *32*, 143–151, doi:10.3233/DMA-2011-0874.
230. Evans, V.A.; Khoury, G.; Saleh, S.; Cameron, P.U.; Lewin, S.R. HIV Persistence: Chemokines and Their Signalling Pathways. *Cytokine & Growth Factor Reviews* **2012**, *23*, 151–157, doi:10.1016/J.CYTOGFR.2012.05.002.
231. Soriano, A.; Martínez, C.; García, F.; Plana, M.; Palou, E.; Lejeune, M.; Aróstegui, J.I.; de Lazzari, E.; Rodriguez, C.; Barrasa, A.; et al. Plasma Stromal Cell-Derived Factor (SDF)-1 Levels, SDF1-3'A Genotype, and Expression of CXCR4 on T Lymphocytes: Their Impact on Resistance to Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection and Its Progression. *J Infect Dis* **2002**, *186*, 922–931, doi:10.1086/343741.
232. Murphy, P.M.; Heusinkveld, L. Multisystem Multitasking by CXCL12 and Its Receptors CXCR4 and ACKR3. *Cytokine* **2018**, *109*, 2–10, doi:10.1016/J.CYTO.2017.12.022.
233. Arenzana-Seisdedos, F. SDF-1/CXCL12: A Chemokine in the Life Cycle of HIV. *Frontiers in Immunology* **2015**, *6*, 256, doi:10.3389/FIMMU.2015.00256/BIBTEX.
234. Daar, E.S.; Lynn, H.S.; Donfield, S.M.; Lail, A.; O'Brien, S.J.; Huang, W.; Winkler, C.A. Stromal Cell-Derived Factor-1 Genotype, Coreceptor Tropism, and HIV Type 1 Disease Progression. *Journal of Infectious Diseases* **2005**, *192*, 1597–1605, doi:10.1086/496893/2/192-9-1597-FIG002.GIF.
235. Restrepo, C.; Gutierrez-Rivas, M.; Pacheco, Y.M.; García, M.; Blanco, J.; Medrano, L.M.; Navarrete-Muñoz, M.A.; Gutiérrez, F.; Miralles, P.; Dalmau, D.; et al. Genetic Variation in CCR2 and CXCL12 Genes Impacts on CD4 Restoration in Patients Initiating CART with Advanced Immunesuppression. *PLoS ONE* **2019**, *14*, 1–13, doi:10.1371/journal.pone.0214421.
236. Butrym, A.; Gebura, K.; Iwaszko, M.; Kuliczowski, K.; Bogunia-Kubik, K.; Mazur, G. Dual Role of the CXCL12 Polymorphism in Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia. *HLA* **2016**, *87*, 432–438, doi:10.1111/TAN.12810.
237. Angela Covino, D.; Sabbatucci, M.; Fantuzzi, L. The CCL2/CCR2 Axis in the Pathogenesis of HIV-1 Infection: A New Cellular Target for Therapy? *Current Drug Targets* **2015**, *17*, 76–110, doi:10.2174/138945011701151217110917.
238. Lee, W.J.; Liao, Y.C.; Wang, Y.F.; Lin, I.F.; Wang, S.J.; Fuh, J.L. Plasma MCP-1 and Cognitive Decline in Patients with Alzheimer's Disease and Mild Cognitive Impairment: A Two-Year Follow-up Study. *Sci Rep* **2018**, *8*, doi:10.1038/S41598-018-19807-Y.
239. Barmania, F.; Pepper, M.S. C-C Chemokine Receptor Type Five (CCR5): An Emerging Target for the Control of HIV Infection. *Applied & Translational Genomics* **2013**, *2*, 3–16, doi:10.1016/J.ATG.2013.05.004.
240. Fantuzzi, L.; Tagliamonte, M.; Gauzzi, M.C.; Lopalco, L. Dual CCR5/CCR2 Targeting: Opportunities for the Cure of Complex Disorders. *Cellular and Molecular Life Sciences* **2019**, *76*, 4869–4886, doi:10.1007/S00018-019-03255-6/FIGURES/3.

241. Ellwanger, J.H.; Kulmann-Leal, B.; Kaminski, V. de L.; Rodrigues, A.G.; Bragatte, M.A. de S.; Chies, J.A.B. Beyond HIV Infection: Neglected and Varied Impacts of CCR5 and CCR5 Δ 32 on Viral Diseases. *Virus Research* **2020**, *286*, 198040, doi:10.1016/J.VIRUSRES.2020.198040.
242. Miao, M.; de Clercq, E.; Li, G. Clinical Significance of Chemokine Receptor Antagonists. <https://doi.org/10.1080/17425255.2020.1711884> **2020**, *16*, 11–30, doi:10.1080/17425255.2020.1711884.
243. Hütter, G.; Neumann, M.; Nowak, D.; Klein, S.; Klüter, H.; Hofmann, W.K. The Effect of the CCR5-Delta32 Deletion on Global Gene Expression Considering Immune Response and Inflammation. *Journal of Inflammation* **2011**, *8*, 1–8, doi:10.1186/1476-9255-8-29/TABLES/2.
244. Zhu, Q.; Zhu, P.; Zhang, Y.; Li, J.; Ma, X.; Li, N.; Wang, Q.; Xue, X.; Luo, L.; Li, Z.; et al. Analysis of Social and Genetic Factors Influencing Heterosexual Transmission of HIV within Serodiscordant Couples in the Henan Cohort. *PLOS ONE* **2015**, *10*, e0129979, doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0129979.
245. Rollover Study of Cenicriviroc for the Treatment of Liver Fibrosis in Participants With Nonalcoholic Steatohepatitis - Full Text View - ClinicalTrials.Gov Available online: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03059446> (accessed on 4 May 2022).
246. Devarapu, S.K.; Kumar VR, S.; Rupanagudi, K.V.; Kulkarni, O.P.; Eulberg, D.; Klussmann, S.; Anders, H.J. Dual Blockade of the Pro-Inflammatory Chemokine CCL2 and the Homeostatic Chemokine CXCL12 Is as Effective as High Dose Cyclophosphamide in Murine Proliferative Lupus Nephritis. *Clinical Immunology* **2016**, *169*, 139–147, doi:10.1016/J.CLIM.2016.07.003.
247. Morimoto, H.K.; Simão, A.N.C.; Almeida, E.R.D. de; Ueda, L.T.; Oliveira, S.R.; de Oliveira, N.B.; Petenucci, D.L.; Panis, C.; Cecchini, R.; Dichi, I.; et al. Role of Metabolic Syndrome and Antiretroviral Therapy in Adiponectin Levels and Oxidative Stress in HIV-1 Infected Patients. *Nutrition* **2014**, *30*, 1324–1330, doi:10.1016/j.nut.2014.03.017.
248. Ketlogetswe, K.S.; Post, W.S.; Li, X.; Palella, F.J.; Jacobson, L.P.; Margolick, J.B.; Kingsley, L.A.; Witt, M.D.; Dobs, A.S.; Budoff, M.J.; et al. Lower Adiponectin Is Associated with Subclinical Cardiovascular Disease among HIV-Infected Men. *AIDS* **2014**, *28*, 901–909, doi:10.1097/QAD.000000000000186.
249. Lago, F.; Dieguez, C.; Gómez-Reino, J.; Gualillo, O. Adipokines as Emerging Mediators of Immune Response and Inflammation. *Nat. Clin. Pract. Rheumatol.* **2007**, *3*, 716–724, doi:10.1038/ncprheum0674.
250. Recinella, L.; Orlando, G.; Ferrante, C.; Chiavaroli, A.; Leone, S. Adipokines: New Potential Therapeutic Target for Obesity and Metabolic, Rheumatic, and Cardiovascular Diseases. *Front. physiol.* **2020**, *11*, doi:10.3389/fphys.2020.578966.
251. Żelechowska, P.; Brzezińska-Błaszczak, E.; Kusowska, A.; Kozłowska, E. The Role of Adipokines in the Modulation of Lymphoid Lineage Cell Development and Activity: An Overview. *Obes. Rev.* **2020**, *21*, doi:10.1111/obr.13055.
252. Niersmann, C.; Röhrig, K.; Blüher, M.; Roden, M.; Herder, C.; Carstensen-Kirberg, M. Increased Release of Proinflammatory Proteins in Primary Human Adipocytes and Activation of the Inflammatory NF κ B, P38, and ERK Pathways upon Omentin Treatment. *Obes. facts* **2020**, *13*, 221–236, doi:10.1159/000506405.

253. Michalczyk, K.; Niklas, N.; Rychlicka, M.; Cymbaluk-Płoska, A.; Baldassarre, G. Diagnostics The Influence of Biologically Active Substances Secreted by the Adipose Tissue on Endometrial Cancer. *Diagnostics* **2021**, *11*, doi:10.3390/diagnostics11030494.
254. Tsang, J.Y.S.; Li, D.; Ho, D.; Peng, J.; Xu, A.; Lamb, J.; Chen, Y.; Tam, P.K.H. Novel Immunomodulatory Effects of Adiponectin on Dendritic Cell Functions. *International Immunopharmacology* **2011**, *11*, 604–609, doi:10.1016/j.intimp.2010.11.009.
255. Zabetian-Targhi, F.; Mirzaei, K.; Keshavarz, S.A.; Hossein-Nezhad, A. Modulatory Role of Omentin-1 in Inflammation: Cytokines and Dietary Intake. *J. Am. Coll. Nutr.* **2016**, *35*, 670–678, doi:10.1080/07315724.2015.1126207.
256. Liu, R.; Zhao, P.; Zhang, Q.; Che, N.; Xu, L.; Qian, J.; Tan, W.; Zhang, M. Adiponectin Promotes Fibroblast-like Synoviocytes Producing IL-6 to Enhance T Follicular Helper Cells Response in Rheumatoid Arthritis. *Clin. Exp. Rheumatol.* **2020**, *38*, 11–18.
257. Scotece, M.; Pérez, T.; Conde, J.; Abella, V.; López, V.; Pino, J.; Gonzalez-Gay, M.A.; Gomez-Reino, J.J.; Mera, A.; Gomez, R.; et al. Adipokines Induce Pro-Inflammatory Factors in Activated Cd4+ T Cells from Osteoarthritis Patient. *Journal of Orthopaedic Research* **2017**, *35*, 1299–1303, doi:10.1002/jor.23377.
258. Cheng, X.; Folco, E.J.; Shimizu, K.; Libby, P. Adiponectin Induces Pro-Inflammatory Programs in Human Macrophages and CD4+ T Cells. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 36896–36904, doi:10.1074/jbc.M112.409516.
259. Choi, H.M.; Doss, H.M.; Kim, K.S. Multifaceted Physiological Roles of Adiponectin in Inflammation and Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, doi:10.3390/IJMS21041219.
260. Lei, L.; Li, K.; Li, L.; Fang, X.; Zhou, T.; Zhang, C.; Luo, Y.; Liu, H.; Li, X.; Zheng, H.; et al. Circulating Zinc-A2-Glycoprotein Levels Are Low in Newly Diagnosed Patients with Metabolic Syndrome and Correlate with Adiponectin. *Nutr. Metab.* **2017**, doi:10.1186/s12986-017-0210-6.
261. Wang, C. Obesity, Inflammation, and Lung Injury (OILI): The Good. *Mediat. Inflamm.* **2014**, *2014*, doi:10.1155/2014/978463.
262. Noh, J.Y.; Shin, J.U.; Kim, J.H.; Kim, S.H.; Kim, B.M.; Kim, Y.H.; Park, S.; Kim, T.G.; Shin, K.O.; Park, K.; et al. ZAG Regulates the Skin Barrier and Immunity in Atopic Dermatitis. *J. Investig. Dermatol.* **2019**, *139*, 1648-1657.e7, doi:10.1016/j.jid.2019.01.023.
263. Castan-Laurell, I.; Dray, C.; Attané, C.; Duparc, T.; Knauf, C.; Valet, P. Apelin, Diabetes, and Obesity. *Endocrine* **2011**, *40*, 1–9, doi:10.1007/s12020-011-9507-9.
264. Zou, M.X.; Liu, H.Y.; Haraguchi, Y.; Soda, Y.; Tatemoto, K.; Hoshino, H. Apelin Peptides Block the Entry of Human Immunodeficiency Virus (HIV). *FEBS Letters* **2000**, *473*, 15–18, doi:10.1016/S0014-5793(00)01487-3.
265. Marchetti, G.; Gori, A.; Casabianca, A.; Magnani, M.; Franzetti, F.; Clerici, M.; Perno, C.F.; Monforte, A.D.A.; Galli, M.; Meroni, L. Comparative Analysis of T-Cell Turnover and Homeostatic Parameters in HIV-Infected Patients with Discordant Immune-Virological Responses to HAART. *Aids* **2006**, *20*, 1727–1736, doi:10.1097/01.aids.0000242819.72839.db.

266. Tincati, C.; Merlini, E.; Braidotti, P.; Ancona, G.; Savi, F.; Tosi, D.; Borghi, E.; Callegari, M.L.; Mangiavillano, B.; Barassi, A.; et al. Impaired Gut Junctional Complexes Feature Late-Treated Individuals with Suboptimal CD4 + T-Cell Recovery upon Virologically Suppressive Combination Antiretroviral Therapy. *AIDS* **2016**, *30*, 991–1003, doi:10.1097/QAD.0000000000001015.
267. Zhang, L.X.; Song, J.W.; Zhang, C.; Fan, X.; Huang, H.H.; Xu, R.N.; Liu, J.Y.; Zhang, J.Y.; Wang, L.F.; Zhou, C.B.; et al. Dynamics of HIV Reservoir Decay and Naïve CD4 T-Cell Recovery between Immune Non-Responders and Complete Responders on Long-Term Antiretroviral Treatment. *Clin. Immunol.* **2021**, *229*, 108773, doi:10.1016/J.CLIM.2021.108773.
268. Karamfilova, V.; Gateva, A.; Alexiev, A.; Zheleva, N.; Velikova, T.; Ivanova-Boyanova, R.; Ivanova, R.; Cherkezov, N.; Kamenov, Z.; Mateva, L. The Association between Retinol-Binding Protein 4 and Prediabetes in Obese Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Arch. Physiol. Biochem.* **2019**, doi:10.1080/13813455.2019.1673429.
269. Jeong, S.J.; Chin, B.S.; Chae, Y.T.; Jin, S.J.; Ku, N.S.; Baek, J.H.; Han, S.H.; Kim, C.O.; Choi, J.Y.; Song, Y.G.; et al. Serum Retinol-Binding Protein-4 Levels Are Increased in HIV-Infected Subjects with Metabolic Syndrome Receiving Highly Active Antiretroviral Therapy. *Yonsei Med. J.* **2012**, *53*, 1211–1215, doi:10.3349/ymj.2012.53.6.1211.
270. Han, S.H.; Chin, B.S.; Lee, H.S.; Jeong, S.J.; Choi, H.K.; Kim, C.O.; Choi, J.Y.; Song, Y.G.; Lee, H.C.; Kim, J.M. Serum Retinol-Binding Protein 4 Correlates with Obesity, Insulin Resistance, and Dyslipidemia in HIV-Infected Subjects Receiving Highly Active Antiretroviral Therapy. *Metab.: Clin. Exp.* **2009**, *58*, 1523–1529, doi:10.1016/j.metabol.2009.04.021.
271. Blanco, J.R.; Romero, L.; Ramalle-Gómara, E.; Metola, L.; Ibarra, V.; Sanz, M.; Oteo, J.A.; Garcia, A.; Pérez-Martínez, L. Retinol-Binding Protein 4 (RBP4), a Potential Biomarker of Frailty in HIV-Infected People on Stable Antiretroviral Therapy. *HIV Med.* **2020**, *21*, 358–364, doi:10.1111/hiv.12837.

VIII ANEXO

Otras publicaciones

- Jenifer Masip; Norma Rallón; **Elena Yeregui**; Montserrat Olona; Salvador Resino; José M Benito; Consuelo Viladés; Graciano García-Pardo; José Alcamí; Ezequiel Ruiz-Mateos; Frederic Gómez-Bertomeu; Montserrat Vargas; Marta Navarro; José A Oteo; Juan A Pineda; Anna Martí; Verónica Alba; Francesc Vidal; Joaquim Peraire; Anna Rull. Elevated α -Ketoglutaric Acid Concentrations and a Lipid-Balanced Signature Are the Key Factors in Long-Term HIV Control. *Front. Immunol.* **2022**, *13*, 1–11, doi:10.3389/fimmu.2022.822272.
- Carles Perpiñan; Laia Bertrán; Ximena Terra; Carmen Aguilar; Jessica Binetti; Miguel Lopez-Dupla; Anna Rull; Laia Reverte; **Elena Yeregui**; Frederic Gómez-Bertomeu; Joaquim Peraire; Teresa Auguet. Resistin and IL-15 as Predictors of Invasive Mechanical Ventilation in COVID-19 Pneumonia Irrespective of the Presence of Obesity and Metabolic Syndrome. *J. Pers. Med.* **2022**, *12*, doi:10.3390/jpm12030391.
- Laia Reverte; **Elena Yeregui**; Montserrat Olona; Alicia Gutiérrez-Valencia; María José Buzón; Anna Martí; Frederic Gómez-Bertomeu; Teresa Auguet; Luis F. López-Cortés; Joaquin Burgos; Clara Benavent-Bofill; Carme Boque; Graciano Garcia-Pardo; Ezequiel Ruiz-Mateos; Maria Teresa Mestre; Francesc Vidal; Consuelo Vilades; Joaquim Peraire; Anna Rull. Fetuin-A, inter- α -trypsin inhibitor, glutamic acid and ChoE (18:0) are key biomarkers in a panel distinguishing mild from critical coronavirus disease 2019 outcomes. *Clin. Transl. Med.* **2022**, *12*, 1–7, doi:10.1002/ctm2.704.
- Carles Perpiñan; Laia Bertran; Ximena Terra; Carmen Aguilar; Miguel Lopez-Dupla; Ajla Alibalic; David Riesco; Javier Camaron; Francesco Perrone; Anna Rull; Laia Reverte; **Elena Yeregui**; Anna Martí; Francesc Vidal; Teresa Auguet. Predictive biomarkers of COVID-19 severity in SARS-CoV-2 infected patients with obesity and metabolic syndrome. *J. Pers. Med.* **2021**, *11*, doi:10.3390/jpm11030227.

Premios y becas

- Contrato predoctoral de formación en investigación de la salud (PFIS). IISCI. Convocatoria 2020. FI20/00118
- Premio Josep Barrio a la mejor publicación científica en el área de infectología por el artículo “High circulating SDF-1 and MCP-1 levels and genetic variations in CXCL12, CCL2 and CCR5: prognostic signature of immune recovery status in treated HIV-positive patients”. Societat Catalanobalear de Malalties Infeccioses i Microbiologia Clínica. Octubre 2021
- Premio Ramón de Teserach. en reconocimiento a las actividades de la promoción de la salud llevadas a cabo por una entidad cívica sin ánimo de lucro, por el proyecto de “Cribado de cáncer de cuello de útero en el distrito de Kamwenge, Uganda. Acadèmia de Ciències Mèdiques i de la Salut de Catalunya i de Balears. Mayo 2022