



Universitat Autònoma de Barcelona

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

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

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



**Universitat Autònoma
de Barcelona**

DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I
BIOLOGIA MOLECULAR

FACULTAT DE BIOCIÈNCIES

UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE
BARCELONA

**POSADA A PUNT I APLICACIÓ D'UNA NOVA
TÈCNICA PER A LA CARACTERITZACIÓ DEL
RESERVORI DEL VIH I AVALUACIÓ D'UN NOU
COMPOST NATURAL COM A AGENT REVERSOR
DE LA LATÈNCIA**

Tesi doctoral presentada per Judith Grau Expósito per optar al títol de Doctor en Bioquímica, Biologia Molecular i Biomedicina per la Universitat Autònoma de Barcelona

Dra. Maria José Buzón

Directora

Dra. Anna Meseguer

Tutora

Judith Grau Expósito

Doctoranda

Barcelona, Setembre de 2020

A la meva família i a en Xavi,
per acompanyar-me en aquesta aventura.

Índex

ABREVIATURES	7
I. INTRODUCCIÓ	9
1. Història de la malaltia	11
2. Virus de la Immunodeficiència humana (VIH)	12
2.1. Estructura dels virus: genoma i partícules virals	12
2.2. Cicle replicatiu del VIH-1	14
3. Patogènesi de la infecció per VIH-1	18
3.1. Primoinfecció o fase aguda	19
3.2. Fase crònica	20
3.3. Estadis avançats o fase SIDA	20
3.4. Patogènesi en presència de la teràpia antiretroviral	20
4. Latència, reservoris i persistència viral	24
4.1. Reservoris cel·lulars del VIH-1	24
4.2. Reservoris anatòmics del VIH-1	27
4.3. Mecanismes de persistència viral	29
4.4. Tipus de latència i mecanismes moleculars implicats	32
4.5. Tècniques quantificació reservori	34
5. Resposta immunitària front al VIH	40
5.1. Immunitat innata	40
5.2. Immunitat adaptativa	41
6. Estratègies per la cura de la infecció per VIH	44
II. HIPÒTESI I OBJECTIUS	55
III. RESULTATS	61
TREBALL 1	63
TREBALL 2	91
TREBALL 3	123
IV. DISCUSSIÓ	169
V. CONCLUSIONS	185

VI. LÍNIES DE FUTUR	189
VII. BIBLIOGRAFIA	193
VIII. ANNEX.....	213
Taula 3	215
IX. LLISTA DE PUBLICACIONS	217

ABREVIATURES

Llista d'abreviatures més utilitzades a la tesi

ADN: àcid desoxiribonucleic

ADNc: àcid desoxiribonucleic codificant

ARN: àcid ribonucleic

ARNm: àcid ribonucleic missatger

CA: càpsida

CCR5: *C-C chemokine receptor type 5*

CXCR4: *C-X-C motif chemokine receptor type 4*

DC: *dendritic cell*

ddPCR: *droplet digital PCR*

EC: *elite controllers*

Env: *Envelope*

FDA: *US food and drug administration*

FISH: *Fluorescence In Situ Hybridization*

GALT: *gut-associated lymphoid tissue*

HDAC: *histone deacetylase*

HDACi: *histone deacetylase inhibitor*

IL: *interleukin*

IN: integrasa

IP: inhibidors de la proteasa

IPDA: *intact Proviral DNA Assay*

ITIAN: inhibidors de la transcriptasa inversa anàlegs de nucleòsids

ITINAN: inhibidors de la transcriptasa inversa no anàlegs de nucleòsid

LA: *lauric acid*

LRA: *latency reversal agent*

LTR: *long terminal repeat*

MA: matriu

NC: nucleocàpsida

NF- κ B: *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*

NK: *natural killer*

PBMC: *peripheral blood mononuclear cells*

PCR: *polimerase chain reaction*

PKC: *protein kinase C*

PMA: *phorbol 12-myristate 13-acetate*

PTC: *post-treatment controller*

QVOA: *quantitative Viral Outgrowth Assay*

RT: *reverse transcriptase*

SIDA: síndrome de la inmunodeficiència humana

TAR: teràpia antitretroviral

T_{CM}: central memory T cell

T_{EM}: effector memory T cell

T_{FH}: *follicular helper T cell*

T_H: *helper T cell*

TILDA: *tat/rev induced limiting dilution assay*

TLR: *toll like receptor*

T_{NA}: *naive T cell*

T_{RM}: *resident memory T cell*

T_{SCM}: *stem memory T cell*

T_{TM}: *transitional memory T cell*

VIH: virus de la immunodeficiència humana

I. INTRODUCCIÓ

1. HISTÒRIA DE LA MALALTIA

Fa gairebé 40 anys, concretament l'any 1981, la plataforma Centers for Disease Control and Prevention (CDC) va descriure casos de pneumònia, causada per *Pneumocystis carinii* (actualment coneguda com a *P. jirovecii*), i de sarcoma de Kaposi en homes homosexuals a Los Angeles i Nova York (USA), documentant així, els primers casos del que més endavant seria conegut com la síndrome de la immunodeficiència adquirida (SIDA)[1, 2]. Cal destacar, però, que estudis retrospectius realitzats en mostres de sèrum de pacients afectats d'hepatitis han permès documentar el primer cas d'infecció causada pel virus de la immunodeficiència humana (VIH) a principis del 1979[3]. A partir d'aquell moment, es van començar a identificar altres casos en homes homosexuals però també en usuaris de droga per via intravenosa, persones amb hemofília i receptors de transfusions sanguínies, constituint aquests col·lectius els principals grups de risc. Aquests fets van conduir a la sospita de que la transmissió es produïa per contacte sexual però també per contacte sanguini. Posteriors casos en heterosexuals i infants van indicar que la transmissió podia ser també de mare a fill[4, 5].

L'any 1983, Luc Montagnier i Françoise Barré-Sinoussi, investigadors del Institute Pasteur (París, França), van identificar un nou retrovirus que va ser proposat com l'agent causal del SIDA i ja es van proporcionar les primeres recomanacions per evitar-ne el contagi[6, 7]. Un any més tard i de manera paral·lela, dos grups d'investigadors del National Institute of Health (NIH, USA)[8-10] i la Universitat de Califòrnia (UCSF, USA)[11] van aïllar aquest mateix retrovirus donant força a la idea de que aquest nou virus era l'agent que estaven buscant. L'any 1985, es van aprovar per la Food and Drug Administration (FDA) les primeres proves diagnòstiques per a la detecció del virus que fins al moment havia rebut diferent nomenclatura (LAV, HTLVIII o ASR). Va ser a l'any 1986, que el International Committee of the Taxonomy of Viruses va determinar que aquest virus trobat de manera independent per diferents investigadors passaria a ser anomenat virus de la immunodeficiència humana (VIH)[12]. Després de 6 anys des de la identificació del primer cas de malaltia es va aprovar el primer fàrmac antiretroviral, zidovudine (AZT), per al tractament de la infecció pel VIH[12] promovent un gran avenç en la lluita contra la SIDA.

Gairebé 40 anys han passat des de la identificació del primer cas d'infecció pel VIH als Estats Units, i més de 74 milions [58.3-98.1 milions] de persones han contret la infecció des de l'inici de la pandèmia. Segons la Organització Mundial de la Salut en VIH/SIDA (ONUSIDA), a finals de l'any 2018 hi havia 37.9 milions [32.7-44.0 milions] de persones infectades pel virus arreu del món, de les quals només 24.5 milions [21.6-25.5 milions] tenien accés a teràpia antiretroviral. Cal dir que, tot i l'aparició de nous fàrmacs antiretrovirals altament eficaços que han permès la cronificació de la malaltia i la

disminució exponencial de la mortalitat associada, la infecció per VIH segueix sent un gran problema de salut a nivell mundial.

2. VIRUS DE LA IMMUNODEFICIÈNCIA HUMANA (VIH)

La família *Retroviridae* engloba un gran nombre de virus associats a diferents patologies, incloent tumors, desordres neurològics i immunodeficiències, entre d'altres. La infecció per un retrovirus sol ser asimptomàtica i, en molts casos, el virus queda integrat en l'ADN cel·lular de l'hoste. Els retrovirus poden classificar-se en dos tipus: complexes i simples; i tots ells contenen 3 gens indispensables: gag, pol i env. Els retrovirus complexes poden incorporar, a més, gens que codifiquen per proteïnes reguladores (p. ex. tat o rev).

- Gen gag: Dirigeix la síntesi de les proteïnes internes del virió com la matriu (MA), la càpsida (CA) i la nucleocàpsida (NC).
- Gen pol: Conté la informació per a la transcriptasa reversa (RT) i la integrasa (IN) del virus.
- Gen env: Codifica per les proteïnes transmembrana i les de superfície localitzades a la càpsida com, per exemple, gp120 o gp41 en el cas del VIH.

Dins de la família *Retroviridae* es troba el virus de la immunodeficiència humana (VIH), que és l'agent causal de la síndrome de la immunodeficiència adquirida en humans (SIDA) i que forma part del gènere dels lentivirus. Les infeccions d'aquests virus mostren, típicament, un curs crònic de la malaltia, amb un llarg període de latència clínica i una replicació viral persistent[13]. S'han identificat dos subtipus del virus capaços d'infectar a humans: VIH-1 i VIH-2, sent el primer el que presenta una taxa de mutació extraordinàriament més elevada, el més estès a nivell mundial i el responsable de causar la majoria dels casos d'infecció pel VIH[14, 15]. El VIH-2 presenta una virulència menor amb un curs de la infecció més lent i una distribució més limitada, ja que es localitza principalment en zones de l'Àfrica central i occidental[16, 17]. Tots dos subtipus deriven de múltiples creuaments i transmissions del virus de la immunodeficiència en simis (VIS), el qual a través d'un procés de transmissió zoonòtica va infectar a humans donant lloc al virus de la immunodeficiència humana (VIH). Diverses investigacions indiquen que el VIH-1 està estretament relacionat amb una soca de VIS trobada en ximpanzés[18, 19], mentre que el VIH-2 ho està amb una soca de VIS trobada en micos mangabeis[20].

2.1 Estructura del virus: genoma i partícules virals

Els virions madurs de VIH-1 són partícules amb una morfologia esfèrica de 100-120nm de diàmetre i que presenten una membrana de bicapa lipídica que envolta la nucleocàpsida (NC) que conté les molècules d'ARN genòmiques (dues molècules amb cadena simple d'ARN de 9.8kb), la proteasa viral (PR), la transcriptasa inversa (RT), la

integrasa (IN), les proteïnes accessòries Vpu, Vif, Vpr i Nef i alguns factors cel·lulars[21, 22] (Fig. 1).

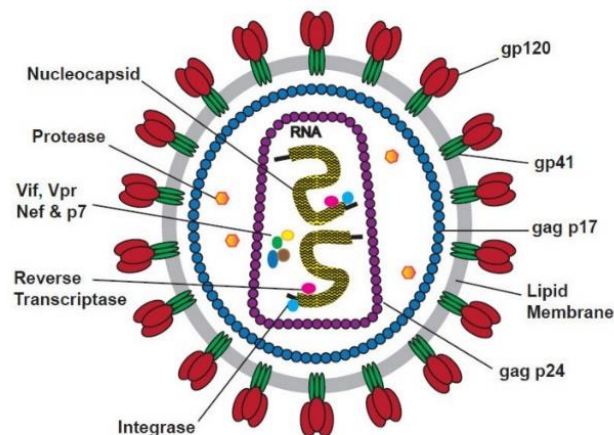


Figura 1. Estructura del VIH-1. Representació esquemàtica de l'estructura d'una partícula viral infecciosa. Imatge extreta de <https://www.eenzyme.com/HIV-research-tools.aspx>.

La partícula de VIH-1 presenta una estructura organitzada en 3 capes:

1. La interna o nucleoide: Conté les dues cadenes d'ARN, la nucleoproteïna i els enzims virals.
2. Una càpsida icosaèdrica.
3. Una envolta -lipídica (obtinguda per gemmació).

La membrana que conforma la envolta lipídica conté dues glicoproteïnes codificades pel gen env del virus que s'incorporen durant l'etapa d'acoblament i sortida del viriό de la cèl·lula hoste, gp41 i gp120. D'aquestes dues glicoproteïnes presents en l'envolta, una d'elles és transmembrana (gp41) i juga un paper important en el procés de fusió del virus amb la cèl·lula hoste, i l'altra és una glicoproteïna de superfície (gp120) que intervé en la interacció amb la molècula de CD4. A més, a l'envolta del virus també es troben proteïnes derivades d'aquesta cèl·lula hoste, com serien receptors cel·lulars, actina, ubiquitina i el complex major d'histocompatibilitat (MCH) de tipus I i II, entre d'altres. Pel que fa a la càpsida, aquesta està formada principalment per la proteïna estructural p24, codificada pel gen gag, i al seu interior conté les dues cadenes d'ARN de polaritat positiva i altres proteïnes catalítiques implicades en el cicle replicatiu (transcriptasa inversa, integrasa i proteasa), les quals són codificades pel gen pol. Així doncs, a grans trets, el gen gag proveeix al virus de la seva infraestructura bàsica, el gen pol proporciona els mecanismes necessaris per a que el retrovirus pugui replicar-se, el gen env codifica per als elements necessaris per generar la envolta lipídica, mentre que la resta de gens ajuden al virus a interaccionar i entrar a la cèl·lula hoste i millorar la seva replicació.

També hi ha quatre proteïnes accessòries, Nef, Vpu, Vif i Vrp, i dues proteïnes reguladores essencials, Rev i Tat, que tenen funció en la cèl·lula hoste i són necessàries per la replicació del virus doncs són les responsables d'induir la transcripció de l'ADN proviral i de transportar els transcrits d'ARN del nucli al citoplasma. Tot i que les funcions de les proteïnes accessòries no està del tot ben caracteritzada, s'ha observat que aquestes proteïnes actuen com a mecanisme per contrarestar la resposta antiviral per part de la cèl·lula infectada[13, 23-26]. Flanquejant els gens que codifiquen per totes aquestes proteïnes, es troben els *long terminal repeat* (LTR) que contenen elements implicats en l'expressió gènica (Fig. 2). Aquests LTR tenen una gran importància degut a la seva implicació en l'establiment de la latència, doncs l'extrem 5' actua com a regulador transcripcional ja que presenta llocs d'unió a diversos factors de transcripció tals com C-Myc, NF- κ B, USF, AP1, COUP, TCF-1 α , SP1. Tots aquests factors actuen de forma conjunta per regular la transcripció del VIH, de manera que, per exemple, SP1 és responsable de reclutar a C-Myc a l'extrem 5' i aquesta associació farà que augmenti el reclutament de histones desacetilases de tipus 1 (HDAC1). En conseqüència es produirà un remodelament de la cromatina que promourà, per una banda, la supressió de l'expressió gènica del virus i, per altra banda, l'establiment de la latència[27].

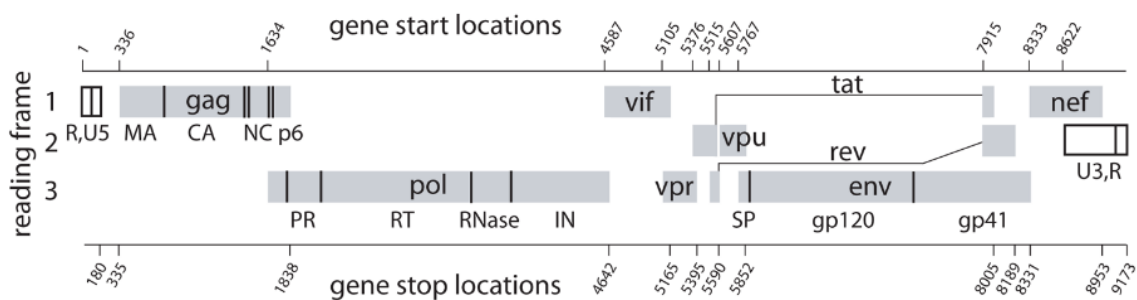


Figura 2. Esquema de l'organització del genoma del virus del VIH-1. Les regions codificants per proteïnes es mostren com a requadres grisos i els dominis d'unió a poliproteïna es representen com a línies verticals. Imatge extreta de Watts et al., 2009 [28].

A nivell genòmic, la principal diferència entre el VIH-1 i el VIH-2 és l'absència de vpu i la presència de vpr en el VIH-2[29].

2.2 Cicle replicatiu del VIH-1

El cicle replicatiu del virus de la immunodeficiència humana es divideix en dues fases: una fase primerenca, que comprèn des de l'entrada del virus a la cèl·lula fins a l'etapa d'integració del provirus al genoma de la cèl·lula hoste, i una fase tardana, que comprèn des de la transcripció dels gens virals fins a la formació dels nous virions. En les dues fases hi intervenen elements tant del virus com de la cèl·lula hoste[22]. A continuació es descriuen cada un dels passos implicats en aquest procés (Fig.3).

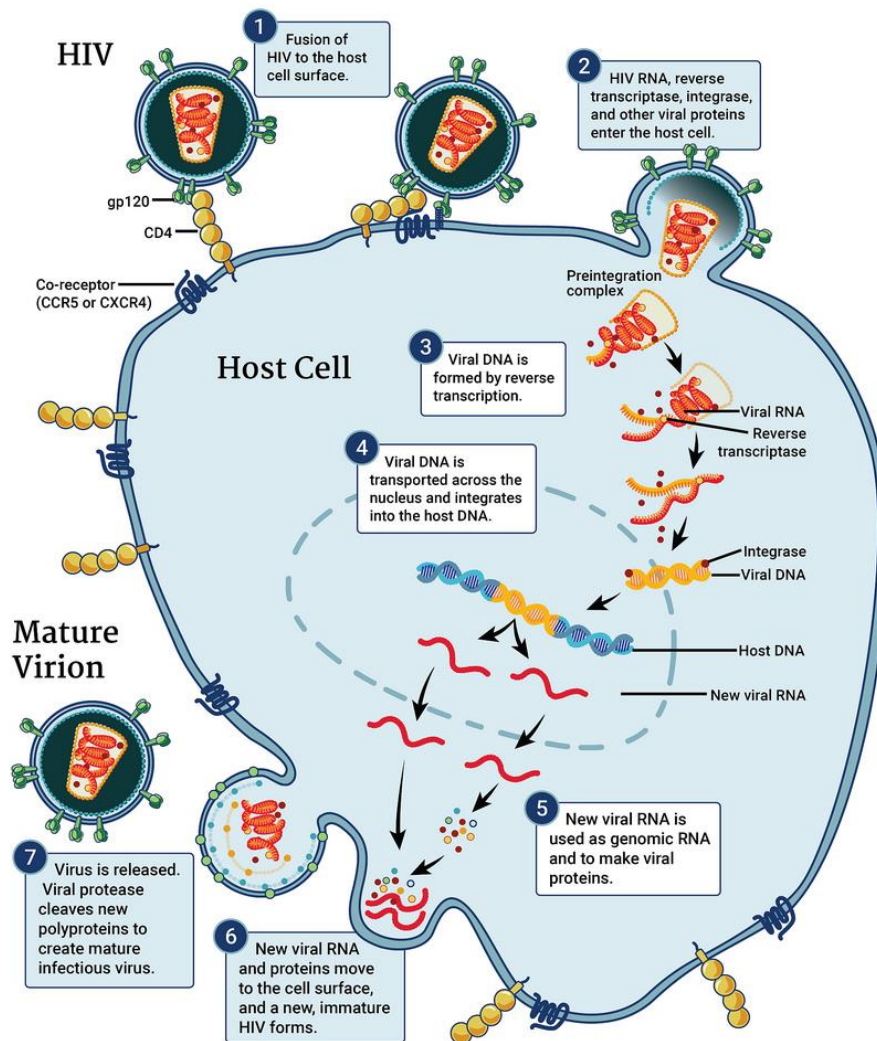


Figura 3. Resum esquemàtic del cicle replicatiu del VIH-1. La infecció s'inicia amb la interacció entre el virus i la molècula CD4 i un coreceptor cel·lular (CCR5 o CXCR4) i la posterior fusió de la membrana viral amb la del hoste (pas 1), permetent l'entrada del virus i de totes les proteïnes virals a la cèl·lula (pas 2). A continuació, té lloc la formació de ADN proviral per acció de la transcriptasa reversa (pas 3) i la integració d'aquest en el genoma de la cèl·lula hoste (pas 4). La maquinària transcripcional cel·lular genera noves molècules de ARN (pas 5) que s'encapsularan juntament amb les noves partícules virals formant un nou virió immadur (pas 6). Finalment, el virus serà alliberat i la proteasa viral promourà la generació de noves poliproteïnes virals, constituint així un nou virió amb capacitat infectiva (pas 7).

Imatge extreta de <https://www.niaid.nih.gov/diseases-conditions/hiv-replication-cycle>

1. **Entrada.** La infecció comença amb la interacció del virió madur, a través del domini extracel·lular de la proteïna viral gp120, i els receptors de superfície de la cèl·lula hoste. La molècula de superfície CD4, expressada majoritàriament en limfòcits T en circulació però que també es pot trobar en macròfags, és el receptor principal del VIH-1[30]. La interacció de la proteïna viral amb aquesta molècula permetrà la unió a la cèl·lula però no la infecció d'aquesta, doncs es requereix d'altres coreceptors per a que es produeixi la fusió de membranes. Aquests coreceptors poden ser CXCR4

i CCR5, cada un d'ells anirà associat a un tropisme diferent del virus, de manera que aquelles cèl·lules que presentin aquests dos receptors (CD4 i CCR5 o CXCR4) seran diana del VIH-1[31]. Es considera tropisme R5 quan el virus interacciona amb el coreceptor CCR5 i tropisme X4 quan el coreceptor és el CXCR4, tot i que també s'han descrit certes soques que presenten un tropisme dual R5X4[32]. Així doncs, la interacció entre la proteïna gp120 amb la glicoproteïna CD4 i el coreceptor CCR5 o CXCR4, indueix la reestructuració de l'envolta viral, l'exposició del pèptid de fusió gp41 i la fusió de membranes cel·lular i viral, promovent l'alliberació de la càpsida viral a l'interior de la cèl·lula[33, 34].

2. **Desassemblatge i retrotranscripció.** Un cop la càpsida viral ha estat alliberada al citoplasma cel·lular s'inicia el desassemblatge d'aquesta i es dona pas al procés de retrotranscripció en el que el genoma viral de cadena simple d'ARN (o ssRNA, de l'anglès *single-stranded RNA*) és retrotranscrit a un genoma de doble cadena d'ADN (dsDNA, de l'anglès *double-stranded RNA*), per acció de la RT. En el cas del VIH, la RT és incapaç de corregir errors, de manera que s'incorporen una gran quantitat de mutacions al genoma viral. Això suposa pel virus una pèrdua d'eficiència biològica (algunes mutacions faran que el virus no tingui capacitat infectiva), però també proporcionarà una avantatge adaptativa, contribuint a la diversitat genètica trobada en poblacions infectades pel VIH-1[35-37].
3. **Integració.** Un cop sintetitzat, aquest ADN de doble cadena serà transportat al nucli com a part del complex de pre-integració (PIC, de l'anglès *pre-integration complex*) i serà inserit, com a provirus, al genoma de l'hoste a través de l'acció de la integrasa. La integració del genoma viral es pot produir a diferents localitzacions del genoma cel·lular, incloent regions on l'activitat transcripcional és bastant baixa i on el virus podria romandre en estat latent a l'interior de la cèl·lula hoste. Aquest punt es tractarà amb més profunditat en apartats posteriors. Val a dir que aquesta integració en el genoma no és del tot aleatòria, ja que s'ha vist que el virus tendeix a integrar-se en regions on l'activitat gènica és més elevada[38, 39]. De manera general, la retrotranscripció resulta en la generació d'un ADNc (ADN codificant) lineal que podrà inserir-se en el genoma de l'hoste, tot i que també s'han identificat altres formes d'ADN proviral circular no integrat en el nucli[40]. Aquestes formes circulars poden ser de dos tipus: 1-*long terminal repeat* (1-LTR), resultant de la recombinació homòloga entre les dues regions LTR d'una molècula d'ADN lineal; i 2-LTR, la estructura del qual consisteix en la lligació dels dos extrems de la molècula, sovint amb modificacions, tipus inserció o deleccions d'alguns nucleòtids, en la regió d'unió. Aquestes formes circulars també són conegudes sota el nom d'ADN episomal i, a diferència, per exemple, de les formes episomals del herpesvirus, no tenen capacitat replicativa autònoma tot i que poden actuar com a substrat en el procés d'integració viral[41, 42].

4. **Transcripció i traducció.** A continuació tindrà lloc la transcripció que dependrà de forma inherent de l'enzim ARN polimerasa II (ARNPII) de l'hoste. Cal destacar que a diferència d'altres virus, que depenen exclusivament de la maquinària del hoste, el VIH-1 requereix tant de factors cel·lulars com factors virals per a la síntesi de nous virions. La transcripció del genoma viral s'inicia en la regió del promotor U3 cap a la regió LTR, en aquest procés estaran implicades les proteïnes virals Tat i Rev[43]. La transcripció d'aquest ADN proviral promourà la formació de transcrits d'ARNm (ARN missatger) de diferents longituds i *splicings*. Els ARNm més petits seran transportats directament al citoplasma on seran traduïts donant lloc a les proteïnes virals Tat i Rev, mentre que les formes *unspliced* i *single spliced* requeriran de l'acció de Rev per tal de ser transportades al citoplasma. El complex de la ARNPII reclutarà el *positive transcription factor b* (de l'anglès, P-TEF-b) per tal de que es produeixi l'elongació i la generació del transcrit viral complet[44]. Un cop obtingut l'ARN complet, es durà a terme, aleshores, la traducció seqüencial dels gens env, gag i pol amb la conseqüent síntesi de proteïnes, en forma de precursors. Les proteïnes env migraran a la membrana plasmàtica, mentre que els productes de gag i pol es desplaçaran fins a la membrana cel·lular.
5. **Assemblatge i alliberament de noves partícules víriques.** El precursor immadur de env serà processat per acció de la proteasa cel·lular furina en dues subunitats, gp41 i gp120; mentre que el precursor de gag promourà la formació d'una càpsida immadura que encapsularà les dues noves molècules d'ARN generades i els enzims virals RT, IN i PR. Aquest virió immadur serà alliberat de la membrana plasmàtica i serà durant el procés de *budding* o gemmació que el virió incorporarà les proteïnes cel·lulars de la membrana plasmàtica a la seva pròpia[45, 46]. Per a que es produeixi l'assemblatge i gemmació és imprescindible que es doni una disminució dels nivells de CD4 a la superfície cel·lular, per tal d'evitar que els nous virions reïnfectin a la mateixa cèl·lula per reconeixement de gp120. Així doncs, la proteïna accessòria Nef actua regulant negativament els nivells de CD4, doncs accelera la seva endocitosi i posterior degradació[47].
6. **Maduració.** La partícula viral, alliberada per la cèl·lula infectada, requereix d'un pas de maduració per tal d'esdevenir un nou virus infecciós. Aquest procés serà dut a terme per la proteasa viral que escindeix les poliproteïnes Gag i Gag-Pol en deu llocs diferents, promovent l'alliberament de les proteïnes estructurals i enzims del virus madurs (MA, CA, NC, p6, PR, RT i IN) i facilitant la conformació de la càpsida en la seva forma cònica i madura[46, 48]. Un cop finalitzada la fase de maduració, els nous virions generats seran capaços d'infectar noves cèl·lules diana.

3. PATOGÈNESI DE LA INFECCIÓ PER VIH-1

L'evolució de la infecció per VIH-1 es caracteritza per l'existència de 3 fases successives: l'estadi de primoinfecció, la fase crònica i la síndrome de la immunodeficiència adquirida (SIDA) (Fig. 4). A trets generals, la infecció per VIH-1 cursa, durant la fase aguda de la infecció, amb una depleció inicial de la població de limfòcits T CD4⁺ (<200 cells/mm³) combinada amb la detecció de virèmies molt elevades. Aquesta fase vindrà seguida d'una recuperació parcial del nombre de limfòcits T CD4⁺ i de la disminució de la virèmia per acció del sistema immunitari del hoste. Finalment, després d'un llarg període de latència clínica, que pot arribar a durar dècades i en el que es produirà un descens sostingut del nombre de limfòcits T CD4⁺, tindrà lloc el que es coneix com a fase SIDA. Aquesta es caracteritza per la caiguda novament del recompte de limfòcits T CD4⁺ que farà que la resposta immune quedi alterada i, en conseqüència, l'individu sigui més susceptible a patir infeccions oportunistes que el puguin arribar a conduir a la mort.

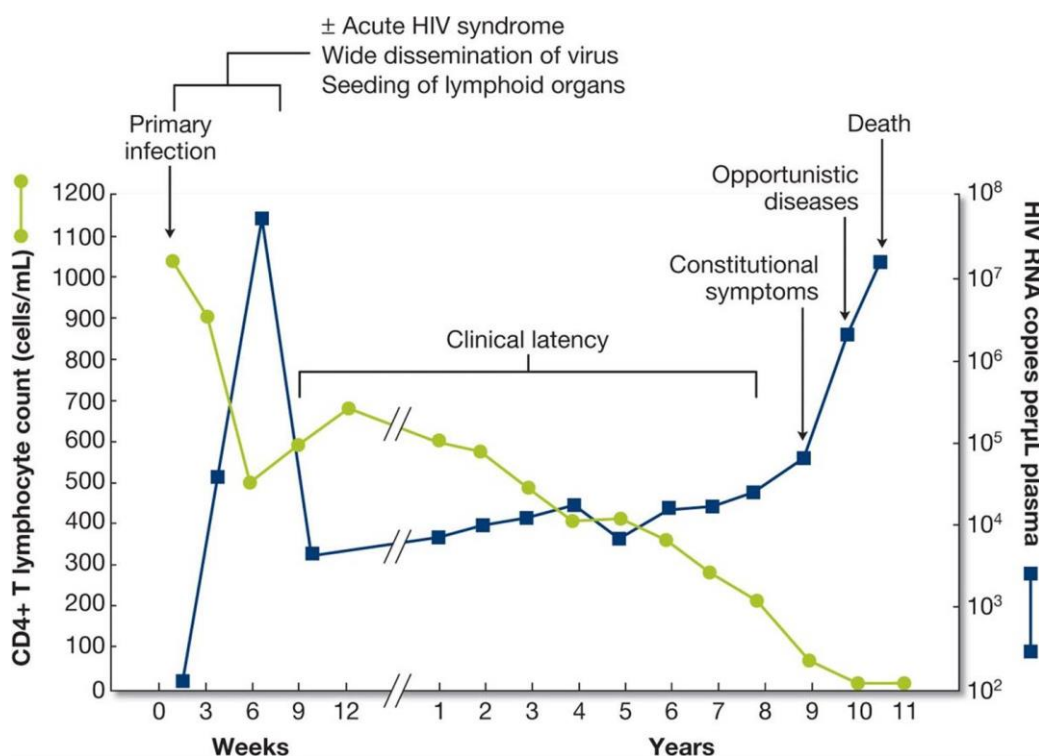


Figura 4. Evolució de la infecció pel VIH en individus infectats i sense tractament. La fase d'infecció primària es caracteritza per un augment de la càrrega viral plasmàtica i una disminució gradual del nombre de cèl·lules T CD4⁺ a la sang perifèrica. Es produeix una resposta immune al VIH acompanyada d'una disminució de la virèmia detectable seguida d'un llarg període de latència clínica. La fase d'infecció crònica es caracteritza per una reducció lineal en nombre de cèl·lules T CD4⁺. La fase sida comença quan els nivells de limfòcits CD4⁺ T disminueixen a nivells per sota de 200 cèl·lules/μL, i es produeix una evolució accelerada de la malaltia, que comporta un ràpid augment de la càrrega viral i un fort descens del nombre de cèl·lules T CD4⁺. L'esgotament del sistema immunitari, en aquesta etapa, comporta una major susceptibilitat a infeccions oportunistes que conduirà finalment a la mort als individus infectats. Imatge actualitzada de Pantaleo et al., 1993[49].

3.1 Primoinfecció o fase aguda

En el moment de la transmissió, el virus infecta en primera instància aquelles cèl·lules T que es troben a la mucosa on pot replicar localment. Les cèl·lules dendrítiques (DCs, de l'anglès *dendritic cells*) que es troben també a les mucoses, juguen un paper essencial en aquestes primeres etapes de la infecció [50], doncs no només són susceptibles a ser infectades pel virus sinó, que a més, són capaces de capturar-lo en la seva superfície a través de lectines o altres molècules d'unió[51]. D'aquesta manera, el virus aprofita la capacitat de les cèl·lules dendrítiques de migrar als òrgans limfoides secundaris per arribar a zones riques de limfòcits T CD4⁺, la seva diana principal. Un cop el virus ha replicat extensament en el teixit limfàtic, especialment en els limfonodes locals, aquest es podrà disseminar cap a altres òrgans limfoides secundaris, principalment el teixit limfoide associat a l'intestí (GALT, de l'anglès *Gut-associated Lymphoid Tissue*). La destrucció de limfòcits T CD4⁺ a nivell de GALT promou la pèrdua de la funció barrera, el que facilitarà la presència anormalment elevada de productes bacterians com els lipopolisacàrids (LPS) als ganglis mesentèrics, procés que rep el nom de translocació bacteriana i, a la vegada, induirà una inflamació crònica en els individus infectats[52, 53].

Després del contacte amb el VIH s'inicia un període finestra que dura uns 10-21 dies, durant els quals encara no es detecten anticossos específics front al virus tot i que els nivells de virèmia són molt elevats (10^5 - 10^9 copies/ml)[54]. La detecció de resposta antiviral en absència d'anticossos, suggereix que la resposta cel·lular és més precoç i important en el control inicial de la infecció. Tot i això, aquesta resposta serà insuficient per erradicar el virus, encara que podrà contenir-lo, i s'establirà una infecció crònica persistent. Durant aquesta fase, molts dels pacients presenten símptomes similars als de la grip, com febre, mal de cap i erupció cutània[55] (Fig. 5).

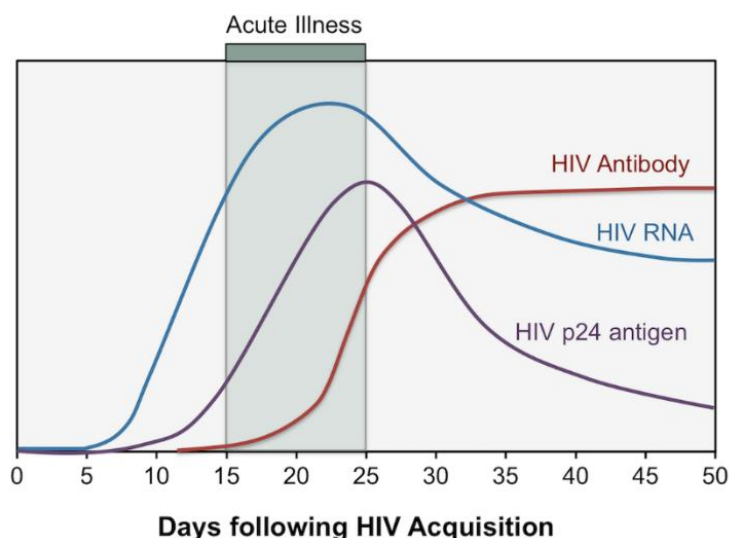


Figura 5. Fase aguda de la infecció per VIH. Es defineix com la fase que té lloc just després de l'adquisició del VIH i es caracteritza per la presència de nivells detectable d'ARN viral o antigen p24, en absència d'anticossos anti-VIH. Imatge extreta de <https://www.hiv.uw.edu/go/screening-diagnosis/acute-recent-early-hiv/core-concept/all>

3.2 Fase crònica

En aquesta fase, anomenada també de latència clínica o asimptomàtica, els nivells de cèl·lules T CD4⁺ circulants s'estabilitzen a nivells gairebé normals i la càrrega viral es redueix dràsticament gràcies a intenses respostes immunitàries, tant humorals com cel·lulars, que inclouen la producció d'anticossos i la resposta per part del limfòcits T CD8⁺ citotòxics[56, 57]. Durant aquest període, el pacient no acostuma a presentar els símptomes principals de la malaltia, tot i que el virus està infectant contínuament noves cèl·lules i la replicació es manté activa. Normalment aquest període de latència, si l'individu no es tractat, sol tenir una durada de 7 a 10 anys, tot i que la progressió de la malaltia presenta una gran variabilitat entre individus.

En aquest fase, el VIH-1 establirà una baixa però persistent replicació viral que comportarà un estat d'activació immunitària i inflamació sistèmica crònica. La perpetuació en el temps d'aquestes respostes immunològiques faran que els sistema immunitari quedi desgastat i conduirà a una incapacitat progressiva de contenir la replicació viral que vindrà acompanyada per una disminució del recompte de cèl·lules T CD4⁺. Aquest fet marcarà el final de la fase de latència.

3.3 Estadis avançats o fase SIDA

Després d'aquest període asimptomàtic, i en absència de tractament, la càrrega viral s'eleva ràpidament amb una caiguda simultània en el recompte de cèl·lules T CD4⁺. Aquesta última etapa es coneix com a síndrome de la immunodeficiència adquirida o SIDA, i es caracteritza per situacions en que el recompte de cèl·lules T CD4⁺ està per sota de 200 cèl·lules/mm³ i per l'aparició de certes infeccions oportunistes que poden conduir a la mort de l'individu[58]. Així doncs, en aquesta etapa s'observa el deteriorament de la resposta humoral i cel·lular front al VIH, que conduirà a una situació de fracàs immunològic.

3.4 Patogènesi en presència de la teràpia antiretroviral

L'aparició del primer compost antiretroviral, el zidovudine o AZT, va comportar un canvi de paradigma pel que fa a la infecció del VIH-1, passant de ser una malaltia mortal a un tipus de malaltia tractable i de caire crònic compatible amb una elevada taxa de supervivència[59]. La infecció per VIH-1 en absència de tractament presenta una mortalitat associada per sobre del 95%.

Actualment, existeixen més de 30 fàrmacs antiretrovirals aprovats pels organismes reguladors corresponents per al tractament de la infecció pel VIH (Taula 1). Aquests compostos han permès reduir notòriament la mortalitat associada a aquesta infecció gràcies a la seva capacitat de evitar la replicació del virus i, en conseqüència, de reduir la càrrega viral plasmàtica per sota del límit de detecció de les tècniques convencionals (<50 còpies/ml). La implementació del tractament antiretroviral ha suposat una millora en la durada i qualitat de vida dels pacients infectats per VIH-1[60], tot i això el tractament presenta certes desavantatges que inclouen efectes secundaris i toxicitats, sobretot a nivell hepàtic, renal, cardiovascular i ossi[61].

'85- '89	1987 Zidovudine (NRTI)				
'90- '94	1991 Didanosine (NRTI)	1992 Zalcitabine (NRTI)	1994 Stavudine (NRTI)		
'95- '99	1995 Lamivudine (NRTI) Saquinavir (PI)	1996 Indinavir (PI) Nevirapine (NNRTI) Ritonavir (PI)	1997 Combivir (FDC) Delavirdine (NNRTI) Nelfinavir (PI)	1998 Abacavir (NRTI) Efavirenz (NNRTI)	1999 Amprenavir (PI)
'00- '04	2000 Didanosine EC (NRTI) Kaletra (FDC) Trizivir (FDC)	2001 Tenofovir DF (NRTI)	2003 Atazanavir (PI) Emtricitabine (NRTI) Enfuvirtide (FI) Fosamprenavir (PI)	2004 Epzicom (FDC) Truvada (FDC)	
'05- '09	2005 Tiplranavir (PI)	2006 Atripla (FDC) Darunavir (PI)	2007 Maraviroc (CA) Raltegravir (INSTI)	2008 Etravirine (NNRTI)	
'10- '14	2011 Complera (FDC) Nevirapine XR (NNRTI) Rilpivirine (NNRTI)	2012 Stribild (FDC)	2013 Dolutegravir (INSTI)	2014 Cobicistat (PE) Elvitegravir (INSTI) Triumeq (FDC)	
'15- '19	2015 Evoz (FDC) Genvoya (FDC) Prezcobix (FDC)	2016 Descovy (FDC) Odefsey (FDC)	2017 Juluca (FDC)	2018 Biktarvy (FDC) Cimduo (FDC) Delstrigo (FDC) Doravirine (NNRTI) Ibalizumab-uiyk (PAI) Symfi (FDC) Symfi Lo (FDC) Symtuza (FDC) Temixys (FDC)	2019 Dovato (FDC)
'20	2020 Fostemsavir (AI)				

Taula 1: Línia temporal dels fàrmacs aprovats per la FDA per al tractament del VIH. AI: attachment inhibitor; CA: CCR5 antagonist; FDC: Fixed-dose combination; FI: fusion inhibitor; INSTI: integrase inhibitor; NNRTI: non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor; NRTI: nucleoside reverse transcriptase inhibitor; PE: pharmacokinetics inhibitor; PI: protease

inhibitor; PAI: post-attachment inhibitor. Imatge extreta de: <https://aidsinfo.nih.gov/understanding-hiv-aids/infographics/25/fda-approval-of-hiv-medicines>.

Depenent de quina sigui la seva diana molecular, els fàrmacs antiretrovirals actuals es poden classificar en 5 grans famílies[62] (Fig. 6):

1. Inhibidors de la transcriptasa inversa anàlegs de nucleòsids (ITIAN).
2. Inhibidors de la transcriptasa inversa no anàlegs de nucleòsids (ITINAN).
3. Inhibidors de la proteasa (IP).
4. Inhibidors de la integrasa.
5. Inhibidors d'entrada. Inclou els inhibidors de fusió, els antagonistes de CCR5, els *attachment inhibitor* (AI) i els *post-attachment inhibitors* (PAI).

Recentment s'ha descrit una nova família d'antiretrovirals anomenats inhibidors de la càpsida. Fàrmacs d'aquesta família estan actualment en assajos clínics i els primers resultats han estat presentats en la *Conference of Retroviruses and Opportunistic Infections* d'enguany.

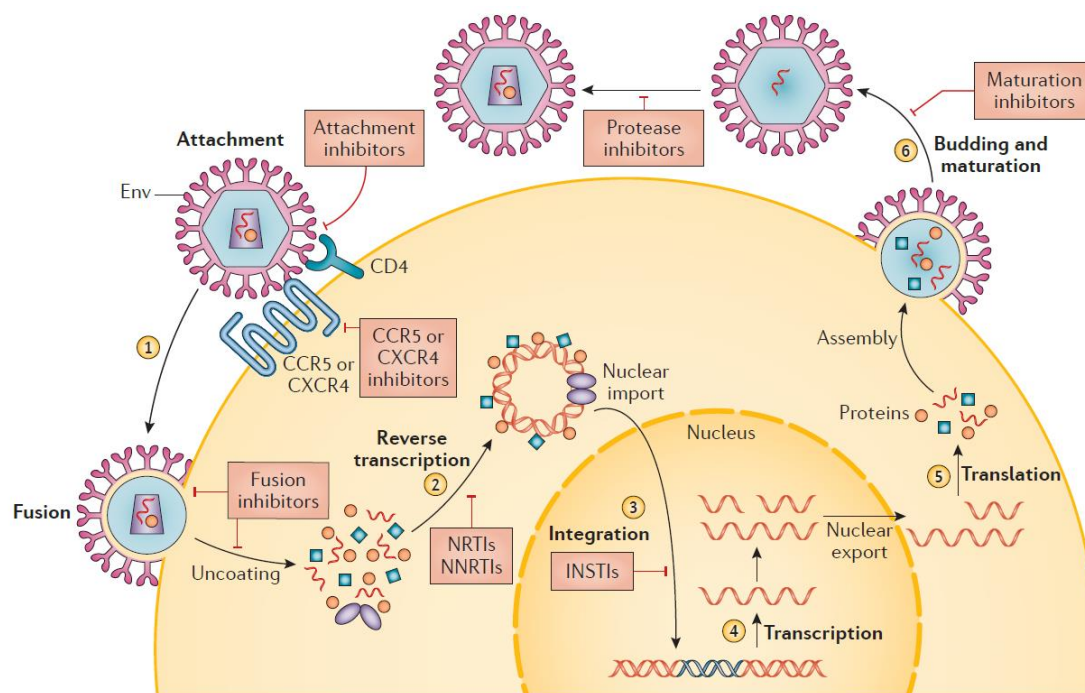


Figura 6: Dianes dels diferents compostos antiretrovirals. El VIH entra a les cèl·lules diana mitjançant el CD4 i el coreceptor CCR5 o CXCR4 mitjançant la interacció amb la glicoproteïna (Env) (pas 1). Després de la fusió i el desassamblatge, l'ARN viral es transcriu inversament en ADN (pas 2). El complex de preintegració s'importa al nucli i l'ADN viral s'integra al genoma de l'hoste (pas 3). Mitjançant enzims de l'hoste, l'ADN del VIH es transcriu a ARNm virals (pas 4). Aquests ARNm són després exportats al citoplasma on es produeix la traducció (pas 5) per fer proteïnes víriques i eventualment virions madurs (pas 6). Cada pas –entrada del VIH, transcripció inversa, integració i maduració de proteïnes– en el cicle de vida del VIH és un objectiu potencial de fàrmacs antiretrovirals. INSTI, inhibidor de la integració; NNRTI, inhibidor de la transcriptasa inversa no anàlegs de nucleòsids; NRTI, inhibidor de la transcriptasa inversa anàlegs nucleòsids. Imatge extreta de Deeks et al., 2015[62].

Degut a la capacitat de la retrotranscriptasa d'induir mutacions en el genoma viral, la monoteràpia sovint s'associa a l'aparició de resistències[63]. És per aquest motiu que aviat es va recomanar la combinació amb 3 fàrmacs antiretrovirals com a tractament d'elecció. L'ús de una combinació d'agents antiretrovirals fa que la replicació estigui fortament reprimida i que la probabilitat de que apareguin mutacions resistents als tres tipus de fàrmacs simultàniament és molt baixa. Actualment, el tractament clàssic consisteix en combinar dos ITIAN i un fàrmac antiretroviral d'una altra família per tal de crear una combinació efectiva que actuï a diferents etapes del cicle viral.

Tot i que la teràpia antiretroviral pot disminuir la càrrega viral plasmàtica fins a nivells indetectables (<50 còpies/ml), no elimina completament el virus del cos[64-67]. És per aquest motiu que qualsevol interrupció del tractament, ja sigui voluntària o per aparició de resistències, resulta gairebé sistemàticament en un rebot de la càrrega viral en plasma (Fig. 7). Aquest fet fa que els pacients hagin de prendre tractament de per vida. Actualment se sap que aquesta persistència viral és deguda a la existència de reservoris cel·lulars i anatòmics en els que el virus pot romandre durant llargs períodes de temps, sent invisible al sistema immunitari i inalterat pel tractament[68].

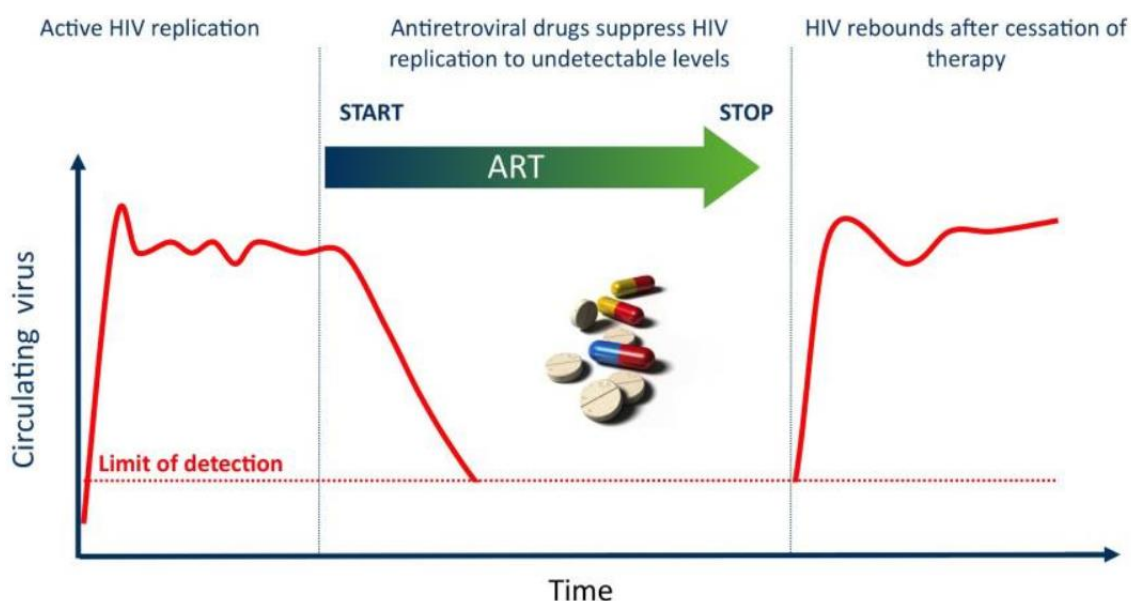


Figura 7. Evolució de la càrrega viral en plasma abans, durant i després de la interrupció de teràpia antiretroviral. La teràpia antiretroviral redueix la càrrega viral en plasma a nivells indetectables, però no elimina completament el virus de l'organisme. En conseqüència, la interrupció del tractament té com a resultat un rebot de la càrrega viral en plasma. Imatge extreta de Kulpa and Chomont, 2015[69].

4 LATÈNCIA, RESERVORIS I PERSISTÈNCIA VIRAL

Es coneix com a reservori tot el conjunt de cèl·lules o llocs anatòmics on una forma competent de replicació del virus pot persistir durant llargs períodes de temps. Aquestes cèl·lules que actuen com a reservori poden resistir més temps a l'organisme que no pas aquelles cèl·lules on la replicació és activa, i són les responsables del rebot viral si s'interromp la teràpia antiretroviral. Els reservoris són la causa principal per la qual encara no existeix una cura per la infecció del VIH-1, doncs tot i que la teràpia antiretroviral és molt efectiva a l'hora de suprimir la virèmia en sang fins a límits indetectables, no té cap efecte, o aquest és mínim, sobre aquests reservoris.

Actualment, s'han descrit dos tipus de reservori:

- Latent: es coneix com a reservori latent aquell en que el virus es troba integrat en el genoma de la cèl·lula hoste, en estat absolut de repòs, sense expressar transcrits virals ni proteïnes, però que conserva la capacitat de produir partícules virals infeccioses en resposta a l'estimulació[67, 70, 71].
- Transcripcionalment actiu: es coneix com a reservori transcripcionalment actiu aquell en el que el virus està transcrivint el seu material genètic, produint proteïnes o, fins i tot, virions encara que ho faci en molt baixa freqüència[72-76].

4.1 Reservoris cel·lulars del VIH-1

El principal reservori del virus i també el més estudiat són la seva principal diana, els limfòcits T CD4⁺. En els individus amb teràpia antiretroviral, el VIH-1 persisteix principalment en les cèl·lules T CD4⁺ memòria en repòs[77]. Aquestes cèl·lules són el reservori d'elecció del virus ja que poden sobreviure durant períodes de temps molt llargs degut a la llarga vida d'aquestes cèl·lules.

Cèl·lules T CD4⁺ de memòria

Aquesta població cel·lular es va identificar com a reservori viral l'any 1995 gràcies a la detecció d'ADN viral integrat per PCR (de l'anglès, *polymerase chain reaction*)[78]. Dos anys més tard, al 1997, el desenvolupament d'una nova tècnica anomenada QVOA (de l'anglès, *Quantitative Viral Outgrowth Assay*) va permetre mesurar la mida dels reservoris virals competents per a la replicació que es trobaven en sang perifèrica d'individus en teràpia antiretroviral[79]. Aquests reservoris competents estan conformats per cèl·lules infectades capaces de generar nous virions infecciosos, i s'estima que la freqüència d'aquest reservori està al voltant d'1 cèl·lula per milió de limfòcits CD4⁺ T en repòs[79, 80]. Cal tenir en compte que les cèl·lules T CD4⁺ en repòs són relativament menys permissives a la infecció pel VIH-1, en comparació amb les cèl·lules activades, ja que, per una banda, presenten nivells molt baixos del coreceptor

CCR5 i, per altra banda, presenten una cinètica més baixa de la transcriptasa inversa i d'importació nuclear[81]. També s'ha vist que les cèl·lules T CD4⁺ en repòs expressen grans quantitats del factor de restricció SAMHD1, que inhibeix indirectament la transcripció inversa per depleció de dNTPs (de l'anglès, *deoxyribonucleotide triphosphate*) intracel·lulars [82]. Per això, s'han proposat diversos models per explicar la persistència del virus en aquestes cèl·lules. Un dels models suggereix que una fracció de les cèl·lules T CD4⁺ activades que s'han infectat productivament sobreviu el temps suficient per convertir-se en cèl·lules T de memòria en repòs. Un segon model proposa que la infecció es produeix quan la cèl·lula T activada ja està en procés de transició a l'etapa de cèl·lula de memòria en repòs[83]. Tot i això, alguns estudis indiquen que les cèl·lules en repòs poden ser directament infectades sense haver de ser activades prèviament[84]. De fet, algunes senyals activadores febles com citocines (per exemple, IL-2, IL-4, IL-7 i IL-15) i quimiocines (per exemple, els lligands de CCR7: CCL19 i CCL21) poden fer que les cèl·lules siguin més susceptibles a la infecció sense induir canvis perceptibles en el fenotip d'activació [85, 86].

El pool de cèl·lules que conformen la població de cèl·lules T CD4⁺ és molt divers i engloba diverses subpoblacions que es caracteritzen pels seu estat de diferenciació cel·lular o la seva funcionalitat i que presenten diferents susceptibilitats a la infecció: cèl·lules naïve (T_{NA}), *stem cells like memory* (T_{SCM}), *central memory* (T_{CM}), *effector memory* (T_{EM}), *transitional memory* (T_{TM}) i *terminally differentiated cells* (T_{TD})[69]. De les diferents subpoblacions existents, les que tenen major implicació en el reservori viral són aquelles amb un fenotip de memòria: *stem cells like memory* (T_{SCM}), *central memory* (T_{CM}), *effector memory* (T_{EM}), *transitional memory* (T_{TM}) (Fig. 8).

Les T_{SCM} constitueixen una població minoritària de cèl·lules T de memòria (2-3% dels limfòcits circulants), i presenten certes característiques de les cèl·lules mare (auto-renovació, supervivència a llarg termini, etc.) i una gran capacitat de proliferació en resposta a l'estimulació antigènica[87]. A més, s'ha demostrat que aquesta població cel·lular està molt enriquida en ADN del VIH-1 en individus en teràpia antiretroviral[88, 89]. Totes aquestes característiques mencionades juntament amb l'estabilitat extrema d'aquesta població cel·lular afavoreix la persistència a llarg termini del VIH. Les T_{CM} , T_{TM} i T_{EM} presenten diferències en termes de supervivència, proliferació i migració, però també en termes del seu perfil transcripcional i de citocines[90]. Les cèl·lules T_{CM} , gràcies a l'expressió de CCR7 i CD62L tenen la capacitat de migrar als òrgans limfoides secundaris. A més, aquestes les cèl·lules presenten limitades funcions efectores, però tenen una alta capacitat de proliferació en resposta a una segona estimulació antigènica[91]. Aquestes T_{CM} podran diferenciar-se a T_{EM} en resposta a certs estímuls homeostàtics. Les cèl·lules T_{EM} poden migrar cap a teixits perifèrics com a resposta a estímuls antigènics per tal de donar una resposta immunitària a través de la producció

de citocines. Aquestes cèl·lules però, tenen una capacitat proliferativa més alta que les T_{CM} [90, 91]. Les cèl·lules T_{TM} tenen un fenotip intermedi entre les T_{CM} i T_{EM} en termes de diferenciació cel·lular però també en la seva capacitat de proliferar, per exemple, en resposta a la IL-15 *in vivo* [92-94]. Així doncs, totes tres subpoblacions amb fenotip de memòria actuen com a grans reservoris de virus competents el que fa que tinguin un paper molt important en la persistència viral[90, 94].

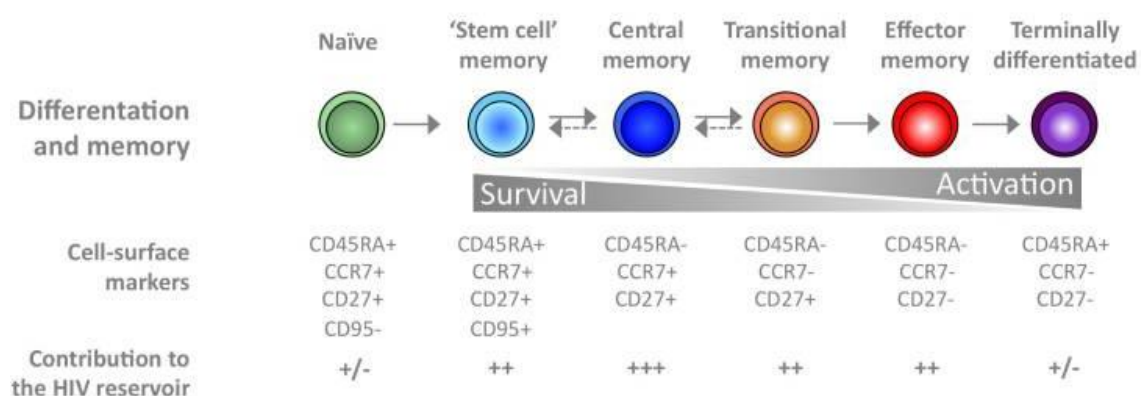


Figura 8. Contribució de les diferents subpoblacions de cèl·lules T CD4+ al reservori viral en presència d'ART. Les cèl·lules T CD4+ es classifiquen segons el seu estat de diferenciació i fenotip de memòria. Es mostren els marcadors de superfície usats per a la identificació de cada població i la contribució de cada una al reservori viral. Figura extreta de Kulpa&Chomont, 2015[69].

Una classificació alternativa de les cèl·lules T CD4⁺ que no té en compte l'estat de diferenciació cel·lular sinó que es basa en la funcionalitat i receptors de *homing* que presenta cada subpoblació, permet distingir els següents subtipus cel·lulars: cèl·lules T auxiliars o T_H (T_H , de l'anglès, *T helper cells*), cèl·lules T reguladores o T_{reg} , i les cèl·lules T fol·liculars o T_{FH} (T_{FH} , de l'anglès *T follicular helper cells*)[69] (Fig. 9). Cadascuna d'aquestes subpoblacions de cèl·lules T secreten citocines específiques que poden tenir funcions pro o antiinflamatòries. Pel que fa a la població T_H , podem distingir diferents subtipus: Th1, Th2, Th9, Th17, Th1Th17 i Th22. S'ha vist que les Th1, tot i tenir nivells baixos d'ADN viral, presenten un elevat percentatge de genomes intactes[95]. Les Th17 són un petita subpoblació de cèl·lules de llarga vida en les que s'ha trobat alts nivells d'ADN viral en pacients que es troben en tractament. Aquestes cèl·lules presenten certes propietats d'autorenovació i supervivència que fan que juguin un paper important en la persistència viral[96, 97], de la mateixa manera que també ho fan les T_{reg} [98]. Pel que fa a les T_{FH} , alguns estudis han demostrat la seva implicació en el manteniment del reservori viral tant en pacients virèmics com en pacients avirèmics en tractament, doncs s'ha vist que tant les que es troben en ciruclació com als centres germinals dels ganglis alberguen genomes virals[99-101].

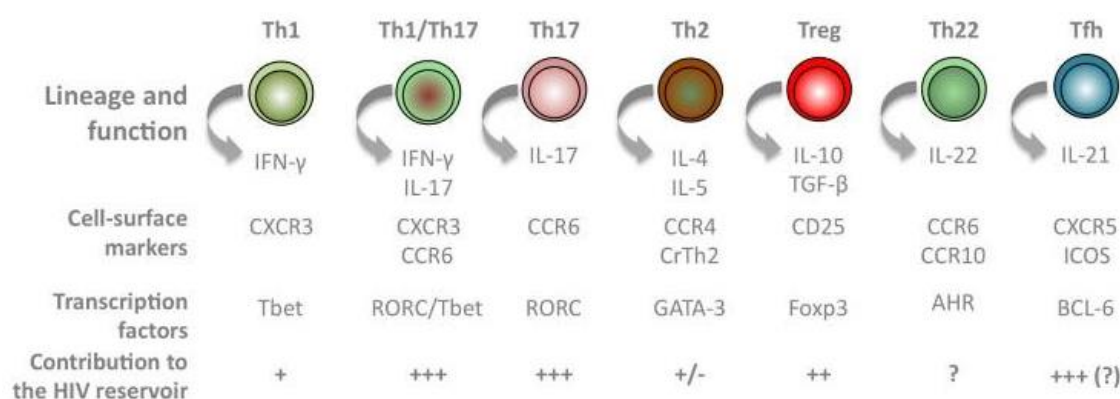


Figura 9. Contribució de les diferents subpoblacions de cèl·lules T CD4+ al reservori viral en presència d'ART. Les cèl·lules T CD4+ es classifiquen la seva funció efectora. Es mostren els marcadors de superfície usats per a la identificació de cada població, els factors de transcripció i citocines alliberades per cada subset i la contribució de cada d'ells al reservori viral. Figura extreta de Kulpa&Chomont, 2015[69].

Diversos estudis han estimat que els reservoris establerts en cèl·lules T memòria en repòs tenen una vida mitjana de 44 mesos, el que significa que per eliminar el virus en un pacient sota teràpia antiretroviral es necessitarien més de 70 anys[102-104].

Altres subtipus cel·lulars

Cal destacar que també s'han descrit altres subpoblacions que tenen un paper important en la latència i persistència del VIH-1[105]. Entre aquests tipus cel·lulars trobaríem els macròfags[106], les cèl·lules dendrítiques[107], les cèl·lules T $\gamma\delta$ [108] i les cèl·lules T residents de memòria o T_{RM}.

Recentment, s'han descrit les cèl·lules T residents de memòria (T_{RM}) en teixit cervical com un important reservori del VIH-1[109]. S'ha demostrat que aquestes cèl·lules s'infecten preferentment en models *ex vivo* i que alberguen una major quantitat d'ADN viral que no pas les cèl·lules amb fenotip no-T_{RM}. A més, al quantificar simultàniament el reservori viral en sang i en teixit cervical en pacients infectades per VIH-1, mitjançant PCR, es va veure que els nivells d'ADN en teixit eren més elevats que en sang (resultats similars als observats en altres estudis on analitzaven GALT o teixit limfoide). Finalment, també es va demostrar que les T_{RM} de teixit cervical contenen genomes intactes, el que posa de manifest la seva importància.

4.2 Reservoris anatòmics del VIH-1

Com ja s'ha comentat en l'apartat anterior, les cèl·lules T CD4+ de memòria en repòs són el principal reservori cel·lular del virus. Tot i que la sang perifèrica és el reservori anatòmic més ben descrit, els teixits i els òrgans són llocs preferents de persistència del VIH en les persones infectades i que estan prenent antiretrovirals[110]. Les cèl·lules T CD4+ que

circulen en sang representen menys del 2% totes les cèl·lules T CD4⁺ del cos[111], el que significa que la extensa majoria del virus resideix en els òrgans i teixits i posa de manifest la importància d'estudiar la persistència del VIH-1 en reservoris anatòmics. Entre els teixits que actuen com a reservori del VIH-1 es troben els òrgans limfoides primaris (timus i medul·la òssia) i secundaris (ganglis limfàtics, amígdales i melsa), el sistema gastrointestinal i el fetge, el sistema nerviós central, els pulmons, els ronyons, els sistemes reproductors masculins i femenins, i el teixit adipós[110, 112, 113].

El teixit limfoide és clau en l'establiment del reservori durant la infecció primària. Aquest teixit s'associa a la producció viral, a l'emmagatzematge de partícules virals en forma d'immunocomplexes i a la persistència viral. En els individus infectats pel VIH i que no estan en tractament, el teixit limfoide és el lloc de replicació viral principal[114-116]. S'ha demostrat que la freqüència de cèl·lules que contenen l'ADN viral en teixit limfoide és de 5 a 10 vegades més gran que en sang perifèrica[116]. A més, en els estadis inicials i intermedis de la malaltia, mentre que l'ARN viral és gairebé indetectable en sang perifèrica, es detecten alts nivells d'ARN viral en els ganglis limfàtics d'aquests mateixos individus[115]. En els estadis més avançats de la malaltia, els nivells d'ARN viral en sang augmenten en comparació amb els estadis més inicials, però tot i això aquests nivells es mantenen molt per sota dels detectats als ganglis limfàtics[115]. *Ex vivo*, les cèl·lules T_{FH}, que es localitzen en aquests òrgans limfoides, són altament permissives al virus i són més susceptibles a la infecció que les cèl·lules T CD4⁺ extrafol·liculars[117].

Els ganglis limfàtics són també un lloc important de persistència viral en individus VIH⁺ que estan en tractament antiretroviral. De fet, diversos estudis demostren que les cèl·lules aïllades d'aquest compartiment anatòmic contenen virus competents[79, 99]. L'existència de cèl·lules que produeixen espontàniament ARN viral indica que hi ha una transcripció residual contínua en aquest compartiment que juga un paper important en la persistència viral[118, 119]. La penetració subòptima d'agents antiretrovirals dins d'aquest lloc anatòmic podria ser, en part, responsable d'aquesta transcripció espontània[120]. Diverses propietats expliquen per què els ganglis limfàtics són un santuari anatòmic perfecte per a la replicació i la persistència a llarg termini del VIH. Així doncs, aquest compartiment anatòmic presenta un microambient ideal per a la persistència del VIH-1 ja que, per una banda, les cèl·lules T CD8⁺ citotòxiques estan relativament excloses dels fol·licles B dels ganglis limfàtics[121, 122], promovent la persistència del VIH-1 en aquest lloc específic; i, per altra banda, alguns estudis també suggereixen que les cèl·lules dendrítiques fol·liculars poden retenir virions infecciosos a la seva superfície, fins i tot si el pacient està prenent teràpia antiretroviral, afavorint la reposició dels reservoris virals[123, 124].

Alguns estudis han demostrat la implicació dels sistema nerviós central (SNC) en el manteniment de VIH-1, doncs les cèl·lules que el conformen poden actuar com a reservori. Les cèl·lules microgials, una població especialitzada de macròfags que es troba en el SNC, expressa el receptor del CD4 i són la principal diana del virus en el cervell [112]. En mostres de cervell i líquid cefalorraquidi de pacients en teràpia, obtingudes *post-mortem*, s'ha detectat la presència d'ADN i d'ARN viral[125, 126]. Possiblement, la persistència de cèl·lules que expressen ARN al SNC és deguda a una concentració subòptima de fàrmacs antiretrovirals en aquesta regió anatòmica[127-129].

El teixit limfoide associat a l'intestí (GALT) conté una elevada concentració de cèl·lules T CD4⁺ [102] i, per tant, representa un diana ideal pel VIH-1. El GALT és un dels primers teixits a infectar-se després de l'exposició al patogen, el que promou una pèrdua ràpida i massiva de cèl·lules T en aquesta regió[38, 39]. Aquesta ràpida disminució de les cèl·lules immunitàries està associada amb danys a la barrera intestinal, afavorint la translocació microbiana i promovent una activació immunològica sistèmica i crònica que perdurarà, malgrat el tractament, a llarg termini[130, 131]. A més, la teràpia antiretroviral no permet restaurar la integritat estructural de la barrera intestinal o recuperar completament els nivells de cèl·lules T CD4⁺[132]. Diversos estudis han demostrat la persistència del VIH a l'intestí, en presència d'ART, doncs han detectat alts nivells d'ADN en els limfòcits intestinals[133] així com cèl·lules que produeixen ARN viral, indicant una transcripció residual espontània dins d'aquest compartiment[134, 135].

4.3 Mecanismes de persistència viral

Hi ha diversos motius que poden explicar la persistència del VIH-1 en pacients tractats, aquests inclouen els següents:

- Nivells residuals de replicació viral en compartiments anatòmics privilegiats que no poden ser suprimits del tot pels fàrmacs antiretrovirals.
- La persistència d'un petit grup de cèl·lules que contenen genomes integrats i que es troben en estat latent, que poden reactivar-se i infectar noves cèl·lules.
- Disfuncions immunològiques persistents que no aconsegueixen controlar la replicació residual ni la reactivació de cèl·lules latentment infectades.

Replicació viral residual durant el tractament antiretroviral

La TAR aconsegueix una supressió prolongada de la replicació viral; tanmateix, mitjançant l'ús de proves de PCR altament sensibles que són capaces de detectar molt baixes còpies d'ARN viral, s'ha demostrat que existeix virèmia plasmàtica residual, fins i tot, en pacients que han estat suprimits durant llargs períodes de temps[136-138].

Aquesta virèmia residual no té perquè produir virèmia infecciosa ja que podria originar-se a partir de la reactivació del virus en cèl·lules T CD4⁺ de memòria latentment infectades que es troben en fase d'estimulació antigènica. A més, s'ha demostrat que les cèl·lules T CD4⁺ activades que es troben en sang perifèrica alliberen espontàniament partícules víriques, fins i tot en absència d'estímuls[139]. La virèmia també podria provenir de cèl·lules T CD4⁺ infectades productivament localitzades en teixits limfoides que induïrien nivells baixos de replicació viral mitjançant la propagació del virus a través del contacte cèl·lula a cèl·lula en la sinapsi virològica[140]. No obstant, el tractament antiretroviral podria parar els nous cicles de infecció, de manera que la virèmia residual no es tradueixi en replicació residual. Però aquesta detecció de virèmia residual també podria explicar-se per la penetració subòptima dels agents antiretrovirals als teixits diana, després d'una mala adherència al tractament, o per la presència de interaccions o barreres farmacològiques que limitarien l'efecte dels agents antiretrovirals. S'ha demostrat que els fàrmacs antiretrovirals tenen diferent capacitat de penetració segons el lloc anatòmic i que els nivells de penetració varien entre individus[120, 128, 141]. D'altra banda, alguns llocs anatòmics presenten un microambient privilegiat per a la persistència a llarg termini i transcripció activa del VIH, com és el cas dels fol·licles B dels ganglis limfàtics[142]. En aquest escenari, si que es podrien donar situacions de replicació residual.

D'aquesta forma, diverses evidències han posat de manifest l'existència de replicació residual (*ongoing replication*) en pacients en tractament antiretroviral. En dos assajos clínics realitzats en pacients amb virèmia suprimida gràcies al tractament, es va introduir un inhibidor de la integrasa (Raltegravir) al tractament base i es va observar un augment de la detecció de les formes circulars 2-LTR[143, 144]. Aquest fet demostra que abans de la pre-intensificació de la teràpia estaven tenint lloc processos de generació de virions i infecció *de novo* tot i que els pacients no presentessin càrrega viral detectable. Així doncs per a que es produeixi un augment d'aquestes formes circulars i sabent que els virions i les formes lineals de ADNc són làbils, és necessari que es produeixi una infecció *de novo* per induir aquest augment de formes 2-LTR[41]. Una altre fet que demostra l'existència de replicació residual es l'evolució genètica del virus en presència de ART. En un estudi en el que van seqüenciar la regió V3 del gen env de mostres de PBMCs de pacients que portaven molts anys en tractament van determinar una diversificació genètica dels virus amb tropisme CXCR4[145]. Un altre estudi en que es van analitzar mostres d'ADN de nòduls limfàtics i de sang simultàniament, en el moment d'iniciar la teràpia i al cap de 3 i 6 mesos, demostra una evolució genètica tot i la supressió viral en sang, posant de manifest la presència de replicació residual[146]. Malgrat això, estudis que demostrin la diversificació genètica en pacients suprimits durant llargs períodes de

temps son escassos, en part per la impossibilitat d'aconseguir la suficient quantitat de mostra perquè la seqüenciació no estigui no esbiaixada.

Manteniment de cèl·lules latentment infectades

La latència s'estableix molt d'hora en el moment de la infecció, ja que s'ha vist que l'inici de teràpia antiretroviral als 10 dies post-infecció no és suficient per evitar l'establiment d'aquests reservoris latents[147]. En alguns estudis realitzats en *rhesus macaques* s'ha vist que, tot i iniciar tractament als 3 dies post infecció, es detecta ADN viral tant en ganglis limfàtics com en GALT, posant de manifest el ràpid establiment dels reservoris virals[148]. Paral·lelament, s'ha vist que l'inici del tractament ens estadis molt inicials limita, tot i que no impedeix, l'establiment de reservoris virals[149].

La persistència del VIH en les subpoblacions de cèl·lules T de memòria CD4⁺ està garantida per la supervivència de les cèl·lules T i la proliferació homeostàtica. Aquesta proliferació de cèl·lules latentment infectades es pot induir de diverses maneres:

1. Estimulació de citoquines o senyals mitogènics[94, 150, 151]. La IL-7 promou la proliferació homeostàtica de cèl·lules T CD4⁺ latentment infectades sense interrompre la latència, i quan s'administra a individus amb la càrrega viral suprimida, indueix una modesta però significativa expansió del reservori[152, 153].
2. Estimulació antigènica[154, 155]. Per exemple en resposta a citomegalovirus (CMV), virus d'Epstein-Barr (EBV), virus del papil·loma humà (HPV), productes bacterians, entre d'altres. Les cèl·lules T CD4⁺ latentment infectades experimenten proliferació en resposta a l'estimulació antigènica, tal com suggereixen les anàlisis filogenètiques que mostren un gran nombre d'expansions de seqüències idèntiques en individus virològicament suprimits[156].
3. Integració del genoma viral en gens de creixement cel·lular o gens implicats en oncogènesi[157]. Diversos grups van seqüenciar els llocs d'integració del genoma viral en l'ADN de l'hoste i van trobar que els llocs d'integració específics del VIH estan vinculats a l'expansió clonal[158]. Aquests estudis també indiquen que la integració de l'ADN viral en oncogens contribueix a la infecció persistent[158-160]. Si bé la majoria d'aquests genomes virals integrats és probable que siguin incompetents per a la replicació del VIH[160-162], és possible que conservin la capacitat de generar ARN viral i potser proteïnes víriques que puguin contribuir a nivells anormalment elevats d'immunitat. A més, s'ha vist que, aproximadament, la meitat de les cèl·lules que contenen reservoris competents experimenten expansió clonal[151, 163, 164].

4.4 Tipus de latència i mecanismes moleculars implicats

La latència viral es defineix com un estat reversible i no productiu d'infecció en cèl·lules individuals[165]. Els reservoris són cèl·lules que contenen formes replicatives del VIH-1 després de llargs períodes de virèmia suprimida per la TAR[70, 166]. El VIH-1 pot establir una infecció latent en diversos tipus de cèl·lules que constitueixen els seus reservoris i permeten el seu manteniment en l'hoste indefinidament. Els principals reservoris de VIH-1 són els limfòcits T CD4⁺ en repòs, encara que també poden ser-ho els monòcits/macròfags, les cèl·lules dendrítiques, entre d'altres tipus cel·lulars.

Tipus de latència

La latència induïda pel VIH-1 en limfòcits T CD4⁺ en repòs pot classificar-se en dues categories segons si l'ADN proviral s'ha integrat o no en el genoma de l'hoste, distingint així entre latència pre-integració i latència post-integració[167-169].

- Latència pre-integració. La latència establerta abans del pas d'integració és una conseqüència de la fusió del VIH-1 amb un limfòcit en repòs que no està en procés de divisió i on el cicle replicatiu del virus està bloquejat. Així doncs, l'ADN viral romandrà de forma no integrada en el citoplasma cel·lular. Si la cèl·lula diana s'activa, aquestes formes no integrades d'ADN, podrien integrar-se aleshores en el genoma de l'hoste i promoure una infecció productiva. La vida mitja d'aquestes formes no integrades en cèl·lules T CD4⁺ és molt curta, aproximadament 1 dia[170], el que fa pensar que aquesta forma de latència no contribueix en gran mesura a la persistència viral observada després d'anys en tractament. Tot i això, s'ha vist que en altres tipus cel·lulars, com els macròfags, aquestes formes no integrades poden perdurar més en el temps[171].
- Latència post-integració. Aquest tipus de latència s'ha suggerit que resulta de la integració de l'ADN viral al genoma de l'hoste en una cèl·lula T CD4⁺ activada que passa a estat de repòs. D'aquesta manera, el virus no és capaç de replicar i generar nous virions en absència d'estímul activadors[172] i la cèl·lula infectada tampoc és reconeguda pel sistema immunitari o els fàrmacs antiretrovirals. En aquest estat latent, el virus és molt estable i presenta la mateixa vida mitja que la cèl·lula que ha infectat, tenint un paper important en la persistència del VIH-1.

Mecanismes moleculars implicats en la latència

Diversos mecanismes contribueixen a l'establiment i manteniment de la latència en aquestes cèl·lules, entre ells la interferència transcripcional, la baixa disponibilitat de factors de transcripció, la condensació de la cromatina i alguns microARN que bloquegen

la traducció viral. El coneixement d'aquests mecanismes és crucial per al desenvolupament de noves teràpies que puguin eliminar el virus del cos i arribar a una possible cura d'aquesta infecció.

- Llocs d'integració del genoma viral i interferència transcripcional: S'ha demostrat que l'ADN proviral del VIH-1 s'integra de forma preferencial en regions del genoma de l'hoste que són transcripcionalment actives. Aquesta integració vírica podria estar involucrada en interferències transcripcionals relacionades amb la latència del VIH[69, 173]. En estudis realitzats en cèl·lules T CD4⁺ en repòs d'individus suprimits virològicament es va fer un ampli anàlisi dels llocs d'integració viral, i es va veure que al voltant del 90% de provirus integrats es trobaven en gens transcrits activament i no presentaven cap preferència d'orientació respecte els gens de l'hoste[174-176]. En anàlisis més recents, en els que s'analiza específicament els provirus intactes, s'ha vist però que aquests tendeixen a integrar-se en orientació oposada al gen hoste i ho fan en regions més allunyades de promotors transcripcionals[177]. Aquest fet promou l'establiment de la latència doncs es produeix interferència transcripcional, un procés pel qual la transcripció que s'origina en un promotor pot interferir amb la transcripció d'un altre, induint així el silenciament de la transcripció del VIH-1[178, 179].
- Requeriment de factors de transcripció cel·lulars i proteïnes virals: El segrest de cofactors cel·lulars necessaris per a l'expressió del VIH en el citoplasma és un altre mecanisme important per a l'establiment i el manteniment de la latència. La regió promotora 5'LTR del virus és responsable del reclutament de certs factors cel·lulars necessaris per a l'inici de la transcripció. Quan la cèl·lula està activada, tots aquests factors estan disponibles ja que la cèl·lula els necessita per dur a terme la transcripció dels gens cel·lulars; en canvi, en estat de repòs, tots aquests factors cel·lulars es troben segrestats al citoplasma, inhibint així la transcripció. A part de factors cel·lulars, la transcripció viral es pot veure modificada per proteïnes virals tals com Tat, aquesta és necessària per a l'elongació dels transcrits virals i la seva inhibició pot induir latència[173, 180].
- Repressors de la transcripció cel·lular i factors de restricció: Els factors de transcripció com NF- κ B i el factor nuclear de les cèl·lules T activades (NFAT, de l'anglès *nuclear factor of activated T cells*) són crucials per iniciar la transcripció del VIH a nivell del promotor viral 5'-LTR. El segrest d'aquests factors per part de certs inhibidors, com I κ B α , farà que la transcripció quedi inhibida i es pugui induir latència. La presència de certs factors de restricció de l'hoste, com ara TRIM22[181], també podran induir latència per inhibició del cicle cel·lular.

- Mecanismes epigenètics (remodelació cromatina): L'ADN es troba empaquetat en els nucleosomes, que són les unitats estructurals que contenen l'ADN i les histones. La condensació de la cromatina és un element regulador de la transcripció, doncs permet l'accés de factors de transcripció quan es troba en la conformació d'eucromatina mentre que restringeix la transcripció en aquelles àrees més condensades, en forma de heterocromatina. La modulació de la condensació de la cromatina és un procés dinàmic que requereix de modificacions en les proteïnes associades a l'ADN, les histones. Les modificacions en les histones solen ser reversibles i inclouen acetilacions, metilacions, fosforilacions, sumoilacions, entre d'altres. En el cas del VIH, les modificacions més estudiades són les desacetilacions, dutes a terme per les histones desacetilases (HDAC, de l'anglès *histone desacetylases*) i metilacions d'histones, realitzades per les histona metiltransferases (HMT, de l'anglès *histone methyl transferases*). La desacetilació d'histones elimina diferents senyals d'acoblament molecular que són necessaris per la unió i activació de factors de transcripció i de les ARN polimerases, promovent la formació d'estructures de cromatina condensada. En conseqüència s'estableix un ambient repressor per a la transcripció d'ARN i la supressió de la expressió gènica, promovent un estat de latència[182-186].

En conclusió, l'establiment de latència del VIH és un procés complex en el que estan implicats múltiples processos i vies de senyalització. Per aquest motiu, la comprensió de l'establiment i el manteniment dels reservoris cel·lulars és fonamental per combatre el virus i trobar el camí per aconseguir l'erradicació del VIH-1.

4.5 Tècniques de quantificació del reservori

La implementació d'estratègies terapèutiques destinades a reduir la mida dels reservoris virals requereix del desenvolupament de proves fiables i precises per mesurar la capacitat d'aquestes estratègies per reduir els reservoris del VIH. Diverses metodologies i tècniques, amb diferent nivell de sensibilitat i especificitat, s'utilitzen actualment per mesurar la mida dels reservoris virals en individus que estan en tractament amb teràpia antiretroviral (Fig. 9 i taula 3).

En funció de quin sigui l'objectiu de mesura final trobem:

1. Assajos d'ADN viral
2. Assajos d'ARN viral
3. Assajos QVOA
4. Assajos de proteïna viral
5. Assajos basats en la detecció per citometria i microscòpia

Assajos d'ADN viral

L'ADN del VIH presenta diverses conformacions. La quantificació total de l'ADN viral inclou les formes circulars no integrades, les formes lineals no integrades i les formes lineals integrades. L'abundància de cada subtipus, en ordre descendent, és: formes lineals no integrades > formes integrades > formes circulars no integrades[187].

Per a la quantificació d'aquest ADN viral existeixen dos tipus de metodologies: la qPCR (de l'anglès, *quantitative real-time PCR*) i la ddPCR (de l'anglès, *droplet digital PCR*). La qPCR monitoritza l'amplificació a cada cicle a través de la detecció de sondes fluorescentes i la quantificació es realitza mitjançant l'ús d'una corba estàndard el que permet la detecció d'un ampli rang dinàmic. La ddPCR fa una mesura de fluorescència a punt final, després de totes les rondes d'amplificació. A través d'un sistema de microfluídica, la mix aquosa de PCR (que conté la mastermix, els primers, les sondes i l'ADN), s'emulsiona en un oli per tal de formar microgotetes. Això permetrà la generació d'un gran nombre de microgotetes que contindran una, més d'una o cap còpia d'ADN, en les que es durà a terme la reacció d'amplificació simultàniament[188, 189]. Un cop finalitzada la PCR, la mostra es carregarà en un lector de microgotetes de manera que cada gota serà analitzada individualment a través d'un lector òptic que detectarà una determinada amplitud de fluorescència per a cada microgota. En aquest cas, la lectura final serà el recompte de microgotetes que emeten fluorescència per cada mostra analitzada. Si es comparen les dues metodologies es pot observar que la ddPCR no requereix de corba estàndard doncs ja dona una quantificació absoluta, però en canvi presenta una rang dinàmica inferior a la qPCR el que pot suposar un risc major de falsos positius[190].

Pel que fa als tipus de conformacions d'ADN viral que es poden quantificar, es pot distingir entre els següents:

- **VIH-ADN total.** El VIH-ADN total és un marcador per estimar la freqüència de cèl·lules infectades per milió de cèl·lules mononuclears en sang perifèrica (PBMC) o en cèl·lules T CD4⁺. Inclou la mesura de formes d'ADN viral integrades i no integrades en cèl·lules infectades de manera latent i productiva[191]. Aquest fet té especial importància en els pacients virèmics en que hi ha un elevat nombre de formes no integrades que contribuiran a la detecció de l'ADN viral total i que poden suposar una variable confusora a l'hora d'interpretar els resultats[192, 193]. Per a la determinació es pot usar tant la qPCR com la ddPCR, en tots dos casos es dissenyaran els primers i les sondes perquè hibridin en les regions del genoma viral gag, pol o la regió LTR[194]. Per a determinar el nombre de còpies d'ADN viral per cèl·lula es fa una mesura paral·lela d'un gen control (com CCR5, β -globina o albúmina) amb l'objectiu de quantificar el nombre de

cèl·lules analitzades en la mesura d'ADN viral[187]. En pacients amb ART, el nivell total d'ADN del VIH-1 reflecteix la mida total del reservori viral i pot predir el temps de rebot viral després de la interrupció del tractament[195, 196]. S'ha vist que la quantificació de la mida del reservori per PCR condueix a una sobreestimació de la mida del reservori competent, ja que la gran majoria dels genomes virals quantificats no són competents per a la replicació[162]. S'ha estimat que la mesura de l'ADN total del VIH pot sobreestimar el reservori viral intacte en més de 100 vegades en aquells pacients tractats durant la infecció crònica i en més de deu vegades en els tractats durant la infecció aguda[162].

- **VIH-ADN no integrat circular.** Les formes circulars virals no integrades inclouen 1-LTR i 2-LTR. En els pacients infectats i sense tractament aquestes formes no integrades representen la major part del l'ADN total[193], mentre que en els pacients suprimits virològicament, les formes circulars són una minoria i no donen lloc a partícules virals. La quantificació de cercles 2-LTR s'ha proposat com un marcador subrogat de la replicació viral activa i dels cicles de replicació recents[197, 198].
- **VIH-ADN proviral integrat.** El mètode més descrit i ben caracteritzat per a la mesura de l'ADN viral integrat és l'anomenada Alu-gag PCR. La determinació d'aquest tipus de conformació genòmica és important, sobretot, en aquells pacients virèmics on les formes linears i circulars no integrades acaparen la quantificació total d'ADN viral. Aquest tipus d'assaig consta de dues PCR que permetran augmentar la sensibilitat i fer-lo quantificable, doncs combina una PCR convencional amb una RT-qPCR. En la primera PCR, els primers hibridaran en la regió Alu del genoma de l'hoste i en el gen viral gag, assegurant així amplificar únicament els genomes virals integrats. En la segona PCR, que serà un RT-qPCR, els primers estaran dissenyats per hibridar-se específicament amb la regió LTR viral el que permetrà quantificar les còpies d'ADN integrat.
- **VIH-ADN intacte.** La major part de les molècules d'ADN viral detectades pels mètodes convencionals corresponen a genomes defectius, és a dir, genomes que en cap cas acabaran generant noves partícules infeccioses funcionals[162]. La quantificació dels genomes intactes, correspon a la identificació d'aquells genomes que no presenten cap alteració a nivell de seqüència i que són candidats a generar nous virus replicatius. Per a la quantificació d'aquests genomes intactes s'ha desenvolupat una nova tècnica anomenada IPDA (de l'anglès *Intact Proviral DNA Assay*) que basa el seu principi en el disseny de primers i sondes (Ψ i *env*) que permeten la distinció entre els genomes que presenten deleccions o hipermutacions d'aquells que són intactes[199]. Una de les limitacions d'aquesta tècnica és l'elevat nombre de mesures en les que no s'observa amplificació, degut, probablement, a que els primers que s'usen no

hibriden amb totes les seqüències de pacients conseqüència del *mismatch*[200]. Una altra tècnica que permet la quantificació de genomes intactes és l'anomenada Q4PCR[201]. Aquest assaig es basa en la realització d'un assaig de qPCR amb 4 sondes que cobreixen les regions PS (packaging signal), gag, pol i env i requereix de la consegüent seqüenciació per verificar els resultats.

Assajos d'ARN viral

- **ARN associat a cèl·lules** (CA-HIV RNA, de l'anglès *cell associated HIV RNA*). En les cèl·lules infectades pel VIH, existeixen diverses formes d'ARN: *multispliced* (ms) de 1,8kb, *incompletely spliced* o *single spliced* (is) de 4kb i unspliced (us) de 9kb. Inicialment, es generen transcripts ARNms, que codifiquen per proteïnes reguladores, com ara Tat, Rev i Nef. A mesura que avança la infecció, hi ha un canvi a favor de l'ARNis i l'ARNus, transcripts codificants per l'envolta del genoma viral, així com per les proteïnes virals estructurals i accessòries[72, 202]. Per a la quantificació d'aquest ARN viral, es realitza l'extracció de material genètic i s'usa una variant de la qPCR que requereix d'un pas previ de retrotranscripció (RT-qPCR, de l'anglès *real time reverse transcription* (RT)-PCR). L'expressió d'ARN intracel·lular s'usa, actualment, com a marcador virològic de la progressió de la malaltia, així com també com marcador per demostrar l'activitat de certs compostos (LRAs) que tenen com a objectiu revertir la latència, tant *in vitro* com *in vivo*. Per a la detecció de les formes d'ARNus, s'usen primers i sondes dirigits a gag mentre que per a l'ARNms, les sondes i primers van dirigits a Tat i Rev[203]. El nombre de còpies d'ARN viral es normalitza al número de cèl·lules analitzat ja sigui mitjançant la realització d'una qPCR paral·lela per a un gen control (com ara β -actina o CCR5) o fer una estimació a partir de la quantitat total d'ARN extret[187].
Entre les tècniques que permeten la quantificació d'aquest ARN viral, trobem el TILDA (de l'anglès, *Tat/Rev Induced Limiting Dilution Assay*) que té com a objectiu la detecció específica de l'ARNms sense la necessitat de fer extracció del material genètic[204].
- **ARN plasmàtic**: la detecció de nivells baixos de virèmia residual en pacients que prenen TAR és un marcador de la presència de reservoris que contenen provirus del VIH. S'ha determinat una correlació entre els nivells de virèmia residual en plasma i els nivells d'ADN viral en sang[205]. Per tal de caracteritzar la virèmia residual s'ha desenvolupat diversos assajos que permeten la detecció d'una sola còpia d'ARN viral per ml de plasma, entre ells es troba el SCA (de l'anglès *single copy assay*). La tècnica consisteix en l'extracció d'àcid nucleic a través de la generació de pellet dels virions per ultracentrifugació i la quantificació de l'ARN viral a través de RT-qPCR usant primers i sondes dirigits a les regions de gag

(gSCA) o a la integrasa (iSCA) [137]. El iSCA usa primers dirigits a regions més conservades del genoma el que fa que disminueixi la taxa de *mismatch* amb la seqüència diana independentment del pacient[206]. En els últims mesos s'ha desenvolupat una versió millorada de la tècnica (iSCA 2.0) que permet una major recuperació de l'ARN en plasma i disminueix el límit de detecció de l'assaig[207].

Les mesures tant d'ADN com ARN per tècniques basades en la PCR, tendeixen a sobreestimar la mida dels reservoris virals, doncs no es distingeix entre aquells virus que són defectius dels que són competents, a excepció de l'IPDA i el Q4PCR.

Assajos QVOA

Les tècniques de quantificació de reservoris virals basades en principis moleculars (PCR) tenen la limitació de no poder mesurar de forma específica els reservori replicatiu competent. El **QVOA** (de l'anglès, *Quantitative Viral Outgrowth Assay*), o assaig de les IUPM (de l'anglès, *Infectious Units Per Million*), ha estat històricament la tècnica d'elecció per a la detecció del reservori viral replicatiu competent[208]. Breument, s'aïllen les cèl·lules d'interès de la sang dels pacients (habitualment cèl·lules T CD4⁺), es fa una ronda d'estimulació i es deixen en co-cultiu amb cèl·lules susceptibles a la infecció (p. ex: MOLT-4/CCR5) amb l'objectiu de propagar la infecció. Després d'entre 14 o 21 dies de cultiu, es calcula la quantitat de cèl·lules que s'han reactivat, han fet un cicle de replicació i han produït nous virions[209].

A diferència de les quantificacions del reservori del VIH-1 per tècniques moleculars (PCR), el QVOA subestima, generalment, la mida del reservori viral[210, 211]. Aquesta subestimació pot ser el resultat d'una reactivació viral subòptima, ja que s'ha demostrat que un únic cicle de reactivació no és suficient per induir la reactivació de tots els provirus[210]. La tècnica del QVOA presenta certes limitacions doncs és cara, laboriosa, requereix un nombre molt elevat de cèl·lules i hi ha una manca de normalització del mètode que fa que sigui difícilment reproducible. Aquesta falta reproductibilitat i normalització es va demostrar, recentment, en un estudi al comparar les mesures de QVOA, de les mateixes mostres cel·lulars, obtingudes en 4 laboratoris diferents[212].

Assajos de proteïna viral

Una altra mesura que permet quantificar els reservori, en aquest cas competent per a la traducció, es la quantificació de la proteïna viral p24 utilitzant assajos de detecció ultrasensible (**SIMOA**). Aquest tipus d'assaig presentar una sensibilitat de 1000 vegades per sobre dels assajos convencionals d'ELISA. L'elevada sensibilitat de la tècnica permet la detecció de producció de proteïna viral després d'estimulació exògena en pacients amb reservoris molt reduïts.

Assajos basats en la detecció per citometria i microscòpia

A més de les tècniques basades en PCR, es poden utilitzar mètodes basats en hibridació *in situ* (ISH, de l'anglès *in situ hybridation*) per estudiar la transcripció i la traducció del VIH a nivell de cèl·lules individuals[213]. Ja als anys noranta, diversos grups van desenvolupar assajos basats en ISH per visualitzar les cèl·lules del VIH-ARN⁺[214, 215]. Més recentment, s'han desenvolupat assajos de nova generació basats en aquest mateix principi que permeten la detecció d'ARN viral i la visualització d'aquestes per microscòpia en seccions de teixit (**RNAscope**) o per citometria de flux en mostres de sang perifèrica (**RNA/FISH flow**)[118, 216-218]. Un gran avantatge dels mètodes basats en ISH és la possibilitat de la caracterització fenotípica de cèl·lules VIH-ARN⁺, mitjançant, per exemple, el marcatge de diverses molècules de superfície cel·lular i/o intracel·lulars. El principi d'aquest mètode i els resultats obtinguts són el tema de l'article 1 de la present tesi doctoral [219].

Pel que fa a la detecció de cèl·lules que continguin virus competents per a la traducció de proteïnes, els anticossos que detecten la proteïna càpsida p24 per citometria de flux sovint no són molt específics[220-222]. Per abordar aquesta manca d'especificitat s'ha proposat un nou mètode (**HIV-Flow**) que permet la detecció simultània de diversos epítops de la proteïna p24, disminuint en gran mesura la detecció de falsos positius[222].

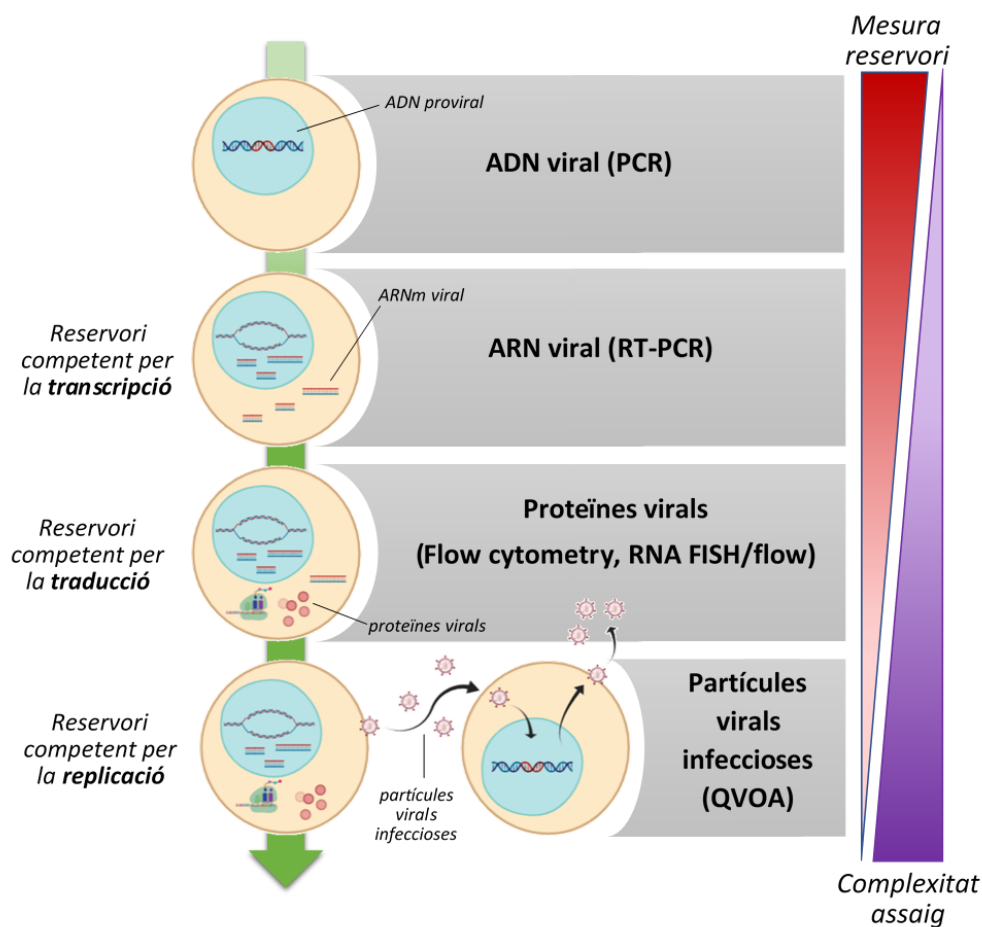


Figura 10: Resum de les tècniques de quantificació del reservori del VIH-1. La quantificació d'ADN proviral per PCR sobreestimen la mida dels reservoris virals ja que reconeixen tots dos tipus de genomes, intactes i defectuosos. Altres proves mesuren la mida dels reservoris virals capaços de produir ARN virals després de la reactivació (RR-PCR). Les quantificacions basades en citometria de flux permeten determinar la freqüència de les cèl·lules infectades que contenen virus competents per a la traducció de proteïnes. Finalment, es considera que el QVOA és el "gold standard" i permet mesurar la mida dels reservoris virals competents per a la replicació. Adaptat de Baxter AE et al, 2018[223].

5 RESPOSTA IMMUNITÀRIA FRONT EL VIH-1

5.1 Immunitat innata

La immunitat innata és la primera línia de defensa que té l'individu contra virus i bacteries, i es basa en barreres epitelials, en el sistema de complement i en cèl·lules amb propietats fagocítiques i presentadores d'antigen, com ara granulòcits, macròfags i cèl·lules dendrítiques. Aquestes cèl·lules de la immunitat innata tenen com a objectiu detectar els patògens i intentar eliminar-los o controlar la infecció[224]. El sistema immunitari innat detecta els virus principalment pel reconeixement d'àcids nucleics virals i ho fa a través de dos mecanismes: la detecció de genomes virals presents als virions, a través dels receptors de tipus TLR (TLR, de l'anglès *Toll-like receptor*), i la

detecció d'àcids nucleics produïts durant la replicació viral. Per exemple, les cèl·lules dendrítiques plasmacitoides (pDCs) utilitzen el TLR7 i el TLR9 per reconèixer els virus d'ARN (monocatenari), com el VIH-1, i d'ADN de doble cadena, respectivament[225, 226]. Així doncs, la resposta immunitària innata s'inicia a la cèl·lula infectada amb els processos de detecció de patògens a través de la detecció patrons moleculars associats a patògens (PAMPs, de l'anglès *pathogen-associated molecular patterns*) per part d'uns receptors específics anomenats PRR (PRRs, de l'anglès *pathogen-recognition receptors*)[227].

La primera senyal de resposta immunitària front a la infecció per VIH-1 és l'aparició de reactants de la fase aguda en plasma, entre els que trobem alfa-antripsina i sèrum amiloid A, entre 3 i 5 dies després de la infecció[228]. La irrupció inicial incontrolada de virèmia en la fase aguda provoca, normalment, nivells d'ARN viral plasmàtics molt elevats, sovint superiors a 100.000 còpies/mL, i està associada a un augment en la producció de citocines inflamatòries, com ara interferó alfa (INF- α) i interleucina 15 (IL-15)[229]. Les primeres citocines són produïdes per les cèl·lules dendrítiques i macròfags, que es troben principalment a les mucoses, tot i que durant la infecció molts altres tipus cel·lulars podran produir-ne. Tot i que aquestes citocines tenen activitat antiviral, possiblement la tempesta de citocines contribuirà a una activació immunitària perjudicial i contraproductent, i a la pèrdua de limfòcits T CD4⁺[54]. En aquesta primera resposta innata també juguen un paper important les cèl·lules NK (NK, de l'anglès *natural killer*). Aquestes s'activen en la fase aguda de la infecció i tindran com a objectiu eliminar les cèl·lules infectades. Les cèl·lules NK tenen activitat lítica contra les cèl·lules que han disminuït l'expressió d'antígens del complex d'histocompatibilitat major (MHC) de classe I i són una línia de defensa important quan el VIH s'escapa de la resposta immunitària. Les cèl·lules NK proliferen en resposta a interferó tipus 1 secretat per les cèl·lules dendrítiques. Aquestes cèl·lules NK estimulades alliberen citocines com interferó γ (IFN- γ) que inhibeix la replicació viral, factor de necrosi tumoral α (TNF- α) i quimiocines per activar la proliferació de cèl·lules T.

En la majoria de casos, la resposta innata és incapaç d'eliminar el virus o bé la resposta és evadida per part del patogen, és aleshores que entra en joc la immunitat adaptativa.

5.2 Immunitat adaptativa

En aquesta resposta immunitària s'inclou la resposta humoral, en la que es promou la producció d'anticossos per part de les cèl·lules B, i la resposta cel·lular, realitzada per les cèl·lules T CD4⁺ i T CD8⁺[230] (Fig. 11).

Resposta humoral

La infecció pel VIH-1 indueix una intensa resposta d'anticossos enfront de pràcticament totes les proteïnes reguladores i estructurals de VIH. S'ha descrit no només síntesi d'anticossos enfront de l'embolcall, sinó també enfront de proteïnes de la matriu, de la nucleocàpsida viral i proteïnes reguladores de virus. No obstant això, la producció d'anticossos amb capacitat neutralitzant és escassa i molt ràpidament s'observa un escapament viral a aquests[57]. A més, en experiments en *reshus macaques* (model VIS) en els que es depleciona les cèl·lules B i, per tant, es disminueix la producció d'anticossos neutralitzants, s'ha vist que no es produeix cap canvi a nivell de *clearance* viral[231]. Així doncs, es posa de manifest que la producció d'anticossos neutralitzants no juga un paper important en el control inicial de la replicació del VIH-1[57].

Resposta cel·lular

En la infecció pel VIH-1 es produeix una resposta cel·lular antiviral en limfòcits T CD4⁺ i limfòcits T CD8⁺ citotòxics (CTL) que constitueix, probablement, el mecanisme més important de protecció enfront del VIH[232]. L'estudi de la resposta citotòxica *in vitro* ha demostrat que en els pacients infectats hi ha una expansió clonal de limfòcits T CD8⁺ amb activitat citotòxica i que presenten una gran capacitat per inhibir la replicació del VIH[233-235]. Aquesta resposta cel·lular és especialment marcada en pacients en estadi de primoinfecció i en controladors d'elit (EC, de l'anglès *elite controllers*)[236] i la seva intensitat es correlaciona amb el control de la replicació viral. S'ha determinat la presència de cèl·lules citotòxiques específiques pel VIH-1 en un gran nombre de compartiments anatòmics entre els que es troben els limfonodes, la melsa, la sang perifèrica, el líquid cefalorraquidi i la mucosa vaginal i gastrointestinal (GALT)[57]. Les primeres respostes de cèl·lules T CD8⁺ apareixen dies abans del pic de la virèmia i reconeixen entre un i tres epítops diferents que es troben en les proteïnes virals nef i env[54, 237, 238]. La resposta específica cap a altres proteïnes virals, tals com p24, solen aparèixer més tard i són més importants pel control de la càrrega viral al *set point* (període en què la virèmia plasmàtica se situa en un nivell estable) que en el control de la virèmia inicial. Des del punt de vista qualitatiu, aquesta resposta és completa en un doble sentit: es reconeixen múltiples epítops de les diferents proteïnes virals i l'estudi del repertori de receptors antigènics de limfòcits T revela que s'utilitza un ampli espectre de reordenaments. Les cèl·lules T CD8⁺, a part de promoure la mort de les cèl·lules infectades, segreguen citocines, com ara interferó- γ (IFN- γ) i el factor de necrosi tumoral α (TNF- α) i també quimiocines, com MIP-1 α , MIP β i RANTES, que inhibeixen la replicació de virus i bloquegen l'entrada del virus a les cèl·lules T CD4⁺[239].

Durant la infecció aguda per VIH-1 es produeix un esgotament inevitable dels limfòcits T CD4⁺ del tracte gastrointestinal i d'altres teixits[240]. A més, es produeix un dany complementari a les barreres de les mucoses que permet la filtració de productes

bacterians a altres teixits i a la circulació sanguínia, provocant una major activació immune que pot afavorir la replicació del VIH[241]. La pèrdua ràpida, precoç i massiva de cèl·lules T CD4⁺ en òrgans limfoides probablement explica les febles respostes de les cèl·lules T CD4⁺ en casos d'infecció aguda per VIH. No obstant això, durant la infecció crònica hi ha cèl·lules T CD4⁺ que secreten interleucina-2 (IL-2) o citocines, com IFN- γ , per controlar la virèmia.

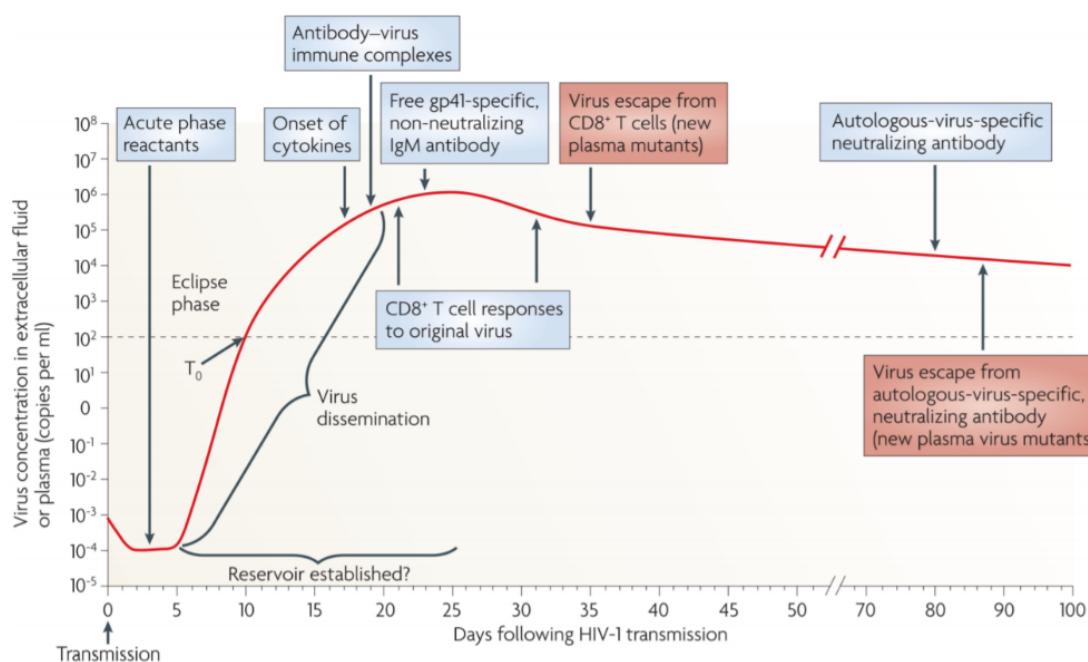


Figura 11. Esquema de les respostes innates i adaptatives detectades després de la transmissió del VIH-1. La primera resposta detectada és l'augment dels nivells de proteïnes de fase aguda al plasma, que s'observen quan la replicació del virus encara està en gran mesura restringida als teixits de la mucosa i els ganglis limfàtics (fase d'eclipsi). Quan el virus es detecta per primera vegada al plasma, també s'observen increments dels nivells de citocines plasmàtiques. Al cap de pocs dies, a mesura que la virèmia plasmàtica continua augmentant exponencialment, es detecten els primers immunocomplexos contra els virus. L'expansió de les primeres respostes de cèl·lules T CD8⁺ específiques del VIH-1 també comença abans de la virèmia màxima, seguida de la detecció dels primers anticossos no neutralitzants dirigits contra la glicoproteïna 41 (gp41). L'escapament del virus a les primeres respostes de cèl·lules T CD8⁺ es produeix ràpidament. En aquest moment, ja existeixen els reservoris virals, establerts en els primers dies posteriors a la infecció. Els primers anticossos neutralitzants de virus es detecten al voltant del dia 80 després de la infecció. (imatge extreta de McMichael et al., 2010[230]).

Tot i que el sistema immunitari està preparat per fer front a gran quantitat d'infeccions, tant víriques com bacterianes, no és capaç de controlar la infecció pel VIH-1. Possiblement hi ha diverses raons que poden contribuir a aquest fracàs. Per una banda, el virus té com a principal diana les cèl·lules T CD4⁺, on el VIH és capaç de replicar-se i induir la mort per efecte citopàtic, induint una gran limitació en un dels components principals del sistema immunitari adaptatiu. A més, el VIH també pot establir una infecció latent a les cèl·lules T CD4⁺ i romandre invisible a les cèl·lules T CD8⁺, a la vegada que pot infectar cèl·lules en santuaris immunològics en els que aquestes cèl·lules

citotòxiques no tindran accés. La situació d'activació sistèmica conduirà a un esgotament de les cèl·lules citotòxiques i a una pèrdua del control immunològic. Per altra banda, l'existència d'individus amb capacitat de controlar la infecció en absència de tractament antiretroviral ha permès entendre una mica millor quins són aquells paràmetres que marquen la diferència[242, 243]. S'ha vist que els individus controladors del virus presenten respostes citotòxiques molt més potents, presentant unes cèl·lules T CD8⁺ amb un alt grau d'heterogeneïtat en termes de secreció de citocines i en estat de diferenciació[244, 245], i amb una elevada capacitat proliferativa[246, 247]. També s'ha vist que aquestes cèl·lules citotòxiques específiques i amb òptima capacitat de supervivència i expansió es troben en freqüències més altes en les mucoses d'aquests individus controladors[248]. A més, aquests individus poden presentar nivells més elevats de certs factors de restricció virals, com ara APOBEC3, SLFN11 o SAMHD1, el que permeten un millor control de la infecció[249-251]. Anàlisis genètics van demostrar una forta associació entre el control de la infecció del VIH i la tinença de certs al·lels del complex major d'histocompatibilitat de tipus I, concretament amb els al·lels HLA-B57 o HLA-B27[252-255].

6 ESTRATÈGIES DE CURA

La teràpia antiretroviral actual és incapaç d'erradicar el virus del VIH-1 degut a la presència de reservoris latents. Per aquest motiu els pacients han de prendre tractament antiretroviral, sense interrupció, la resta de la seva vida fent front a les toxicitats associades a la teràpia[256]. Per aquest motiu, és imprescindible desenvolupar noves estratègies terapèutiques per aconseguir una cura efectiva, definida com un tractament capaç de promoure una remissió del virus en absència de tractament antiretroviral. S'han proposat tres estratègies (Fig. 12): cura per erradicació (eliminació de tots els reservoris latents), cura funcional (control immunitari sense presència de tractament) i una combinació de les dues anteriors, cura híbrida (reducció del reservori combinat amb una millora del control per part del sistema immunitari)[257].

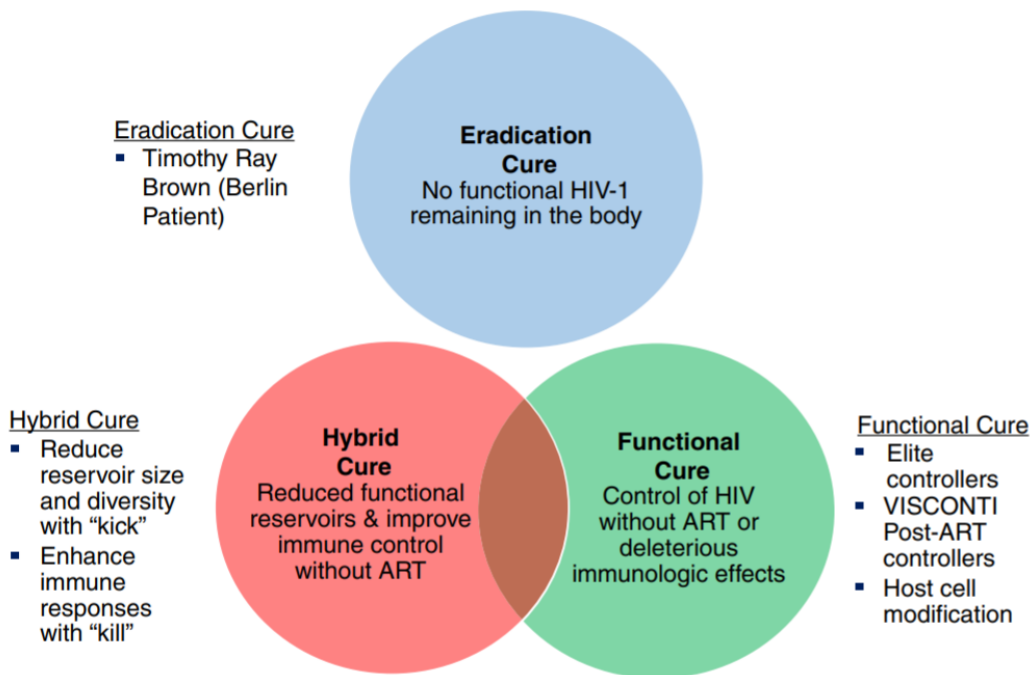


Figura 12. Tipus de estratègies de cura del VIH-1. La cura per erradicació té com a objectiu eliminar tot virus funcional de l'organisme (p. ex. transplantament al·logènic de cèl·lules mare). La cura funcional, representada pels controladors d'elit i els controladors post-tractament, es defineix per control del VIH-1 en absència de tractament. I la cura híbrida es basa en la reducció de la mida del reservori latent combinat amb una millora del control per part dels sistema immunitari. Imatge extreta de Cillo and Mellors, 2016[257].

CURA PER ERRADICACIÓ

La cura per erradicació té com a objectiu principal l'eliminació total del virus de l'organisme, incloent l'eliminació de tots els reservoris, tant cel·lulars com anatòmics.

Transplantament al·logènic de cèl·lules mare

El pacient de Berlín va ser el primer exemple, i fins fa poc l'únic, de curació del VIH-1. Timothy Ray Brown, més conegut com el pacient de Berlín, va ser diagnosticat amb una leucèmia mieloide aguda i infecció pel VIH-1 i va ser sotmès a un trasplantament al·logènic de cèl·lules mare hematopoètiques (HSCT, de l'anglès *hematopoietic stem cell transplantation*). El donant va ser específicament seleccionat per a que fos homozigot per una mutació concreta, una deleció de 32 parells de bases en el gen del coreceptor CCR5 (CCR5 Δ 32), una mutació que confereix resistència a les soques R5 del virus, degut a la seva inhabilitat per unir-se al receptor CCR5. Al cap de 3 mesos del transplantament es va deixar de detectar el virus del VIH-1 en plasma i actualment, 10 anys després del transplantament, els nivells de VIH-1 segueixen sent indetectables en absència de teràpia antiretroviral[258, 259].

Diversos intents similars per erradicar el VIH es van realitzar en pacients que patien limfomes o leucèmies (Taula 2).

Patient/transplant location	Reason for transplant	Age ¹	Outcome
Timothy Brown/Berlin	Acute myeloid leukemia	40	No viremia for > 12 years following transplant and discontinuation of cART [2]
NR/Utrecht	Myelodysplastic syndrome	53	Relapse of myelodysplastic syndrome and death 2 months after transplant [7]
NR/Münster	Non-Hodgkin's lymphoma	51	Infection and death 4 months after transplant [7]
NR/Minneapolis	Acute lymphoblastic leukemia	12	GVHD and death 3 months after transplant [7]
NR/Santiago	Non-Hodgkin's lymphoma	46	Pneumonia and death shortly after transplant [7]
NR/Barcelona	Non-Hodgkin's lymphoma	37	Relapse of lymphoma and death 3 months after transplant [6]
NR/Essen	Non-Hodgkin's lymphoma	27	Viral rebound with CXCR4 using virus 27 days after discontinuation of cART (20 days after transplant). Relapse of lymphoma and death 12 months after transplant [8]
NR/Halifax	Chronic myeloid leukemia	58	Decreased viral reservoir 9 months after transplant. Death from myocardial infarction 1.5 years after transplant [L. Barrett, personal communication]
NR/London	Hodgkin's lymphoma	NR	No viremia for 18 months following discontinuation of cART [1]
NR/Düsseldorf	Acute myeloid leukemia	49	No viremia for 4 months following discontinuation of cART [9]

NR: not reported.

¹ Age at time of transplant.

Taula 2. Resum dels trasplantaments al·logènics de cèl·lules mare en pacients VIH⁺. Es presenta el nom del pacient i el lloc on s'ha dut a terme el trasplantament, la causa mèdica que ha promogut la cirurgia, l'edat del pacient i el resultat del procediment. En tots els casos els donants eren CCR5Δ32. Taula extreta de Scarborough et al., 2019[260].

Malauradament, aquests intents són extremadament arriscats doncs existeix un risc de mortalitat d'entre un 10 i un 12% en el moment del trasplantament, i d'un 40-45% després d'un any. A més, la probabilitat de trobar donants amb la mutació CCR5Δ32 (aproximadament l'1% de la població caucàsica) i que sigui compatible a nivell d'HLA amb el receptor és molt baixa[260].

L'any 2018 es va publicar un estudi realitzat en la cohort de pacients IciStem en el que es va fer una caracterització i quantificació exhaustiva del reservori viral en 6 pacients VIH⁺ que havien estat sotmesos a un trasplantament al·logènic de cèl·lules mare hematopoètiques[261]. Els resultats obtinguts van demostrar que en el 85% dels casos no es va detectar ADN proviral ni en sang ni en teixits ni tampoc es va detectar la presència de reservori competent. Val a dir, que en aquest assaig encara no s'ha produït la interrupció del tractament, però tots els anàlisis *in vitro* denoten una dràstica reducció dels reservori viral que seria compatible amb els resultats obtinguts amb el pacient de Berlin.

Recentment, s'ha informat d'un segon cas de cura del VIH-1, el conegut com a pacient de Londres. Es tracta d'un pacient VIH⁺ que tenia un limfoma de Hodgkin i que també es

va sotmetre a un trasplantament de cèl·lules mare hematopoètiques d'un donant amb la mutació CCR5Δ32[262]. Després de 30 mesos d'interrupció del tractament, no s'ha observat cap rastre de virèmia residual.

Cal destacar que, tot i l'èxit de curació en aquests dos pacients, s'ha de tenir en compte que aquest procediment és molt complex, perillós, econòmicament costós i requereix de donants compatibles, el que fa que es converteixi en una aproximació poc realista per aconseguir una cura del VIH a gran escala. A part, una altra limitació d'aquesta estratègia és la susceptibilitat a soques amb tropisme X4 que podrien causar un rebot de la virèmia[263, 264].

Edició gènica

Altres estratègies es basen en modificar el genoma de l'hoste per fer les cèl·lules resistents a la infecció pel VIH[263]. L'objectiu és, mitjançant tècniques d'edició gènica, modificar el genoma de les cèl·lules T CD4⁺ o cèl·lules mare hematopoètiques derivades de la medul·la o de la sang perifèrica per tal de generar cèl·lules resistents al virus que seran introduïdes novament al pacient. Existeixen diversos mètodes de modificació de l'ADN: les nucleases de dits de zinc o ZFN (de l'anglès *zinc-finger nucleases*), les nucleases efectores de tipus activador de transcripció o TALEN (de l'anglès *transcription activator-like effector nucleases*) i la eina CRISPR/cas9 (de anglès de *clustered regularly interspaced short palindromic repeats-associated protein nuclease-9*). En un assaig clínic del 2014, es va alterar l'expressió del coreceptor CCR5 en les cèl·lules T CD4⁺ autòlogues mitjançant la tècnica ZFN[265]. Els resultats mostren que els canvis persisteixen després de la reinfusió i que la vida mitjana de les cèl·lules modificades és de 48 setmanes; tot i això, es va observar un rebot de la càrrega viral plasmàtica en tots els participants després de la interrupció de l'ART. Un estudi *in vitro* també ha demostrat que l'edició simultània dels coreceptors CCR5 i CXCR4 per CRISPR/Cas9 pot fer que les cèl·lules siguin resistents a la infecció pel VIH, independentment del tropisme que presenti el virus[266, 267]. A part de modificar els coreceptors, també s'ha usat l'edició gènica per alterar les seqüències dels provirus integrats[268, 269].

Tots els estudis mencionats suporten l'ús de l'edició gènica com a nova estratègia terapèutica per tractar el VIH-1; tot i això s'ha de tenir en compte diversos factors limitants com són la complexitat i el cost del procediment, la toxicitat i els efectes en les cèl·lules que no són diana (*off-target*) i l'escapament viral, entre d'altres[270].

CURA FUNCIONAL

La cura funcional inclou aquelles estratègies que permeten el control de la replicació viral en absència de tractament, mantenint la càrrega viral estable i un recompte normal

de cèl·lules T CD4⁺. Així doncs, ateses les dificultats associades a l'eliminació completa dels reservoris virals, la cura funcional o remissió del virus sembla ser un enfocament més realista.

Inici precoç i intensificació del tractament antiretroviral

La hipòtesi de la viabilitat d'un enfoc d'aquest tipus es basa en l'existència d'exemples concrets, com ara els controladors d'elit (EC), els controladors post-tractament (PTC, de l'anglès *post-treatment controllers*) i els no progressors a llarg termini (LTNP, de l'anglès *long-term non-progressors*). En els últims anys s'han descrit diversos casos de remissió pediàtrica en els que el tractament antiretroviral precoç, que s'inicia en temps molt proper al moment de la infecció primària, ha permès que s'aconsegueixi una remissió temporal i a llarg termini. Un dels primers casos que es va reportar va ser el del nadó de Mississipi, un infant infectat pel VIH-1 que va iniciar tractament 30h després de néixer i que va estar en tractament fins als 18 mesos[271]. Després de la interrupció del tractament, no es va detectar cap rastre del virus durant 2 anys, moment en el que es va observar un repunt de la càrrega viral plasmàtica[272]. El 2015, es va notificar un altre cas pediàtric: un infant francès que va iniciar tractament antiretroviral a l'edat de 3 mesos i que el va suspendre als 6 anys. Onze anys després de la interrupció, la seva càrrega viral es manté indetectable i el seu recompte de cèl·lules T CD4⁺ és estable[273]. Finalment, el 2019, es va reportar el cas d'un nen sud-africà que va rebre TAR durant 40 setmanes als dos mesos de néixer i que, gairebé 9 anys després de la interrupció del tractament, presenta una càrrega viral indetectable i no té símptomes d'infecció pel VIH [274].

Altres exemples concrets de remissió viral s'observen en els controladors post-tractament (PTC). Aquests són individus infectats pel VIH-1 que van iniciar el tractament durant la infecció primària (normalment entre 3-6 mesos després de la infecció) i que són capaços de controlar la replicació viral durant diversos anys després de la interrupció del tractament. La descripció inicial dels PTC prové d'un estudi realitzat el 2010[275]. Aquests individus es van incloure en un estudi posterior (cohort VISCONTI) que va identificat 14 individus capaços de controlar la replicació viral durant un temps mitjà de 4,5 anys després d'aturar la TAR[276]. Els PTC difereixen molt dels controladors d'elit (EC), pel que fa als mecanismes de control de la virèmia, però tenen en comú que presenten reservoris virals baixos i estables[277]. A diferència dels EC, els PTC presenten una càrrega viral més elevada i un nombre de cèl·lules T CD4⁺ més baix durant la fase aguda de la infecció; no acostumen a presentar els al·lels protectors típics dels EC (HLA-B57 i HLA-27) i, a més, les respostes específiques dels limfòcits T CD8⁺ són menors, o en alguns casos inexistents. Diversos casos de PTC que han començat el tractament en fase

aguda han estat descrits posteriorment [278-280]. Tots aquests casos de cura funcional, basats en el control de la replicació, es resumeixen en la Fig. 13.

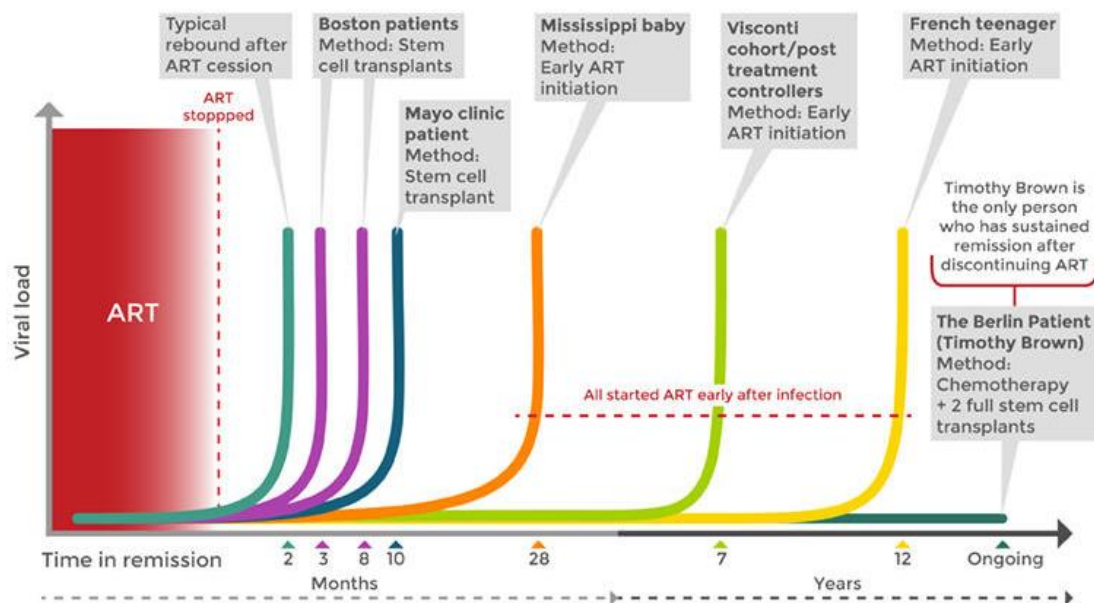


Figura 13. Resum dels casos de remissió viral fins a l'any 2016. Imatge extreta de: <https://www.avert.org/professionals/hiv-science/searching-cure>

Tot i que la teràpia antiretroviral aconsegueix suprimir la virèmia plasmàtica fins a límits indetectables, se segueix observant una persistent activació immunitària que podria explicar-se, en part, per baixos nivells de *ongoing replication* o per la presència de virèmia residual a nivells tan baixos que les tècniques actuals no poden detectar. Aquesta virèmia residual podria ser deguda a una supressió parcial o bé a que els fàrmacs es troben en concentracions subòptimes en alguns teixits. En aquest aspecte, la intensificació de la teràpia antiretroviral pretén augmentar la penetració dels fàrmacs i reduir la replicació residual amb l'objectiu final de disminuir el reservori[263]. Fins al moment s'han realitzat estudis amb raltegravir[281, 282], maraviroc[283, 284] i darunavir/ritonavir[285] i, tot i que cap d'ells ha demostrat tenir un impacte en la disminució del reservori o la activació immunitària, és important seguir realitzant estudis en aquesta línia amb fàrmacs més potents i de diferents famílies, sobretot en l'estratègia de tractament precoç de la infecció.

Anticossos neutralitzants

Les investigacions centrades en la modulació immunitària focalitzen la seva atenció cap a fàrmacs o procediments que poden provocar algun tipus de canvi sostingut en el sistema immunitari per tal de combatre millor el VIH. Entre els elements capaços de donar una resposta al VIH-1 s'inclouen cèl·lules T CD8⁺, les cèl·lules NK i els anticossos neutralitzants d'ampli espectre (bNAbs, de l'anglès *broadly neutralising antibodies*).

Com s'ha comentat en apartats anteriors, totes les persones que infectades amb VIH responen naturalment al virus produint anticossos. Si bé els anticossos de la majoria d'individus no poden eliminar el VIH, el sistema immunitari d'una petita minoria (1%) que han demostrat resiliència contra la infecció, produeixen bNAbs que poden matar o neutralitzar diverses soques de VIH[286]. Aquests bNAbs tenen un alt nivell d'hipermutacions somàtiques i poden reconèixer diverses regions de l'embolcall viral.

En models animals, l'administració passiva de bNAbs està associada a la supressió viral, un augment de eliminació de cèl·lules infectades, un augment de les respostes immunitàries antivirals i una reducció de la mida dels reservoris[287]. A més, l'administració de bNAbs en un model de SIV en *rhesus macaques* promou el desenvolupament d'una resposta T CD8⁺ efectiva associada amb el control de la infecció a llarg termini[288].

Els primers assajos clínics en humans no han reportat cap toxicitat associada a la infusió de bNAbs. Diversos estudis realitzats en pacients VIH⁺ han demostrat que els bNAbs poden suprimir o retardar el rebot viral quan s'interromp el tractament antiretroviral. Un estudi va demostrar que el rebot viral es podia retardar fins a 19 setmanes després d'una infusió de bNAbs (3BNC11)[289], mentre que un altre estudi amb una combinació de bNAbs (3BNC117 i 10-1074) va demostrar que el rebot viral es podia retardar fins a 30 setmanes després d'aturar el tractament antiretroviral[290]. S'ha vist que la combinació de dos anticossos neutralitzants és més efectiva que la monoteràpia, doncs es disminueix dràsticament l'aparició de resistències[291].

Actualment, hi ha diverses classes de bNAbs en desenvolupament clínic i és probable que apareguin evidències sobre el potencial d'aquesta immunoteràpia durant els propers anys. En el camp de desenvolupament de les vacunes també s'està intentant generar immunògens capaços de promoure la generació d'aquests bNAbs com a mecanisme preventiu a la infecció pel VIH-1[292].

CURA HÍBRIDA

Aquest tipus de cura té com a objectiu promoure la disminució dels reservoris latents a la vegada que millora el control del reservori residual per part del sistema immunitari de l'hoste. La estratègia més extensa per assolir aquest tipus de cura és la coneguda com a *Shock and kill* o *Kick and kill*.

Shock and kill

Una de les causes del rebot viral és la reactivació espontània de les cèl·lules latentment infectades, les quals no són reconegudes per part del sistema immunitari de l'hoste com a una amenaça. Una de les estratègies proposades per eliminar aquests reservoris

latents es basa en, primer, reactivar aquestes cèl·lules mitjançant els agents reversors de latència (LRAs, de l'anglès, *latency-reversing agents*) que és el que es coneix com a **shock**; i, segon, eliminar aquestes cèl·lules reactivades (**kill**) ja sigui per acció del sistema immunitari o bé per efecte citopàtic del virus[293] (Fig. 14).

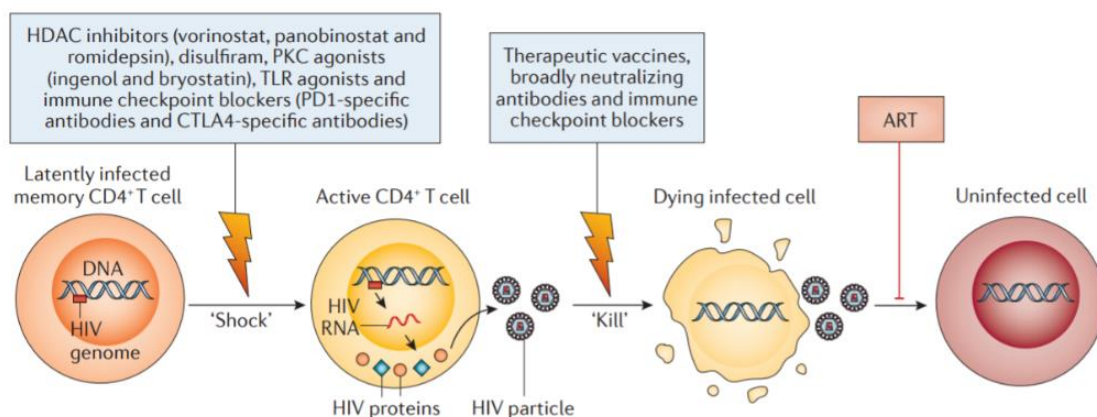


Figura 14. Estratègia “Shock and kill”. La integració de genomes silenciats del VIH en el genoma de l'hoste de cèl·lules de memòria T CD4⁺ de llarga vida permeten l'establiment de reservoris latents. Gran part de les estratègies dirigides a de curar la infecció pel VIH inclouen revertir la latència del virus (“shock”), donant lloc a la producció de proteïnes virals i, eventualment, una eliminació de la cèl·lula infectada (“kill”) mitjançada pel sistema immunitari de l'hoste. Imatge extreta de Deeks et al., 2015[62].

Un estudi publicat el 2014 demostra que caldria una reducció de reservoris de >4 logs per aconseguir la remissió en el 50% dels individus[294]. Els primers intents de reactivar el virus es van realitzar al final del anys 90, quan es van testar agents com la IL-2 en combinació amb un anti-CD3. Els resultats de l'assaig clínic va denotar molts efectes secundaris (febre, nàusees, diarrea, mal de cap i insuficiència renal) associats a l'activació/proliferaació, així com una ràpida aparició d'anticossos anti-CD3, el que limitava l'efecte estimulador[295].

Fins al moment, s'han descrit diversos tipus de compostos que poden actuar com a LRAs, ja sigui mitjançant el segrest de factors de transcripció o bé per modificacions epigenètiques (Fig. 15). Entre els diferents LRAs, que s'han descrit fins a l'actualitat, trobem els inhibidors del bromodomini i la regió extraterminal (BET, de l'anglès *bromodomain and extraterminal motif*) com el JQ-1, inhibidors de les ADN metiltransferases (DNMT, de l'anglès *DNA methyltransferase*), els agonistes de la proteïna-cinasa C (PKC, de l'anglès *protine kinasa C*) com ingenol i briostatina, i els inhibidors de les histones desacetilases (HDACi) com vorinostat, romidepsina i panobinostat.

Aquests últims són els més estudiats i els que han estat testats en assajos clínics. Les histones desacetilases (HDAC) promouen l'eliminació dels grups acetil dels residus de

lisina en les histones donant lloc a una conformació de la cromatina condensada i silenciada transcripcionalment. Els inhibidors d'aquests enzims, les HDACi, promouran el bloqueig de les HDAC donant lloc a una hiperacetilació de les histones que resultarà en l'obertura de la cromatina i afavorirà l'inici de la transcripció. Entre els HDACi testats en assajos clínics trobem vorinostat [296-298], romidepsina [299, 300] i panobinostat [301].

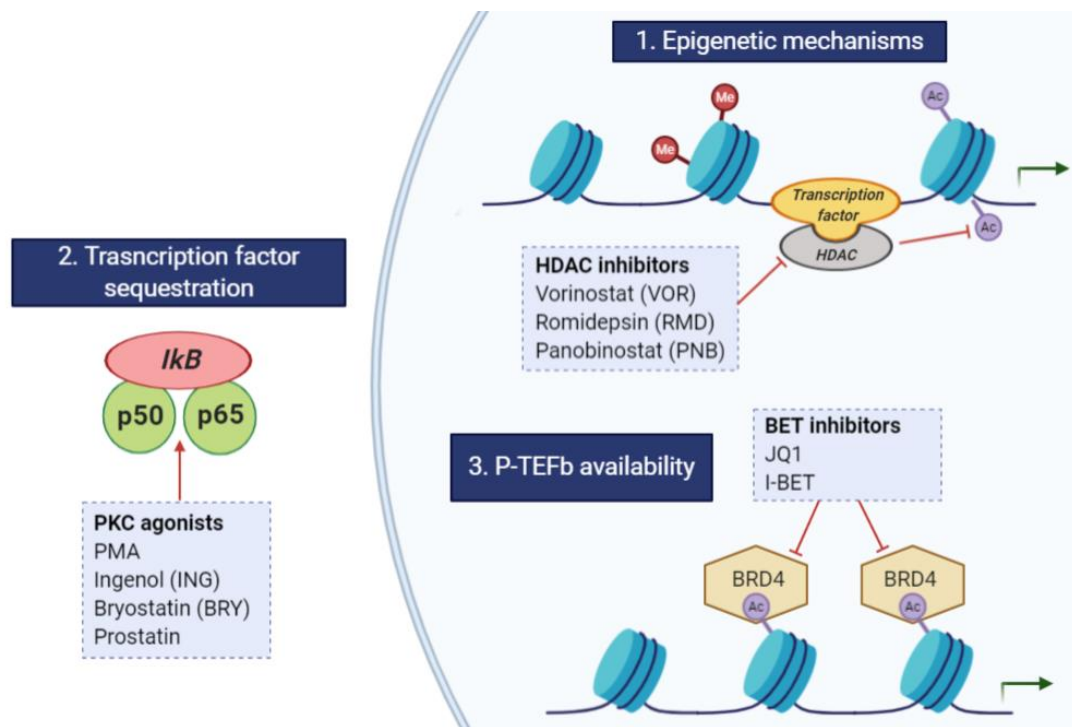


Figura 15. Mecanismes que contribueixen a la latència del VIH-1 i acció dels diferents LRA per reactivar l'expressió viral. 1. Inhibició de les histones desacetilases per acció dels inhibidors de HDAC, el que promou l'acetilació d'histones i la transcripció viral. 2. Els agonistes de PKC actuen afavorint l'accés a factors de transcripció tals com NF-κB. 3. Els inhibidors de BET promouen un augment en la disponibilitat de certs factors com P-TEFb que podran unir-se a Tat i iniciar la transcripció.

Tot i que els diversos agents reversors de la latència reactiven el VIH *in vitro*, *ex vivo*, i indueixen un augment de l'ARN del VIH (tant associat a cèl·lules com plasmàtic) *in vivo* en participants en tractament antiretroviral, cap d'ells ha demostrat induir una disminució en la mida del reservori en termes d'ADN en els assajos clínics realitzats[302].

Diversos factors poden ser responsables d'aquesta incapacitat de reduir la mida dels reservoris virals *in vivo*[303]. Pot ser que aquests agents no siguin prou potents per induir nivells suficients de reactivació per permetre l'eliminació de cèl·lules infectades, a la vegada que no siguin capaços d'actuar a nivell de tots els reservoris cel·lulars. En aquest context, diversos estudis *in vitro* i *ex vivo* han demostrat que les combinacions de LRA indueixen nivells més alts de reactivació que els compostos individualment[304-

306]. Tot i les evidències obtingudes *in vitro* i *ex vivo*, actualment, no s'ha provat cap combinació *in vivo* en individus infectats per VIH. Una millor comprensió de la capacitat d'aquestes combinacions de LRAs per reactivar *ex vivo* el virus latent en les diferents subpoblacions de limfòcits T CD4⁺ és necessària per al desenvolupament de futurs assajos clínics que impliquin aquestes combinacions. Aquesta qüestió ha estat objecte d'una part del meu treball de tesi i els resultats obtinguts es presenten a l'article 2.

Un altre dels factors que pot estar implicat en aquesta incapacitat dels LRAs de disminuir el reservori, pot ser una mala eliminació ("kill") de les cèl·lules infectades després de la reactivació viral[307]. Aquest fet es pot explicar per diverses raons: per una banda, la infecció pel VIH està associada a l'esgotament de cèl·lules T CD8⁺, que es defineix per una disminució progressiva de capacitat de producció de citocines, de proliferació i de citotoxicitat, així com augment de l'expressió de molècules d'esgotament immunològic (PD-1, CTLA-4, Tim-3, LAG-3)[308]. Cal tenir en compte que l'inici de la TAR només restaura parcialment els nivells d'aquestes molècules a la superfície de cèl·lules T CD8⁺[309], per tant, el fenomen d'esgotament de cèl·lules T CD8⁺ podria contribuir a una eliminació deficient dels reservoris virals en el context de l'estratègia de "Shock and Kill"[310]. A més, s'ha demostrat que alguns LRAs poden tenir un efecte inhibidor sobre l'activitat citotòxica de cèl·lules T CD8⁺ i cèl·lules NK *in vitro*[311-315]. Aquest és el cas de la romidepsina (HDACi) que inhibeix la funció de les cèl·lules T CD8⁺[316] i la briostatina que inhibeix l'activitat de les cèl·lules NK[317].

Finalment, en un estudi recent s'ha vist que el tractament de les cèl·lules T CD4⁺, d'individus tractats amb ART, amb combinacions de LRAs i cèl·lules T CD8⁺ autòlogues reduïa de forma consistent la freqüència de cèl·lules que contenen l'ADN viral, però no era capaç d'eliminar els reservoris que contenen virus competents[318]. Així doncs, els resultats suggereixen que les cèl·lules que contenen els virus competents en matèria de replicació (2% del reservori total[162]) tenen una resistència inherent a les cèl·lules T CD8⁺.

Totes aquestes observacions posen de manifest la importància de millorar no només el "shock", utilitzant combinacions efectives de compostos reversors de la latència, sinó també d'actuar sobre el "kill" mitjançant el desenvolupament d'estratègies que afavoreixin la proliferació i la funció de les cèl·lules citotòxiques específiques per al VIH.

Immunomoduladors

La infecció pel VIH es caracteritza per l'esgotament de les cèl·lules immunitàries, fet associat a una major expressió de molècules co-inhibidores a la superfície cel·lular[319]. L'ús de molècules inhibidores dirigides contra PD-1, CTLA-4, LAG-3, TIM-3, TIGIT i 2B4, testades en estudis de càncer presenta resultats prometedors en quan a la restauració

de la immunitat, motiu pel qual es postulen com a una opció pel tractament del VIH. Diversos estudis han demostrat que l'ús d'anticossos que bloquegen aquestes molècules promou una millora en la funció de les cèl·lules T CD4⁺ i CD8⁺ en el context d'infecció pel VIH[320, 321]. En un estudi de Fromentin et al., es va observar una disminució gradual dels nivells d'ADN viral i ARN associat a cèl·lules en un individu VIH⁺ que va ser tractat amb pembrolizumab (anti-PD-1) per al tractament d'un melanoma metastàtic[322]. Resultats similars es van obtenir en un estudi francès en el que van observar una disminució del reservori viral durant el tractament d'un càncer de pulmó amb nivolumab (anti-PD-1)[323]. No obstant això, aquest efecte no es va observar en un estudi posterior realitzats en 3 pacients tractats amb anti PD-1 en un context de malaltia similar[324].

Inductors d'apoptosi

Com s'ha comentat amb anterioritat, una de les limitacions de l'estratègia de *Shock and Kill* és la incapacitat d'eliminar les cèl·lules reactivades. És per aquest motiu que s'han desenvolupat noves estratègies per induir la mort a través de l'apoptosi o per inhibició de vies implicades en la supervivència cel·lular. Entre els compostos que tenen com a objectiu promoure la mort d'aquestes cèl·lules infectades trobem els antagonistes de Bcl-2, els inhibidores de PI3K/Akt, els mimètics de Smac, els inhibidors de XIAP i els inductors de RIG-I[325].

II. HIPÒTESI I OBJECTIUS

HIPÒTESI I OBJECTIUS

Tot i que la teràpia antiretroviral ha suposat un enorme avenç en quan a la cronificació de la infecció pel VIH-1, encara avui dia la malaltia és incurable. L'eficàcia de la TAR és indiscutible, però l'aturada del tractament es tradueix sistemàticament en un rebot de la càrrega viral plasmàtica que serà degut, principalment, a l'existència de reservoris latents que s'estableixen molt ràpidament en el moment de la infecció i que poden romandre en l'organisme llargs períodes de temps. Com s'ha desenvolupat en l'apartat anterior, s'han dissenyat diverses estratègies o aproximacions que tenen com a objectiu trobar la cura per la infecció causada pel VIH, ja sigui per una eliminació radical dels reservoris latents (cura per erradicació) o bé, pel control de la replicació en absència de tractament acompanyat d'una millora de la funcionalitat del sistema immunitari de l'hoste (cura híbrida).

Entre les estratègies plantejades actualment, es troba l'estratègia del "shock and kill", que té com a objectiu promoure una reactivació dels reservoris latents que haurà d'anar acompanyada d'una eliminació d'aquestes cèl·lules infectades. Així doncs, per a que aquest aproximació tingui èxit és necessari que es reactivin els provirus competents de les cèl·lules infectades, actuant sobre un ampli ventall de subpoblacions; provoqui efectes mínims sobre altres tipus cel·lulars evitant així possibles toxicitats *off-target*; s'estimulin mecanismes de mort en les cèl·lules infectades i s'eviti una activació global de les cèl·lules T.

Per tots aquests motius és imprescindible una bona caracterització d'aquests reservoris virals per tal de poder dissenyar estratègies dirigides a eliminar-los. A més, és imperatiu trobar nous agents reversors de latència que permetin una reactivació dels virus a nivell de cèl·lules T CD4⁺ sense tenir un efecte negatiu sobre la resta de cèl·lules del sistema immunitari, com serien les cèl·lules T CD8⁺ citotòxiques.

En base aquestes necessitats, la hipòtesi d'aquest treballar es basa en que la limitació de l'estratègia "shock and kill", sobretot la part del "shock", està relacionada amb l'efecte diferencial que tenen els compostos LRAs actuals sobre les diferents poblacions de cèl·lules T CD4⁺ que actuen com a reservori del VIH-1. Per una banda, s'hipotetitza que l'estudi de l'efecte dels LRAs actuals i de les seves combinacions en les diferents subpoblacions suposa un coneixement necessari a l'hora de desenvolupar nous compostos i de realitzar assajos clínics que tinguin com a objectiu reactivar el virus latent. Per altra banda, també s'hipotetitza que el desenvolupament de nous agents reversors, que siguin d'origen natural i que presentin una menor toxicitat i major tolerabilitat, suposa una alternativa necessària als actuals inductors del VIH-1.

Així doncs, els objectius principals de la present tesi doctoral són la posada a punt d'una nova tècnica, anomenada RNA/FISH flow, en el context de la infecció pel VIH; l'estudi i

caracterització de les subpoblacions cel·lulars que actuen com a reservori del virus i que poden respondre a l'estimulació exògena per part de diferents agents reversors de la latència fent ús d'aquesta nova tècnica; i la proposta i l'avaluació d'un compost natural, un àcid gras de cadena mitjana, com a nou inductor de la reactivació viral.

Els objectius específics de la present tesi doctoral són:

1. Posar a punt una nova tecnologia basada en la avaluació de la expressió d'ARN viral mitjançant citometria de flux en el context del VIH.
2. Caracteritzar les cèl·lules que transcriuen ARN viral en les diferents cohorts de pacients.
3. Avaluació de l'efecte dels agents reversors de latència (LRAs) actuals en les diferents subpoblacions de cèl·lules T CD4⁺. S'estudiarà la inducció tant d'ARN com de proteïna viral p24 al estimular les cèl·lules amb un sol LRA o amb la combinació de diferents famílies de LRAs.
4. Identificació i avaluació de l'àcid làuric, un àcid gras de cadena mitjana, com a nou agent reversor de la latència.

Les publicacions resultants de les investigacions i experiments realitzats sobre la caracterització dels reservoris i la seva reactivació per acció d'agents reversors de la latència seran la base que constituïran la present tesi doctoral:

- ***“A novel single-cell FISH-flow assay identifies effector memory CD4⁺ T cells as a major niche for HIV-1 transcription in HIV-infected patients”*** engloba la posada a punt de la tècnica en el context de VIH-1 i l'avaluació de l'expressió basal d'ARN viral en les diferents poblacions de cèl·lules T CD4⁺ i en les diferents cohorts de pacients. A més, posa de manifest que les cèl·lules efectores de memòria (T_{EM}) són les que suporten, principalment, la transcripció viral tant en pacients que són virèmics com en aquells que estan en tractament antiretroviral.
- ***“Latency reversal agents affect differently the latent reservoir present in distinct CD4⁺ T subpopulations”*** estudia l'efecte que tenen els agents reversors de la latència sobre cada una de les subpoblacions de cèl·lules T CD4⁺ que actuen com a reservori del VIH-1. Un dels principals problemes dels actuals LRAs es que no són capaços de reactivar totes les cèl·lules que contenen el virus integrat, així doncs, en aquest treball caracteritzem quines poblacions responen als LRAs i a les seves combinacions, i avaluem quins són els nivells de reactivació aconseguits.

Com a part experimental de la present tesi doctoral, s'ha adjuntat un tercer article que, actualment, està pendent de publicació. El treball titulat "***Metabolic reprogramming induced by Lauric Acid, a natural saturated fatty acid, reactivates latent HIV and preserves immune-mediated killing of HIV-reservoir cells***" se centra en l'avaluació de l'àcid làuric com a potencial agent reversor de la latència. El seu objectiu és validar l'eficàcia d'aquest àcid gras per reactivar el virus tant en models *in vitro* com en cèl·lules de pacients *ex vivo*, i l'efecte immunomodulador que té en la població de cèl·lules T CD8⁺. Tanmateix, és el primer estudi que proposa l'ús de l'àcid làuric com a LRAs i posa de manifest el seu potencial per ser testat en futurs assajos clínics.

Tot i que aquest últim treball està encara pendent de publicació, és considera d'un gran interès adjuntar-lo i mencionar-lo en la present tesi doctoral, ja que segueix la línia d'investigació de l'actual treball i contribueix al desenvolupament de nous compostos que puguin tenir una paper important en l'eliminació dels reservoris a través de l'estratègia de "Shock and kill".

III. RESULTATS

TREBALL 1: Una nova tecnologia basada en l'anàlisi individual de cèl·lules per citometria de flux identifica les cèl·lules T CD4⁺ efectores de memòria com el nínxol principal per a la transcripció del VIH-1 en pacients infectats pel VIH.

Títol: A Novel Single-Cell FISH-Flow Assay Identifies Effector Memory CD4⁺ T cells as a Major Niche for HIV-1 Transcription in HIV-Infected Patients

Autors: Judith Grau-Expósito,^a Carla Serra-Peinado,^a Lucia Miguel,^a Jordi Navarro,^a Adrià Curran,^a Joaquín Burgos,^a Imma Ocaña,^a Esteban Ribera,^a Ariadna Torrella,^a Bibiana Planas,^a Rosa Badía,^a Josep Castellví,^b Vicenç Falcó,^a Manuel Crespo,^{a,c} Maria J. Buzon^a.

Department of Infectious Diseases, Hospital Universitari Vall d'Hebrón, Institut de Recerca (VHIR), Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain^a; Department of Pathology, Hospital Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain^b; Unit of Infectious Diseases, Complejo Hospitalario Universitario de Vigo, IIS Galicia Sur, Vigo, Spain^c.

Objectiu: Posar a punt una nova tècnica basada en la combinació de la hibridació de sondes fluorescents (FISH) i la detecció de cèl·lules individuals per citometria de flux, en el context de VIH-1 per determinar quin tipus cel·lular suporta la transcripció viral en les diferents cohorts de pacients.

Materials i mètodes: L'assaig *Human RNA PrimeFlow*[®] (eBioscience) es va realitzar utilitzant un conjunt específic de 50 sondes d'alta sensibilitat dirigides a la seqüència d'ARNm viral Gag-Pol. La proporció de cèl·lules que expressen el VIH-ARN es va quantificar en 15 milions de PBMC de pacients infectats amb VIH, tractats i no tractats. Es va avaluar la reactivació viral després de l'estimulació de cèl·lules T CD4⁺ obtingudes de pacients amb PMA/Ionomicina. La quantificació del VIH-ADN i VIH-ARN intracel·lular es va realitzar mitjançant qPCR usant el material genètic obtingut a partir de cèl·lules T CD4⁺ purificades.

Resultats: Les cèl·lules T CD4⁺ efectores de memòria (T_{EM}) s'han identificat com la principal subpoblació que suporta la transcripció de l'ARN viral durant la infecció, tant en individus virèmics com en aquells que estan en tractament antiretroviral. En els pacients amb càrregues virals elevades, la transcripció del VIH-RNA també es va detectar en les cèl·lules de memòria central (T_{CM}). S'ha observat una correlació directa entre la proporció de cèl·lules que expressen transcrits del VIH i, la càrrega viral plasmàtica, l'ADN proviral i l'ARN viral intracel·lular mesurat per qPCR. Per contra, es va observar una correlació inversa amb recomptes absoluts de cèl·lules T CD4⁺, el percentatge de cèl·lules T CD4⁺ i la ratio CD4/CD8. A més, aquest nou assaig RNA/FISH flow ha permès detectar un augment en el nombre de cèl·lules primàries que expressen transcrits i proteïnes virals després de la reactivació viral *ex-vivo* amb un estímul activador.

Conclusions: Aquest estudi ha identificat les cèl·lules T CD4⁺ efectores de memòria (T_{EM}) com la principal font cel·lular del "reservori viral actiu" durant la infecció pel VIH tractada i no tractada. A més, aquesta tècnica pot ser útil per avaluar l'efectivitat de diferents agents reversors de la latència (LRAs) en mostres primàries de pacients infectats pel VIH.



A Novel Single-Cell FISH-Flow Assay Identifies Effector Memory CD4⁺ T cells as a Major Niche for HIV-1 Transcription in HIV-Infected Patients

Judith Grau-Expósito,^a Carla Serra-Peinado,^a Lucía Miguel,^a Jordi Navarro,^a Adrià Curran,^a Joaquin Burgos,^a Imma Ocaña,^a Esteban Ribera,^a Ariadna Torrella,^a Bibiana Planas,^a Rosa Badía,^a Josep Castellví,^b Vicenç Falcó,^a Manuel Crespo,^{a,c} Maria J. Buzon^a

Department of Infectious Diseases, Hospital Universitari Vall d'Hebrón, Institut de Recerca (HIR), Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain^a; Department of Pathology, Hospital Vall d'Hebrón, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain^b; Unit of Infectious Diseases, Complejo Hospitalario Universitario de Vigo, IIS Galicia Sur, Vigo, Spain^c

ABSTRACT Cells that actively transcribe HIV-1 have been defined as the “active viral reservoir” in HIV-infected individuals. However, important technical limitations have precluded the characterization of this specific viral reservoir during both treated and untreated HIV-1 infections. Here, we used a novel single-cell RNA fluorescence *in situ* hybridization-flow cytometry (FISH-flow) assay that requires only 15 million unfractionated peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) to characterize the specific cell subpopulations that transcribe HIV RNA in different subsets of CD4⁺ T cells. In samples from treated and untreated HIV-infected patients, effector memory CD4⁺ T cells were the main cell population supporting HIV RNA transcription. The number of cells expressing HIV correlated with the plasma viral load, intracellular HIV RNA, and proviral DNA quantified by conventional methods and inversely correlated with the CD4⁺ T cell count and the CD4/CD8 ratio. We also found that after *ex vivo* infection of unstimulated PBMCs, HIV-infected T cells upregulated the expression of CD32. In addition, this new methodology detected increased numbers of primary cells expressing viral transcripts and proteins after *ex vivo* viral reactivation with latency reversal agents. This RNA FISH-flow technique allows the identification of the specific cell subpopulations that support viral transcription in HIV-1-infected individuals and has the potential to provide important information on the mechanisms of viral pathogenesis, HIV persistence, and viral reactivation.

IMPORTANCE Persons infected with HIV-1 contain several cellular viral reservoirs that preclude the complete eradication of the viral infection. Using a novel methodology, we identified effector memory CD4⁺ T cells, immune cells preferentially located in inflamed tissues with potent activity against pathogens, as the main cells encompassing the transcriptionally active HIV-1 reservoir in patients on antiretroviral therapy. Importantly, the identification of such cells provides us with an important target for new therapies designed to target the hidden virus and thus to eliminate the virus from the human body. In addition, because of its ability to identify cells forming part of the viral reservoir, the assay used in this study represents an important new tool in the field of HIV pathogenesis and viral persistence.

KEYWORDS viral persistence, viral reactivation, viral reservoirs, human immunodeficiency virus

Received 31 May 2017 Accepted 12 June 2017 Published 11 July 2017

Citation Grau-Expósito J, Serra-Peinado C, Miguel L, Navarro J, Curran A, Burgos J, Ocaña I, Ribera E, Torrella A, Planas B, Badía R, Castellví J, Falcó V, Crespo M, Buzon MJ. 2017. A novel single-cell FISH-flow assay identifies effector memory CD4⁺ T cells as a major niche for HIV-1 transcription in HIV-infected patients. *mBio* 8:e00876-17. <https://doi.org/10.1128/mBio.00876-17>.

Editor Vinayaka R. Prasad, Albert Einstein College of Medicine

Copyright © 2017 Grau-Expósito et al. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution 4.0 International license](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Address correspondence to Maria J. Buzon, mariajose.buzon@hir.org.

HIV-1 infects mainly CD4⁺ T cells and is able to establish viral latency extremely soon after the initial viral infection (1, 2). Administration of antiretroviral therapy (ART) efficiently decreases the plasma viral load in the plasma of HIV-infected patients but does not fully eliminate HIV-1 (3). The presence of latently infected cells that are able to reinitiate new rounds of viral replication after ART withdrawal (4–6) and the existence of low-level ongoing viral replication (7), most likely in tissue reservoirs (8–10), represent the main obstacles to the complete eradication of HIV-1 from the human body.

The identification of a biomarker that exclusively identifies latently infected cells in HIV-infected patients remains a challenge. Truly latently infected cells have an integrated copy of HIV inserted within the cell genome and do not produce viral RNA transcripts and proteins; thus, infected cells harboring latent HIV can barely be distinguished from their uninfected counterparts. A new study has recently identified a potential cell marker for latently infected cells; CD32a was found to be upregulated in the latent portion of HIV-infected cells in approximately 50% of all reservoir cells (11).

The proportion of latently infected cells able to produce replication-competent virus is very small; conservative measures using the gold standard quantitative viral out-growth assay (qVOA) estimate that the fraction of this latent reservoir is about one infected cell in a million resting CD4⁺ T cells in ART-treated individuals (12, 13). The characterization of this specific viral reservoir has been hampered for years because of the extremely low percentage of latently infected cells. Detection of viral nucleic acids by PCR-based methods is an alternative approximation to identify HIV reservoir cells (14). Quantification of viral DNA is being used in current cure-related clinical trials as a marker of therapy effectiveness (15, 16). The total HIV DNA value correlates well with the qVOA assay and the integrated forms of HIV (17–19). In addition, the total HIV-1 DNA inversely correlates with the time to viral rebound after therapy interruption in patients who are treated early after infection (20, 21). Viral DNA quantification has been used to identify the cell composition of the HIV reservoir after the specific isolation of populations of interest; for instance, central memory, transitional memory, effector memory, stem cell memory, and follicular CD4⁺ T cells have been identified as the main cell subsets supporting HIV persistence in patients on ART (22–25). However, a significant disadvantage of using HIV DNA as a surrogate marker of viral reservoir cells is that most of the viral DNA is defective and consequently will never produce fully replicative viral particles (13). Another significant disadvantage of using HIV DNA detection to study the cell composition of the HIV reservoir is the requirement of previous cell isolation, making difficult the identification of reservoir cell subsets that represent a small portion of the total pool of infected cells.

Cells expressing HIV RNA encompass a subset of the total viral reservoir that contains cells actively transcribing HIV. This specific reservoir has been defined by Pasternak et al. as the “active viral reservoir” (26). Importantly, a fraction of resting CD4⁺ T cells are capable of expressing HIV RNA without the concomitant production of viral particles in both ART-treated and untreated HIV-infected patients (27–29). Cell-associated HIV RNA quantification strongly correlated with disease progression and inversely correlated with CD4⁺ T cell counts in untreated viremic patients (30–33). Indeed, unlike plasma viremia, intracellular HIV RNA levels significantly increase over time during untreated infection (31), and levels of intracellular HIV RNA have been associated with virological failure in patients on ART (26). The identification of such infected cells in both treated and untreated HIV-infected persons will provide important information regarding the characterization of cells with transcriptionally active HIV, redirecting the current efforts in the design of new therapies targeting this active viral reservoir. In addition, as HIV infection frequencies and HIV transcription levels might differ by cell type and anatomic location (34), the identification of such infected cells will allow us to determine the specific contribution of HIV to the cellular processes and functions of this active viral reservoir at different anatomical sites and possible cellular sources of residual plasma viremia and the release of viral particles after viral reactivation.

In this study, we have validated a novel RNA fluorescence *in situ* hybridization-flow cytometry (FISH-flow) technique that detects intracellular HIV RNA molecules at the single-cell level in 15 million primary unfractionated peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from HIV-infected individuals. Using this novel assay, we have characterized the cells expressing HIV RNA after *ex vivo* HIV infection of unstimulated PBMCs, in primary PBMC samples from ART-treated and untreated HIV-infected patients, and after *ex vivo* viral reactivation of primary CD4⁺ T cells. We found that in samples from HIV-infected patients, the proportion of cells carrying viral transcripts correlated very well with plasma viral loads and intracellular levels of HIV RNA measured by conventional methods and inversely correlated with the absolute numbers and percentages of CD4⁺ T cells and CD4/CD8 ratios. The majority of cells supporting HIV transcription had an effector memory CD4⁺ T cell phenotype. Moreover, we observed that after *ex vivo* infection of unstimulated PBMCs, HIV-infected T cells upregulated the expression of the newly identified marker of latently infected cells CD32. In addition, using this novel RNA FISH-flow assay, we detected reactivation of HIV from primary CD4⁺ T cell samples from patients with undetectable plasma viral loads after *ex vivo* exposure to an activating stimulus. This investigation characterized the cellular sources of active viral reservoirs and identified effector memory CD4⁺ T cells as the main subset expressing intracellular HIV RNA in both untreated and treated HIV-infected individuals. In addition, it provides a useful tool to evaluate the effectiveness of different latency reversal agents (LRAs) in different cell subpopulations.

RESULTS

Detection of HIV expression and viral protein production after *ex vivo* infection of unstimulated PBMCs. A high-sensitivity target-specific set of 50 individual probes targeting the HIV RNA Gag-Pol sequence (bases 1165 to 4402 of the HXB2 consensus genome) was used for HIV RNA detection by the RNA FISH-flow method (Human

PrimeFlow RNA Assay; eBioscience). We chose the Gag-Pol region of HIV-1 because it detects unspliced forms of viral transcripts. Importantly, cells containing unspliced HIV RNA decay very slowly after ART initiation and positive cells are successfully observed in patients on ART (35, 36).

To initially investigate the ability of the new RNA FISH-flow assay to detect HIV expression, unstimulated PBMCs from healthy donors were infected *ex vivo*. We observed consistently robust HIV RNA expression (~1% of all cells) in T cells in all *ex vivo*-infected cells from HIV-negative donors (Fig. 1A and B). Approximately 40% of these HIV RNA-expressing cells concomitantly expressed the viral Gag p24 protein and downregulated the CD4 surface marker, whereas HIV RNA-expressing cells lacking Gag p24 protein production had high CD4 expression. Thus, a majority (~60%) of the HIV-transcribing cells did not downregulate the CD4 cell receptor (Fig. 1A). Using this technique, we were able to distinguish two subpopulations of HIV-expressing cells with high and low RNA transcript levels (Fig. 1B). Cells expressing low levels of HIV transcription were not able to produce detectable viral proteins (~30% of all HIV-expressing cells). Therefore, high production of viral transcripts was needed for concomitant detection of the p24 viral protein and downregulation of the CD4 cell surface marker. Additionally, we investigated the expression of the newly discovered marker of latently infected cells, CD32, by using our system of *ex vivo* infection of unstimulated PBMCs. We observed that HIV-infected T cells expressing viral RNA and the Gag p24 protein upregulated CD32 expression (~2-fold increase), while the increase in the expression of CD32 was less intense in cells expressing only viral RNA (~1.5-fold increase). A slight increase in the proportion of cells expressing CD32 was also observed upon cell infection (~10% of all infected cells). The CD32 expression level, however, was considered low compared to that of non-T cells (Fig. 1C). We also observed the expression of HIV RNA transcripts and viral Gag p24 protein in non-T-cell populations (see Fig. S1A and B in the supplemental material). In contrast to infected T cells, most of the infected non-T cells had simultaneous expression of HIV RNA, Gag p24, and the CD4 receptor (~1%) (Fig. S1B). More phenotypic experiments are certain to further delineate the

Grau et al.

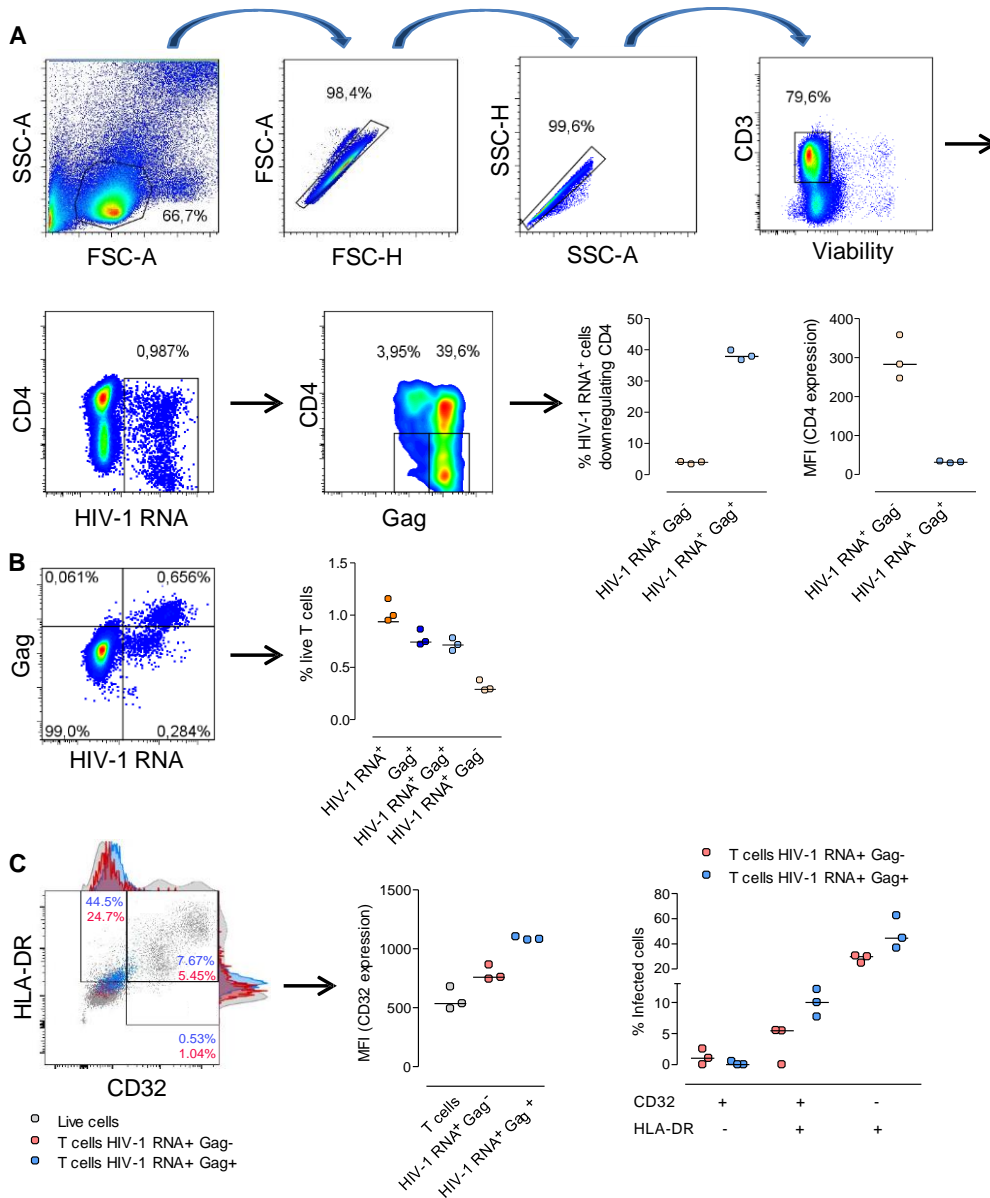


FIG 1 Detection of HIV transcripts and the viral Gag p24 protein in *ex vivo*-infected samples by the RNA FISH-flow assay. Unfractionated and unstimulated PBMCs from healthy donors were infected *ex vivo* with exogenous HIV strain NL4.3. Five days after the initial infection, cells were subjected to the RNA FISH-flow protocol. (A) The graphs on the left are representative flow cytometry plots of HIV transcript detection and CD4 downregulation in Gag p24⁺ T cells. The graphs on the right show the data summary of CD4 downregulation and the MFI (mean fluorescence intensity) of CD4 expression in cells expressing HIV RNA with and without production of the viral Gag p24 protein. (B) Left, representative flow cytometry plot of the dual staining of T cells for HIV RNA and Gag p24 protein. The graph on the right summarizes the percentages of infection of the different combinations of cells costained for detection of HIV RNA and the viral Gag p24 protein in three different infected HIV-negative donors. (C) Left, representative flow cytometry plot of CD32 and HLA-DR coexpression in HIV-infected cells. Infected cells expressing only HIV RNA (red) or expressing viral RNA and Gag p24 protein (blue) are overlaid on the whole live-cell population (gray). The graph in the center shows the MFI of CD32 expression in cells expressing only viral RNA, cells expressing HIV RNA and p24, and uninfected T cells. The graph on the right shows the percentages of infected cells expressing CD32 and the HLA-DR markers.

specific non-T-cell subpopulations supporting HIV replication or viral capture after the *ex vivo* infection of primary cells.

Next, we investigated the linearity of the assay. Latently infected J-Lat cells with detectable basal HIV expression (clone 9.2) were spiked with the noninfected lymphoid cell line MOLT-4 CCR5⁺ at different ratios (1/3 dilutions), and the mixture was then

subjected to the RNA FISH-flow protocol. HIV RNA expression determined by the experimental curve showed robust consistency with the predicted curve at all of the dilutions tested (down to 50 positive events per million cells) (Fig. S2A). Similar results were observed when the linearity assay was performed with expanded infected cells from HIV-infected individuals (Fig. S2B).

Overall, these experiments demonstrated that with a high-sensitivity set of probes against the Gag-Pol HIV RNA sequence, the RNA FISH-flow assay is a valid method for detection of HIV RNA expression and viral production after the *ex vivo* infection of unstimulated PBMCs.

Detection of CD4⁺ T cells expressing viral transcripts in samples from HIV-infected patients. Once the assay was validated with *ex vivo* HIV-infected PBMCs, we determined the percentage of HIV-expressing cells in primary samples from HIV-infected individuals. We observed that samples from HIV-negative donors had a background signal in the HIV RNA detection channel, and this unspecific staining varied between experiments. For this reason, every independent experiment included at least one uninfected donor to normalize the percentage of HIV-expressing cells. Figure S3 shows the raw HIV RNA expression data for additional HIV-infected patients with different plasma viral loads. Normalization of the data was carried out by subtracting the percentage of positive cells in the HIV RNA detection channel of the negative control from the percentage of positive cells measured in each population. After data normalization, the assay was highly reproducible between different experiments (Fig. S4A). To test the specificity and background signal of the highly sensitive set of probes used in this assay, we detected HIV RNA by confocal microscopy in a lymph node tissue sample from an acutely HIV-infected patient (patient 41; Table S1). Figure S4B shows the clear detection of HIV transcripts in tissue from an infected patient. Specifically, we observed two HIV RNA expression patterns, highly positive cells corresponding to HIV RNA-expressing cells and small punctate structures compatible with the capture of HIV virions by follicular dendritic cells as previously documented (37). Of note, HIV RNA staining was not observed in the lymph node of the HIV-uninfected control.

We next determined the percentages of HIV RNA-expressing cells in unstimulated and unfractionated PBMC samples from patients with chronic untreated HIV infection and patients on ART (< 20 copies/ml) compared to uninfected (HIV⁻) donors (patient characteristics are shown in Table S1). Representative flow cytometry strategy and raw data from different samples are shown in Fig. 2A and S3. When the percentage of CD4⁺ T cells expressing HIV RNA in 15 million PBMCs was analyzed, untreated HIV-infected patients showed statistically significantly larger proportions of cells transcribing HIV than did treated patients or healthy controls (median values of 0.0165 for untreated patients and 0.001 for treated patients) (Fig. 2B). Therefore, the frequency of cells transcribing HIV RNA from untreated patients was estimated at 165 per million CD4⁺ T cells, while in ART-treated individuals, we observed a frequency of 10 RNA-transcribing cells per million CD4⁺ T cells. These values are in agreement with previous reports (36). When we stratified the samples according to the patients' plasma viral loads, we observed that more actively transcribing cells were consistently better detected in samples with high plasma viral loads. We were able to detect HIV transcripts in two out of six samples from treated aviremic HIV-infected individuals (Fig. 2C). For instance, the normalized values of HIV RNA-expressing cells showed a strong positive correlation with plasma viral loads ($r = 0.823$, $P < 0.0001$) (Fig. 2D) and negatively correlated with absolute CD4⁺ T cell counts ($r = -0.723$, $P = 0.0001$), percentages of CD4⁺ T cells in the original samples ($r = -0.686$, $P = 0.0004$), and CD4/CD8 ratios ($r = -0.729$, $P = 0.002$) (Fig. 2E to G). When we correlated the percentage of positive cells expressing HIV RNA with viral reservoirs markers, we observed a positive correlation with total HIV DNA ($r = 0.672$, $P = 0.039$) and intracellular levels of HIV RNA measured by conventional quantitative PCR (qPCR) ($r = 0.721$, $P = 0.023$) (Fig. S5A and B). The median frequency of HIV RNA-expressing cells obtained with the RNA flow/FISH assay was 80 events per million CD4⁺ T cells, compared to 12,804 molecules for total HIV DNA

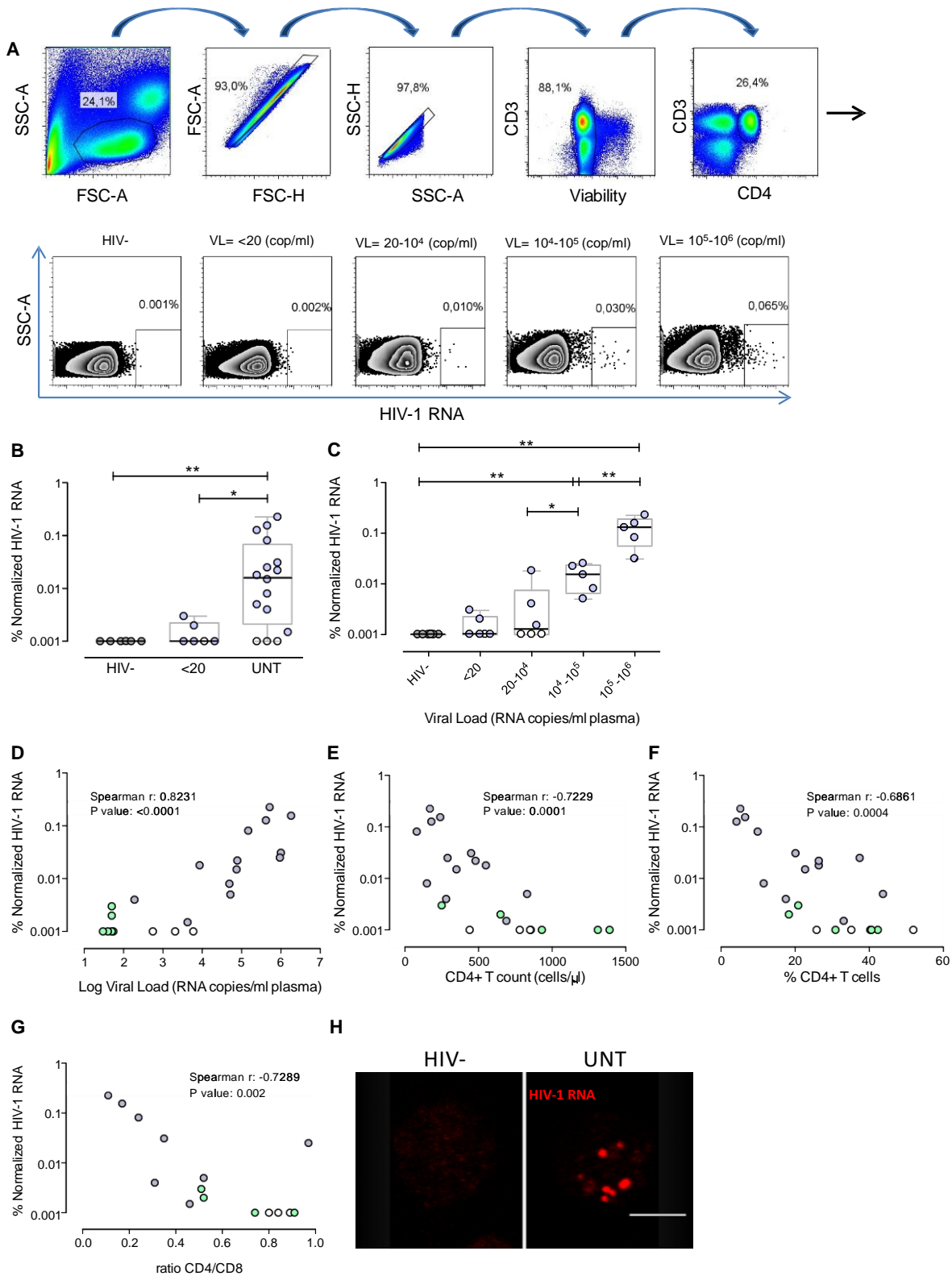


FIG 2 Detection of CD4⁺ T cells expressing HIV RNA transcripts in primary samples from HIV-infected patients. Fifteen million PBMCs from healthy donors and HIV-1-infected patients were thawed and subjected to the RNA FISH-flow protocol for viral transcript detection without any previous cell stimulation. (A) Lymphocytes were gated by using the forward and side scatter areas (FSC and SSC, respectively), and the debris was excluded from the analysis. Cell doublets then were removed from the analysis (FSC-A versus FSC-H, followed by SSC-A versus SSC-H), and live cells were (Continued on next page)

and 79,871 molecules for intracellular levels of HIV RNA per million CD4⁺ T cells measured by qPCR (Fig. S5C). In addition, when we performed the qVOA assay with samples from a separate cohort of aviremic individuals, we did not observe any correlation between the number of infectious units per million CD4⁺ T cells and the frequency of memory CD4⁺ T cells expressing HIV RNA obtained with the RNA flow/FISH assay (Fig. S5D). Overall, the RNA flow/FISH method measured approximately 3-log-fold fewer positive events than the conventional qPCR method. This difference is due to the fact that the two techniques measure different outcomes; the RNA flow/FISH method measures the percentage of HIV RNA-expressing cells, and detection of a positive event requires several RNA molecules per cell. On the contrary, the conventional qPCR method quantifies the number of RNA or DNA molecules in the whole population of CD4⁺ T cells containing both HIV-infected and uninfected cells. In this regard, confocal microscopy images of cells transcribing HIV showed numerous positive dots corresponding to HIV RNA molecules per individual cell (Fig. 2H). Additionally, in some primary PBMC samples from HIV-infected patients, we costained HIV RNA and the viral Gag p24 protein. Dual positive cell events were absent or very rarely detected in any population analyzed (data not shown). The assay of insufficient cell numbers might explain the failure to detect infected cells harboring both viral markers. Overall, this novel assay detects actively HIV RNA-transcribing cells in primary samples from infected individuals, and importantly, levels of cells expressing HIV RNA correlate very well with different markers of disease progression and intracellular levels of HIV RNA measured by conventional qPCR.

Identification of CD4⁺ T cell subpopulations expressing HIV-1 RNA transcripts after *ex vivo* infection of unstimulated PBMCs. We then assessed the presence of HIV RNA transcripts in different CD4⁺ T cell subsets after *ex vivo* infection of unstimulated and unfractionated PBMCs from healthy donors. Cells were first infected with an exogenous virus and then stained with antibodies specific for the markers CD3, CD4, CD45RO, and CCR7 to identify different subpopulations of CD4⁺ T cells. The percentages of HIV RNA-positive cells within the naive (T_{NA}), central memory (T_{CM}), effector memory (T_{EM}), and terminally differentiated (T_{TD}) CD4⁺ T cell subsets of a representative *ex vivo* infection experiment are shown in Fig. 3A. The expression of HIV RNA transcripts was observed mainly in T memory cells (~0.2% of the total cell population) (Fig. 3A). Specifically, the majority of cells supporting HIV transcription had a T_{EM} CD4⁺ T cell phenotype and represented > 50% of all infected cells (Fig. 3B). The percentage of T_{EM} cells expressing HIV RNA was higher than in the whole T cell (T_{CD3}) population (median proportion of positive cells of 0.35 for T_{EM} cells and 0.24 for CD3⁺ T cells) (Fig. 3B), indicating an enrichment of the subpopulation that supports most active transcription of HIV (1.38-fold enrichment in T_{EM} cells compared to T_{CD3} cells). Moreover, infected cell subpopulations only partially downregulated the CD4 cell receptor upon infection, with the T_{EM} subset being the subpopulation sustaining greater down-regulation of the CD4 marker (~40% of all T_{EM}-infected cells) (Fig. 3C).

Phenotypic characterization of CD4⁺ T cells expressing HIV-1 RNA transcripts in primary samples from HIV-infected patients. After the successful identification of

FIG 2 Legend (Continued)

selected by live/dead staining. HIV RNA expression was identified in viable CD4⁺ T cells. Shown are representative flow cytometry plots of HIV RNA detection in CD4⁺ T cells from a uninfected person (HIV⁻), an ART-treated patient (plasma viral load [VL] = < 20 copies [cop]/ml), and untreated (UNT) patients with different plasma VLs. (B) Summary data of normalized HIV RNA⁺ frequency in CD4⁺ T cells in uninfected controls (HIV⁻; n = 6), patients treated with ART (plasma VL of < 20 copies/ml; n = 6), and untreated patients (n = 16). (C) Frequency of HIV RNA detection stratified by plasma VLs. (D) Correlation of HIV RNA⁺ cells and plasma VLs. (E) Correlation of percent HIV RNA⁺ cells and absolute numbers of CD4⁺ T cells in blood. (F) Correlation of percent HIV RNA⁺ cells and percent CD4⁺ T cells determined by flow cytometry. (G) Correlation of percent HIV RNA⁺ cells and the CD4/CD8 ratio. (H) Representative micrographs obtained by confocal microscopy of cells from an HIV-negative donor (left) and an untreated HIV-infected patient (right) after the RNA FISH-flow protocol. Staining of HIV RNA transcripts is red. All HIV RNA⁺ percentages were normalized to those of uninfected donors (obtained by background subtraction) for each independent experiment. White symbols correspond to values below the limit of detection. In panels D to G, values for untreated patients are represented by gray symbols and values for treated patients are represented by green symbols. *, P < 0.05; **, P < 0.01 (Mann-Whitney test). Spearman's nonparametric correlation coefficients and associated P values are shown. Data for patients 1 to 6 and 25 to 40 are shown in panels B to F; data for patients 1 to 6, 28 to 33, and 36 to 39 are shown in panel G; and data for patient 26 are shown in panel H (Table S1).

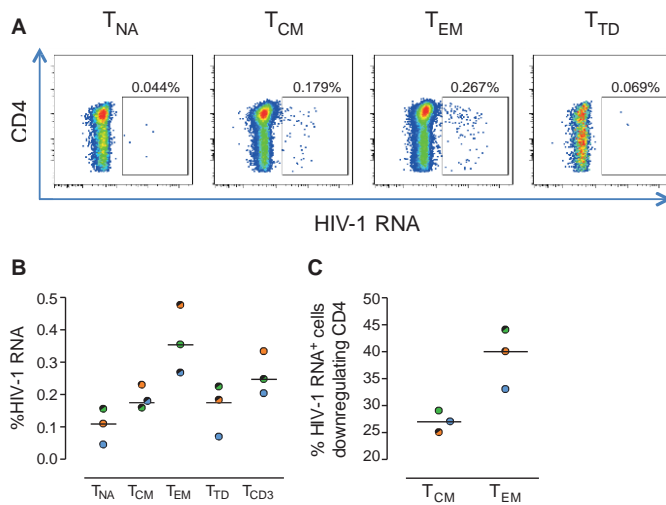


FIG 3 Detection of HIV RNA transcripts in different subsets of CD4⁺ T cells after *ex vivo* infection of PBMCs. Unfractionated and unstimulated PBMCs from healthy donors were infected *ex vivo* with exogenous HIV. Cells were subjected to the RNA FISH-flow protocol 5 days after infection. (A) Representative flow cytometry plots of HIV RNA-expressing cells in different subsets of CD4⁺ T cells (T_{NA} , T_{CM} , T_{EM} , and T_{TD}). (B) Quantification of HIV RNA⁺ cells in the different CD4⁺ T cell subsets of three different infected HIV-negative donors. (C) Percentages of HIV-expressing T_{EM} and T_{CM} cells that downregulate the CD4 receptor upon infection.

the CD4⁺ T cell subpopulations transcribing HIV in *ex vivo*-infected samples, we sought to phenotypically characterize the subsets of CD4⁺ T cells that support HIV transcription *in vivo*. Fifteen million unfractionated and unstimulated PBMCs from untreated HIV-infected patients were subjected to the RNA FISH-flow assay to determine the frequency of HIV RNA-expressing cells. A representative gating strategy used to identify T cell subsets in an HIV-infected patient is shown in Fig. S6A. We observed greater proportions of HIV-transcribing cells in all of the subsets assayed than in uninfected controls, except naive T cells (median values: T_{NA} , 0; T_{CM} , 0.02; T_{EM} , 0.095; T_{TD} , 0.014) (Fig. 4A). Consistent with the *ex vivo* infection experiments, the T_{EM} subset was dominant among the HIV RNA-expressing cells and the proportion of cells expressing HIV was greater in T_{EM} cells than in all other CD4⁺ T cell subsets (fold increases in T_{EM} versus other subsets: 124.7 for T_{NA} , 24.8 for T_{CM} , 108.44 for T_{TD}) (Fig. 4B). In addition, HIV RNA-expressing cells were detected significantly more often within the T_{EM} subset in samples from aviremic treated HIV-infected patients than in uninfected control samples (Fig. 4C). Moreover, the percentage of T_{EM} cells expressing viral transcripts was also higher than that of the other assayed CD4⁺ T cell subsets. We next assessed the correlation of HIV RNA-expressing cells in the different T cell subsets by using plasma viral loads and CD4⁺ T cell counts as progression markers. There was a positive correlation between the plasma viral loads and the percentages of T_{CM} and T_{EM} HIV RNA-expressing cells, although a more robust correlation was observed for T_{EM} cells ($r = 0.7887$, $P < 0.0001$) (Fig. 4E). In contrast, we observed a strong inverse correlation between HIV-expressing T_{EM} cell and CD4⁺ T cell counts ($r = -0.652$, $P = 0.0007$) (Fig. 4D), similar to what was observed in the entire CD4⁺ T cell compartment (Fig. 2D). Additionally, after the identification of CD32 as a marker of latently infected cells (11), we wanted to investigate if cells expressing HIV in samples from aviremic patients were also expressing the CD32 marker. We observed that cells expressing the CD32 receptor represented only a small proportion of the total CD4⁺ T cells (median, 0.063; inter-quartile range, 0.060 to 0.104). Only one of the patients analyzed contained HIV RNA-expressing cells in this population of cells (Fig. 4E). Taken together, these results indicate that we successfully detected different subpopulations of cells expressing HIV RNA with the flow RNA FISH protocol. Moreover, we observed that the effector memory

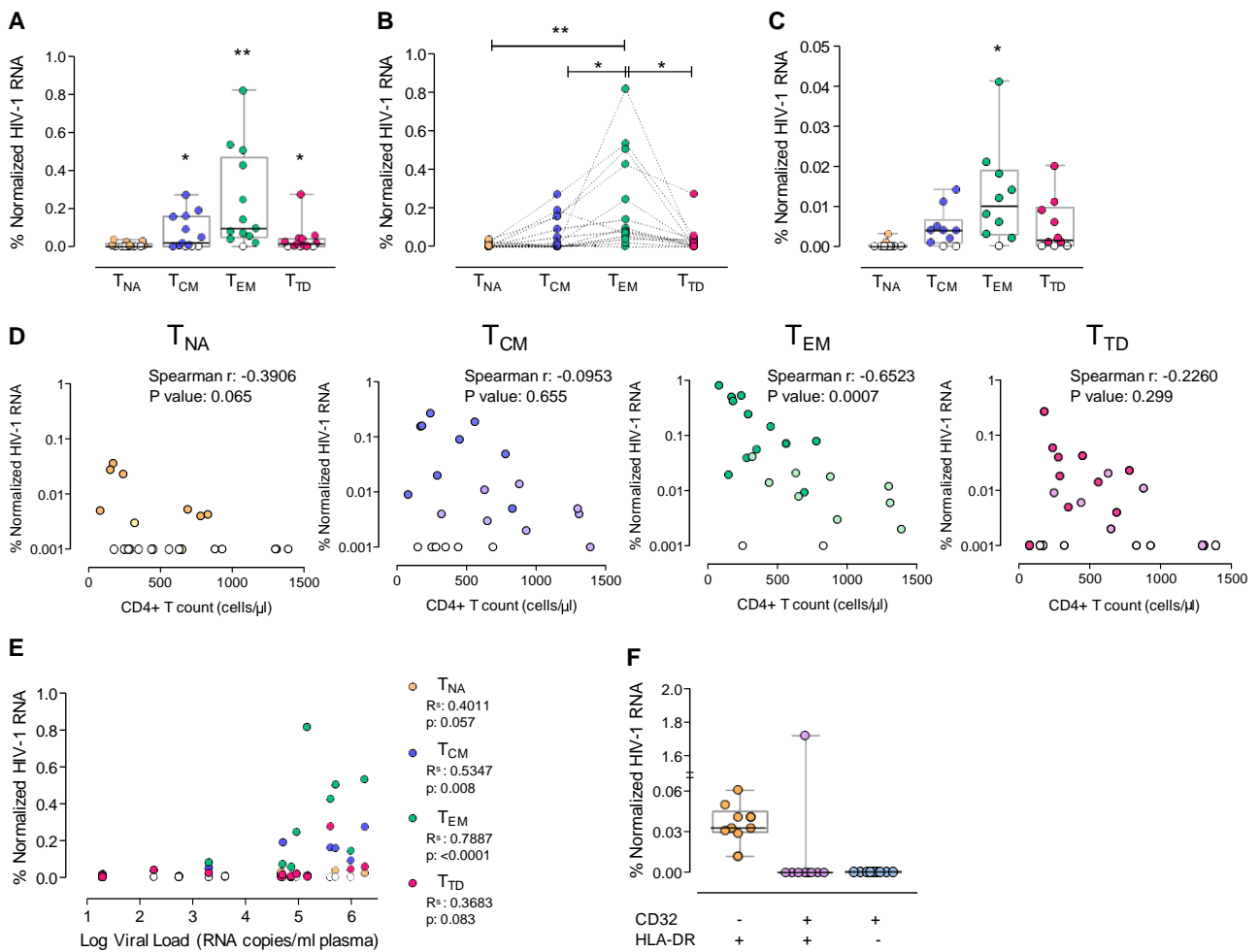


FIG 4 Identification of CD4⁺ T cell subsets supporting HIV expression in primary samples from HIV-infected patients. Fifteen million unfractionated and unstimulated PBMCs from HIV-infected patients were subjected to the RNA FISH-flow protocol for viral transcript detection in the different CD4⁺ T cell subsets (T_{NA}, T_{CM}, T_{EM}, and T_{TD}). (A) Frequencies of HIV RNA-expressing cells in different CD4⁺ T cell subpopulations of untreated patients (*n* = 13). The frequency of viral transcription in each subpopulation was compared with that of the HIV-negative control by using the Mann-Whitney test. (B) Paired comparison of HIV RNA⁺ cells in CD4⁺ T cell subsets of untreated patients (*n* = 13). The statistical values shown were obtained with the Wilcoxon signed-rank test with corrected *P* values for multiple comparisons. (C) Frequency of HIV RNA-expressing cells in CD4⁺ T cell subsets of treated patients with undetectable plasma viral loads (*n* = 10). (D) Spearman correlation of HIV RNA frequency in the different CD4⁺ T cell subpopulations and the absolute CD4⁺ T cell counts (*n* = 23). (E) Spearman correlation between plasma viral loads and the percentages of CD4⁺ T cells expressing HIV RNA in different subsets (*n* = 23). For all correlations, white symbols represent values below the limit of detection, symbols representing values for untreated patients are in dark colors, and symbols representing values for treated patients are in pale colors. (F) Frequencies of HIV RNA-expressing cells in CD4⁺ T cells expressing CD32 and HLA-DR. All normalized values were obtained after subtracting the corresponding background signal observed in the HIV-negative control. *, *P* < 0.05; **, *P* < 0.01. Data for patients 28 to 40 (Table S1) are shown in panels A and B; those for patients 1 to 6, 10, and 13 to 15 are shown in panel C; those for patients 1 to 6, 10, 13 to 15, and 28 to 40 are shown in panels D and E and those for patients 7, 10, 11, 16 to 20, and 24 are shown in panel F.

T cell subset was largely responsible for the production of HIV RNA in CD4⁺ T cells in both treated and untreated HIV-infected patients.

Detection of viral reactivation in primary CD4⁺ T cells from ART-treated HIV-infected patients. Finally, we assessed the ability of this assay to detect HIV RNA transcripts and the Gag p24 viral protein from previously isolated CD4⁺ T cells after *ex vivo* viral reactivation. We evaluated primary samples from treated aviremic infected patients and assessed the capacity of a strong non-HIV-specific activating stimulus (phorbol 12-myristate 13-acetate [PMA]–ionomycin [Iono]) and romidepsin, a histone deacetylase inhibitor, to induce the transcription and translation of HIV. A representative flow cytometry plot is shown in Fig. 5A. Overall, we observed an increase in the percentage of cells expressing HIV RNA upon cell activation with PMA-Iono compared with the corresponding control (5.53-fold change), and upon cell activation with

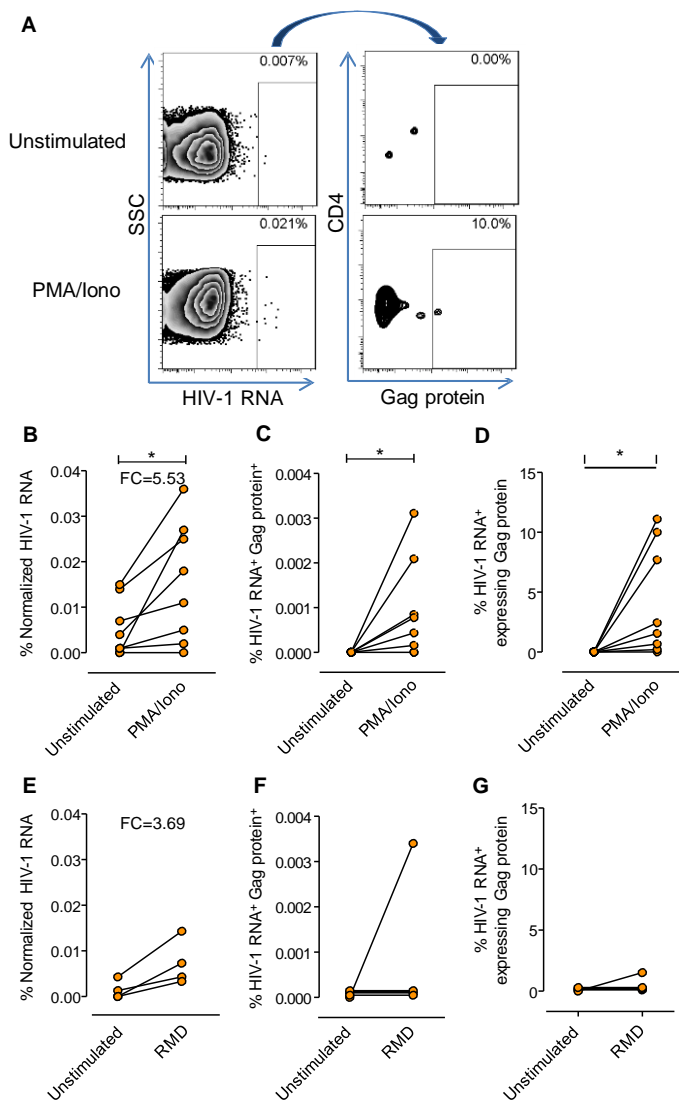


FIG 5 Detection of HIV-1 RNA and Gag p24 protein in primary CD4⁺ T cells from HIV-infected patients after *ex vivo* reactivation. CD4⁺ T cells from treated HIV-infected patients were isolated with magnetic beads. Expression of HIV RNA and the viral Gag p24 protein was detected by the RNA FISH-flow technique after 13 h of reactivation with PMA-Iono or 24 h of reactivation with romidepsin. (A) Representative flow cytometry plots of cells from a treated patient before and after viral reactivation with PMA-Iono. Live cells were identified, and single HIV RNA-expressing cells gated against side scatter (SSC) are shown on the left. Percentages of HIV RNA⁺ cells that were Gag p24⁺ are shown on the right. (B, C) Comparisons of HIV-1 RNA⁺ single cells after viral reactivation with PMA-Iono (B) and HIV-1 RNA⁺ Gag⁺ doubly positive cell frequencies before and after viral reactivation (PMA-Iono) (C). (D) Frequencies of HIV-1 RNA⁺ single cells expressing Gag⁺ before and after stimulation with PMA-Iono. (E) Comparison of HIV-1 RNA⁺ single cells after viral activation with romidepsin. (F, G) Comparisons of HIV-1 RNA⁺ single cells after viral reactivation with romidepsin (F) and doubly positive cells HIV-1 RNA⁺ Gag⁺ frequencies before and after viral reactivation (romidepsin) (G). Cells from nine patients were treated with PMA-Iono (patients 5 and 7 to 13 are shown in panels B to D), and cells from four patients were treated with romidepsin (RMD) (patients 7 and 21 to 23 are shown in panels E to G). *, $P < 0.05$ (paired nonparametric *t* test). FC, fold change.

romidepsin, four out of four patients showed increasing proportions of HIV RNA-expressing cells (3.69-fold change) (Fig. 5B and E). The median numbers of RNA-positive cells per million CD4⁺ T cells before and after viral reactivation were 20 and 145 for PMA-Iono and 6 and 58 for romidepsin, respectively. Moreover, the expression of cells doubly positive for HIV RNA and Gag p24 rose significantly when cells were stimulated with PMA-Iono, with an estimated median of six cells with inducible HIV per million

CD4⁺ T cells (Fig. 5C). For romidepsin, we observed positive p24 events in only one patient (Fig. 5F). Of note, the range of dually positive cells was highly dependent on the patient. Also, when we analyzed the percentage of cells transcribing HIV RNA that also translated Gag p24 after stimulation with PMA-Iono, we observed a significant increase in the numbers of HIV RNA⁺ cells concomitantly expressing HIV proteins. However, the degree of expression was also highly variable between different patients and was observed only for PMA-Iono (Fig. 5D). For romidepsin, however, this increase was very modest and was observed in only one patient (Fig. 5G). Thus, this assay could be used to evaluate the effectiveness of different LRAs in reversing the latent state of the HIV reservoir in different cell populations.

DISCUSSION

Identification of the HIV-1 cell reservoirs that exist in HIV-infected patients will significantly advance the design of new targeted therapies aimed at curing HIV. In this regard, the identification and characterization of active viral reservoirs, defined as infected cells with transcriptionally active HIV, have been limited by an inability to isolate the required amount of cells for accurate quantification of viral transcription. In this investigation, we used a new RNA FISH-flow assay for the identification of HIV-infected cells that express viral transcripts both after *ex vivo* infection and in primary samples from HIV-infected patients. In addition, we used this novel method to assess viral reactivation in primary CD4⁺ T cells from HIV-infected patients after *ex vivo* exposure to an activating stimulus.

Using this novel assay that measures transcriptionally competent HIV-infected cells, we found that after *ex vivo* infection of unstimulated PBMCs, HIV transcription was significantly detected in T cells and production of viral proteins correlated well with the downregulation of the CD4 cell receptor. This finding is in agreement with previously published data showing that different viral proteins are responsible for the downregulation of CD4 on the surface of the infected cell (38, 39) and higher levels of HIV RNA expression are required for productive infection (40, 41). Importantly, we also observed that non-T cells expressed HIV transcripts and viral proteins and most of these non-T cells expressed the CD4 receptor. In this investigation, we have not fully identified these non-T-cell populations harboring both HIV RNA and the Gag p24 protein, although viral capture by dendritic cells and viral replication in monocytes would be a possible explanation for the present results (42, 43). More precise phenotypic studies are needed to fully identify the non-T-cell populations supporting HIV transcription and translation after *ex vivo* infection.

Using the RNA flow/FISH protocol, we found that the majority of HIV RNA-positive cells in primary samples from infected patients were detected in CD4⁺ T cells and we were not able to observe significant detection of HIV transcripts in the CD4⁻ T cell population. This result is consistent with previous reports where CD4⁺ T cells were enriched in unspliced viral transcripts compared to T cells that downregulated the CD4 receptor (44). Moreover, in treated patients, HIV RNA in blood and tissue was highly concentrated in the CD4⁺ population compared to non-CD4⁺ T cells (45). In addition, T cells that downregulate the CD4 receptor support the greatest production of viral particles; thus, higher rates of cell death in this infected population during the experimental protocol might also account for our results (46). In agreement with the lack of significant detection of HIV RNA in CD4⁻ T cells, we did not detect cells expressing both viral RNA and the viral Gag p24 protein in samples from HIV-infected patients without previous cell stimulation. In addition to cell death, the assay of insufficient cell numbers may explain the lack of detection of dually stained cell populations.

Frequencies of CD4⁺ T cells expressing HIV transcripts in samples from HIV-infected patients measured by this novel method had a median of 10 positive cells per million CD4⁺ T cells in aviremic patients and 165 positive cells per million CD4⁺ T cells in viremic untreated individuals. These data fully agree with previous studies (29, 36). Importantly, these frequencies correlated very well with different markers of disease progression such as plasma viral loads, CD4⁺ T cell counts, and CD4/CD8 ratios. Our

data agree with previously published data showing that intracellular HIV RNA quantification strongly correlated with disease progression and inversely correlated with CD4⁺ T cell counts in untreated viremic patients (30–33). Previous reports have shown that during the chronic phase of infection, intracellular levels of HIV RNA range between 3- and 4-log magnitudes of molecules per million unfractionated PBMCs (31); however, after ART initiation, the levels of cell-associated HIV RNA only decline about 1 to 2 logs (47, 48) and positively correlate with the total viral reservoir measured by total HIV DNA quantification (49). When we performed a direct comparison of the quantitative values obtained by conventional methods of intracellular viral nucleic acids and the percentage of positive cells measured by the RNA FISH-flow technique, we observed a direct significant correlation between the two methods; however, our novel method quantified 3-log-fold lower values than the RNA molecule levels in CD4⁺ T cells quantified by qPCR and 2-log-fold lower values than the number of DNA molecules per million CD4⁺ T cells measured by conventional methods. The impossibility of measuring the exact numbers of HIV RNA and DNA molecules in a single cell by qPCR makes this comparison biased, since detection of positive events by the RNA FISH-flow technique most likely requires the presence of several HIV RNA molecules, as we have observed in our micrographs. In this regard, previous reports showed that productively HIV-infected cells contained ~300 HIV RNA copies per cell (35, 50, 51). Moreover, the lower sensitivity of the RNA FISH-flow method than the PCR-based method might also explain part of these differences. When we compared the proportions of memory CD4⁺ T cells expressing HIV RNA calculated by the RNA FISH-flow assay and the qVOA, we did not observe any correlation. The proportion of viral RNA-expressing cells not able to produce fully replicative virions might be responsible for this result. In the same line, intracellular HIV RNA quantification by qPCR has correlated poorly with qVOA results in previous studies (17, 18).

In treated aviremic patients, the identification of the cellular sources of HIV transcripts is of particular importance since this information will directly identify the specific cell subpopulations supporting HIV persistence. HIV transcripts can be found in latently infected cells that do not produce viral particles, in productive infection of new cells, or in cells reactivated from latency with productive production of viral particles (26). To date, the precise composition of the cellular subpopulations that support this active viral reservoir in HIV-infected patients is largely unknown. We identified the effector memory CD4⁺ T cell subpopulation as the main subset of cells expressing HIV during both untreated and treated infections. In this regard, the detection of infected cells in the fraction of PBMCs could be an intrinsic limitation of our study, since central memory T cells recirculate constitutively between secondary lymphoid organs and blood and effector memory T cells circulate through blood and home to inflamed tissue (52). Thus, not all of the cell subsets analyzed in this study are continuously present in peripheral blood. Of note, identification of effector memory CD4⁺ T cells was carried out by using the phenotypic markers CD45RO and CCR7, and therefore, this population can also contain cells with a transitional memory phenotype (53).

In agreement with our data, previous studies identified effector memory cells as the main subset supporting HIV transcription in both peripheral blood and ileum and rectum tissue samples from ART-treated patients (45). On the basis of HIV DNA quantification, T_{EM} cells were also identified as one of the main subsets harboring total and integrated HIV DNA (22, 23, 25). Follicular helper T cells have been recently identified as one of the main cell subsets that support the replication, transcription, and production of HIV-1 (24). Although we did not perform a detailed investigation of that specific cell subpopulation in this study, we present our method as a promising tool for the identification of transcriptionally active HIV in cell subpopulations, including follicular helper T cells, from different tissue samples.

A new biomarker of latently infected cells has recently been described. Descours et al. reported that the immunoglobulin G Fc fragment CD32a was exclusively induced in quiescent infected cells. Productive infection of stimulated CD4⁺ T cells was not associated with significant CD32a expression, compared to that in resting CD4⁺ T cells

(11). Thus, we also explored the expression of CD32 in cells transcribing HIV *in vitro* and *in vivo* by our newly described method. We found that after *ex vivo* infection of unstimulated PBMCs, infected cells concomitantly upregulated the expression of CD32 and the activation marker HLA-DR; productively infected cells expressing HIV RNA and Gag protein upregulated both markers to a greater degree (2-fold increase) than cells transcribing only HIV RNA (1.5-fold increase). Moreover, the proportion of cells expressing CD32 also increased. On the basis of these results, we concluded that productive HIV infection upregulates the expression of CD32. Levels of CD32 were very modest compared to those of non-T cells. Of note, with our system, we cannot compare these levels to those expressed in latently infected cells. The discrepancy between the study of Descours et al. and our results may be due to the fact that Descours et al. stimulated their PBMCs before productive infection, while we performed infections without any previous cell stimulation. In addition, Descours et al. focused their analysis on the HLA-DR⁺ cell population. Further studies are certain to fully elucidate the role of CD32 in HIV infection and latency.

HIV RNA transcription is a useful tool with which to assess the effect of LRAs in new therapeutic approximations aimed at curing HIV. LRAs are being used in clinical trials to reactivate HIV from its dormant state. However, clinical studies have shown only a modest reduction of the latent HIV reservoir after LRA administration (15, 16, 54). As LRAs may not work equally in all infected cell subpopulations, new methods to assess the effectiveness of LRAs *in vitro* are highly desirable. Previous reports have shown the ability of the RNA FISH-flow assay to detect viral reactivation in primary samples and cell lines (55, 56). Here, we used our method to detect viral reactivation in primary infected CD4⁺ T cells after the *ex vivo* administration of an activating stimulus. In samples from treated HIV-infected patients, romidepsin significantly increased the percentage of cells expressing HIV RNA; however, we were not able to detect a significant production of viral proteins. This result is consistent with previously reported studies where romidepsin alone failed to induce robust production of viral particles (57, 58). However, upon cell stimulation with PMA-Iono, significant percentages of cells expressing HIV and viral proteins were successfully detected. HIV RNA expression increased very modestly upon viral reactivation. The fact that we focused our analysis on cells with high expression of HIV RNA to avoid an increased background might account for this result. Importantly, and in agreement with our data, previous reports have shown that the number of unspliced HIV RNA molecules per cell during different stages of viral production varies only slightly; transcription of unspliced HIV RNA per cell was unaffected by treatment status and ongoing viral replication (35, 36). Using this method, we estimated that the median size of the inducible reservoir, defined as cells able to express viral RNA and the Gag p24 protein upon cell activation, was six per million CD4⁺ T cells. This number is higher than previously reported frequencies of latently infected cells measured by the gold standard qVOA assay (12, 13). However, we are not able to exclusively detect the fraction of cells with replication-competent virus. Our estimated size of the inducible reservoir is, however, smaller than that predicted by the *tat/rev*-induced limiting-dilution assay, which accounts for the fraction of cells with transcriptionally active HIV-1 (29). How our novel method correlates with previously reported assays designed to measure the size of the latent reservoir deserves a more detailed investigation; in-depth comparison with the same samples will be indispensable to fully estimate the ability of the RNA flow/FISH assay to accurately measure the size of the HIV-1 reservoir.

An assay that detects translation-competent HIV-infected cells on the basis of the same technology has been recently reported (56). Baxter et al. simultaneously detected both HIV RNA and the viral Gag p24 protein in primary HIV-infected samples. However, a very high background signal level in the HIV RNA channel precluded the use of the assay to identify the fraction of transcriptionally competent HIV-infected cells. In our study, however, the use of a high-sensitivity set of 50 probes that recognize the Gag-Pol sequence of the HXB2 consensus genome with a minimized background signal and subtraction of the nonspecific background from the quantification of HIV RNA-

expressing cells allowed us, for the first time, to detect significant differences in the levels of HIV RNA-expressing cells in different cohorts of HIV-infected patients.

Overall, in this study we have found that effector memory CD4⁺ T cells are an important niche for HIV transcription *in vivo*. The identification of transcriptionally active HIV-infected cells will provide important information on the specific cellular and anatomical sources of residual viremia, the contribution of HIV to viral pathogenesis, and the specific cellular reservoirs that persist in ART-treated individuals. In addition, this novel method detects viral reactivation in primary CD4⁺ T samples, providing a useful tool with which to evaluate the effectiveness of different LRAs in different cell subpopulations.

MATERIALS AND METHODS

Ethics statement. PBMCs from HIV-1-infected patients were obtained from the HIV unit of the Hospital Universitari Vall d'Hebron in Barcelona, Spain. Written informed consent was provided by all of the patients who participated in this study, and the protocols used were approved by the Comité d'Ètica d'Investigació Clínica (Institutional Review Board numbers 39-2016 and 196-2015) of the Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Spain. Samples were obtained only from adults, who all provided written informed consent, and the samples were prospectively collected and cryopreserved in the Biobanc (register number C.0003590). All samples received were totally anonymous and untraceable. The J-Lat cell line and the T-lymphoblastoid MOLT-4 CCR5⁺ cell line were obtained from the NIH AIDS Reagent Program.

Study samples. Samples from HIV-1-infected patients with CD4⁺ T cell counts of > 100/mm³ in the HIV unit of the Hospital Universitari Vall d'Hebron in Barcelona, Spain, were included in this study. Information on plasma viral loads, CD4⁺ T cell counts, and time on ART for treated patients is summarized in Table S1.

Cells and virus. PBMCs were obtained from HIV-1-infected patients by Ficoll-Paque density gradient centrifugation and cryopreserved in liquid nitrogen. PBMCs from healthy donors were obtained anonymously from the BST (Banc de Sang I Teixits, Barcelona, Spain) and isolated as described above.

The human latently infected cell line J-Lat (clone 9.2) was obtained through the NIH AIDS Reagent Program from Eric Verdin (59); grown in RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Gibco, Life Technologies, Inc.), 100 U/ml penicillin, and 100 µg/ml streptomycin (Life Technologies, Inc.); and maintained at 37°C in a 5% CO₂ incubator. The T-lymphoblastoid MOLT-4 CCR5⁺ cell line (obtained through the NIH AIDS Reagent Program from Masanori Baba, Hiroshi Miyake, and Yuji Iizawa) (60) was cultured in R10 (RPMI medium with 10% FBS) containing 1 mg/ml G-418.

The plasmid encoding HIV-1 strain NL4.3 (pNL4.3) was obtained through the NIH AIDS Reagent Program from Malcolm Martin. Viral stocks were generated by transfection of 293T cells with pNL4.3, and the resulting viral particles were titrated in TZMbl cells by enzyme luminescence assay (britelite plus kit; PerkinElmer) as described previously (61).

Ex vivo infection of unstimulated PBMCs. PBMCs from healthy donors were quickly thawed and incubated overnight in R10 with 100 µg/ml streptomycin, 100 U/ml penicillin, and 40 U/ml interleukin-2 (IL-2). On the next day, PBMCs were infected (350,000 50% tissue culture infective doses/million cells) with the NL4.3 viral strain for 4 h at 37°C and 5% CO₂. Following the initial infection, the cells were thoroughly washed and cultured in six-well plates in R10 plus 100 U/ml IL-2 for an additional 5 days to expand the viral infection. The cells were then subjected to the RNA FISH-flow protocol as described below.

Detection of single cells expressing HIV-1 RNA transcripts by the RNA FISH-flow assay. The RNA FISH-flow assay for detection of HIV transcripts was performed in accordance with the manufacturer's instructions (Human PrimeFlow RNA Assay; EBioscience), with some modifications. Briefly, 15 million PBMCs were stained with antibodies to cell surface markers (20 min at room temperature [RT]; CCR7, 30 min at 37°C) and violet viability dye (20 min at RT). Cells were then fixed, permeabilized, and intracellularly stained for detection of the viral p24 protein when required (60 min at 4°C). After an additional fixation step, cells were ready for 3 h of hybridization at 40 + 1°C with a high-sensitivity target-specific set of 50 probes spanning the whole Gag-Pol HIV mRNA sequence (bases 1165 to 4402 of the HXB2 consensus genome). The cells were then subjected to different amplification steps (sequential 2-h incubations at 40°C with the preamplification and amplification mixtures). Finally, multiple label probes were hybridized with the specific amplifiers (1 h at 40°C). Negative controls were included in all experiments with cells from non-HIV-infected donors. The normalized percentage of HIV RNA expression was calculated for each subpopulation by subtracting the mean value obtained from the negative control from the signal obtained with the real sample. All samples were run on an LSR Fortessa four-laser flow cytometer (Becton, Dickinson).

Antibody panel. To identify the different CD4⁺ T cell subpopulations expressing HIV RNA, PBMCs were stained for cell surface markers with CD4 (AF700; BD), CD3 (phycoerythrin [PE]-Cy7; BD), CCR7 (PE; BD), and CD45RO (BV605; BioLegend) antibodies. The CD4⁺ T cell subset phenotypes were identified as follows: T_{NA}, CD3⁺ CD4⁺ CCR7⁺ CD45RO⁻; T_{CM}, CD3⁺ CD4⁺ CCR7⁺ CD45RO⁺; T_{EM}, CD3⁺ CD4⁺ CCR7⁻ CD45RO⁺; T_{TD}, CD3⁺ CD4⁺ CCR7⁻ CD45RO⁻. For detection of CD32 after *ex vivo* infection, we used CD4 (AF700; BD), CD3 (PE-Cy5; BD), p24 (PE; Beckman Coulter, Inc.), CD32 (PE-Cy7; BioLegend), and HLA-DR (fluorescein isothiocyanate; BioLegend) antibodies. For detection of CD32 in samples from HIV-infected patients, we used CD4 (AF700; BD), CD3 (PE-Cy5; BioLegend), CD45RO (BV605; BioLegend), CD32 (PE-Cy7;

BioLegend), and HLA-DR (PE BioLegend) antibodies. The expression of HIV RNA transcripts was analyzed with target-specific AF647-labeled probes, and expression of the viral Gag p24 protein was detected with a PE-conjugated anti-p24 antibody (clone KC57 RD1; Beckman Coulter, Inc.). Cell viability was determined with a violet viability dye for flow cytometry (LIVE/DEAD Fixable Violet Dead Cell Stain kit; Invitrogen).

Linearity of the RNA FISH-flow assay. To test the linearity of the assay, latently infected Jurkat (J-Lat clone 9.2) cells were spiked with the T-lymphoblastoid MOLT-4 CCR5+ cell line at four different ratios (1/3 serial dilutions). Samples were then subjected to the RNA FISH-flow assay. The predictive curve was determined by the basal expression of green fluorescent protein within the J-Lat cells and the subsequent theoretical values of the serial dilutions. The infection rate (experimental curve of percent HIV RNA+ cells) was calculated by using the values obtained with the RNA FISH-flow assay. Linear regression was computed to determine the linearity of the relationship between the predicted and experimental values of the assay. The linearity of the assay was also measured after expanding the infection of primary CD4+ T cells from HIV-infected patients. We used the same protocol described for the qVOA assay, and the positive wells were mixed up and diluted into uninfected cells at six different ratios. The predictive curve was determined by the basal expression of p24 and the subsequent theoretical values of the serial dilutions.

Ex vivo viral reactivation of primary CD4+ T cells. Primary CD4+ T lymphocytes from PBMCs of HIV-infected patients were purified by negative selection in accordance with the instructions provided by the manufacturer (MagniSort Human CD4+ T Cell Enrichment; Affymetrix). Isolated CD4+ T cells (purity routinely > 95%) were cultured in complete RPMI medium supplemented with 10% FBS, 100 µg/ml streptomycin, and 100 U/ml penicillin alone or stimulated with PMA (50 ng/ml; Abcam, Inc.) and Iono (0.5 µg/ml, Abcam, Inc.) for 13 h in the presence of raltegravir (1 µM) and nevirapine (100 nM) or with romidepsin (40 nM) for 24 h. Cells were then extensively washed and subjected to the RNA FISH-flow assay for detection of viral RNA and the viral Gag p24 protein. A minimum of 2 million CD4+ T cells were used per condition.

Confocal microscopy of cells following the RNA FISH-flow assay. Following the RNA FISH-flow assay protocol, samples were fixed for 30 min at 4°C with 4% PFA, washed with phosphate-buffered saline, and smeared onto a microscope slide. Preparations were finally mounted with Fluoromount G (Ebioscience). Preparations were imaged with an Olympus FV1000 Spectral Deconvolution Confocal Microscope. ImageJ software was used for all image compositions.

HIV-1 RNA *in situ* hybridization in lymph nodes. To evaluate the specificity of the target-specific high-sensitivity probes that detect HIV transcripts in primary samples from an HIV-infected patient (probes for bases 1165 to 4402 of the HXB2 consensus genome), we used the ultrasensitive ViewRNA ISH Tissue 2-Plex Assay kit (Ebioscience), which detects RNA molecules in tissue samples. A lymph node sample from an acutely HIV-infected patient (patient 41, Table S1) was fixed and embedded in paraffin. Sections (6 µm each) were mounted on Superfrost Plus microscope slides (Fisher Scientific). Before the assay was performed, samples were heated for 1 h at 60°C, dewaxed in xylene, and then placed in 100% ethanol before being air dried. The ViewRNA protocol was performed in accordance with the manufacturer's instructions. Briefly, heat-induced epitope retrieval was performed by boiling sections in pretreatment solution for 10 min, and additional protease digestion was performed at 40°C for 20 min. Hybridization was carried out by slide incubation with target probes for 2 h at 40°C. After that, samples were stored overnight in storage buffer. On the next day, signal amplification was achieved by sequential slide incubation with PreAmplifier Mix and Amplifier Mix for 25 and 15 min at 40°C, respectively. Samples were then incubated with the appropriated label probe and substrate. Finally, slides were counterstained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI), air dried, and mounted with Fluoromount G. Samples were imaged on an Olympus FV1000 Spectral Deconvolution Confocal Microscope with a 10X phase objective in sequential mode to separately capture the fluorescence from the different fluorochromes at an image resolution of 800 by 800 pixels.

HIV DNA and intracellular HIV RNA quantification by qPCR. CD4+ T cells were isolated by negative selection as mentioned above. A total of 1.5 million cells were subjected to RNA extraction by the total RNA extraction protocol (mirVana; Ambion). RNA was reverse transcribed with SuperScriptIII (Invitrogen) in accordance with the instructions provided by the manufacturer, and cDNA was quantified by qPCR with primers and probes specific for the HIV long terminal repeat-gag region. Copies of HIV RNA were quantified with an HIV RNA standard, and values were normalized to micrograms of RNA of the original sample. For HIV DNA quantification, 1 million CD4+ T cells were immediately lysed with a proteinase K-containing lysis buffer. Cell lysates were subjected to total HIV DNA quantification as previously described (18). The gene for CCR5 was used for cell input normalization.

qVOAs. qVOAs were performed as previously described, with some modifications (18). Briefly, CD4+ T cells from HIV-1-infected patients were isolated by negative selection (Affymetrix) and cultured at 50,000/well in R10 supplemented with 10% FBS, 100 U/ml penicillin, and 100 µg/ml streptomycin. Subsequently, cells were stimulated with phytohemagglutinin (PHA; 2 µg/ml), recombinant IL-2 (100 U/ml), and irradiated allogeneic PBMCs (50 Gy in a Cs source irradiator for 20 min) obtained from HIV-negative healthy donors (100,000/well) and cultured in an incubator at 37°C and 5% CO₂. After 48 h, the PHA was completely washed away and MOLT-4 CCR5+ cells were added at 10,000/well on day 2 of culture and again on day 9. The cultures were subjected to the removal of 100 µl of just medium on day 6 and 100 µl of the cell suspension on day 9 and replenished with fresh complete medium containing recombinant human IL-2 (100 U/ml). After 12 days, cell supernatant was collected from each well and the number of wells containing infectious HIV-1 was assessed by incubation of the supernatant with TZM-bl cells. Luciferase activity was quantified on day 14 by luminescence assay in accordance with the manufacturer's instructions (britelite plus kit; PerkinElmer) and is directly proportional to the number of

infectious virus particles present in the initial inoculum. Latently HIV-1-infected ACH-2 cells were run as positive controls. Estimated frequencies of cells with replication-competent HIV-1 were calculated by limiting-dilution analysis as described in reference 62.

Statistical analysis. Statistical analyses were performed with the Prism software, version 5.0 (Graph-Pad). Comparisons of the frequencies of HIV RNA-expressing cells in infected patients and healthy donors were performed with the nonparametric Mann-Whitney test. For correlations, Spearman's correlation coefficient was calculated. To test the linearity of the assay, a linear regression was performed. A paired *t* test (Wilcoxon signed-rank test) was used to compare HIV RNA expression levels in CD4⁺ T cell subsets with corrected *P* values for multiple comparisons. A *P* value of <0.05 was considered significant.

SUPPLEMENTAL MATERIAL

Supplemental material for this article may be found at <https://doi.org/10.1128/mBio.00876-17>.

FIG S1, PDF file, 0.1 MB.

FIG S2, EPS file, 1.1 MB.

FIG S3, EPS file, 2.6 MB.

FIG S4, EPS file, 4.3 MB.

FIG S5, EPS file, 1.3 MB.

FIG S6, EPS file, 4.1 MB.

TABLE S1, DOCX file, 0.02 MB.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by the American National Institutes of Health (grant R21AI118411 to M.B.), the Spanish Secretariat of Science and Innovation and FEDER funds (grant SAF2015-67334-R [MINECO/FEDER]), a research grant from Bristol-Myers Squibb SAU (PFC-2015 AI424-564), the Spanish AIDS network Red Temática Cooperativa de Investigación en SIDA (RD16/0025/0007), and fellowships from the For Women in Science Program to M.B. The funders had no role in study design, data collection and analysis, the decision to publish, or preparation of the manuscript.

M.B. designed, directed, and interpreted experiments. J.G. and C.S. performed experiments, analyzed the data, and interpreted experiments. L.M., J.N., A.C., J.B., I.O., E.R., A.T., B.P., R.B., J.C., V.F., and M.C. were responsible for recruitment, specimen handling and storage, and related clinical data collection. M.B. and J.G. wrote the manuscript, and all of us contributed to editing of the manuscript.

REFERENCES

- Sliciano RF, Greene WC. 2011. HIV latency. *Cold Spring Harb Perspect Med* 1:a007096. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a007096>.
- Chun TW, Engel D, Berrey MM, Shea T, Corey L, Fauci AS. 1998. Early establishment of a pool of latently infected, resting CD4(+) T cells during primary HIV-1 infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:8869–8873. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.15.8869>.
- Palmer S, Maldarelli F, Wiegand A, Bernstein B, Hanna GJ, Brun SC, Kempf DJ, Mellors JW, Coffin JM, King MS. 2008. Low-level viremia persists for at least 7 years in patients on suppressive antiretroviral therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:3879–3884. <https://doi.org/10.1073/pnas.0800050105>.
- Chun TW, Justement JS, Murray D, Hallahan CW, Maenza J, Collier AC, Sheth PM, Kaul R, Ostrowski M, Moir S, Kovacs C, Fauci AS. 2010. Rebound of plasma viremia following cessation of antiretroviral therapy despite profoundly low levels of HIV reservoir: implications for eradication. *AIDS* 24:2803–2808. <https://doi.org/10.1097/QAD.0b013e328340a239>.
- Wong JK, Hezareh M, Günthard HF, Havlir DV, Ignacio CC, Spina CA, Richman DD. 1997. Recovery of replication-competent HIV despite prolonged suppression of plasma viremia. *Science* 278:1291–1295. <https://doi.org/10.1126/science.278.5341.1291>.
- Chun TW, Stuyver L, Mizell SB, Ehler LA, Mican JA, Baseler M, Lloyd AL, Nowak MA, Fauci AS. 1997. Presence of an inducible HIV-1 latent reservoir during highly active antiretroviral therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:13193–13197. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.24.13193>.
- Martinez-Picado J, Deeks SG. 2016. Persistent HIV-1 replication during antiretroviral therapy. *Curr Opin HIV AIDS* 11:417–423. <https://doi.org/10.1097/COH.0000000000000287>.
- Sgal A, Kim JT, Balazs AB, Dekel E, Mayo A, Milo R, Baltimore D. 2011. Cell-to-cell spread of HIV permits ongoing replication despite antiretroviral therapy. *Nature* 477:95–98. <https://doi.org/10.1038/nature10347>.
- Fletcher CV, Staskus K, Wietgreffe SW, Rothenberger M, Reilly C, Chipman JG, Beilman GJ, Khoruts A, Thorkelson A, Schmidt TE, Anderson J, Perkey K, Stevenson M, Perelson AS, Douek DC, Haase AT, Schacker TW. 2014. Persistent HIV-1 replication is associated with lower antiretroviral drug concentrations in lymphatic tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:2307–2312. <https://doi.org/10.1073/pnas.1318249111>.
- Lorenzo-Redondo R, Fryer HR, Bedford T, Kim EY, Archer J, Kosakovsky Pond SL, Chung YS, Penugonda S, Chipman JG, Fletcher CV, Schacker TW, Malim MH, Rambaut A, Haase AT, McLean AR, Wolinsky SM. 2016. Persistent HIV-1 replication maintains the tissue reservoir during therapy. *Nature* 530:51–56. <https://doi.org/10.1038/nature16933>.
- Descours B, Petitjean G, López-Zaragoza JL, Bruel T, Raffel R, Psomas C, Reynes J, Lacabaratz C, Levy Y, Schwartz O, Lelievre JD, Benkirane M. 2017. CD32a is a marker of a CD4 T-cell HIV reservoir harbouring replication-competent proviruses. *Nature* 543:564–567. <https://doi.org/10.1038/nature21710>.
- Sliciano JD, Kajdas J, Finzi D, Quinn TC, Chadwick K, Margolick JB, Kovacs C, Gange SJ, Sliciano RF. 2003. Long-term follow-up studies confirm the stability of the latent reservoir for HIV-1 in resting CD4⁺ T cells. *Nat Med* 9:727–728. <https://doi.org/10.1038/nm880>.
- Ho YC, Shan L, Hosmane NN, Wang J, Laskey SB, Rosenbloom DI, Lai J, Blankson JN, Sliciano JD, Sliciano RF. 2013. Replication-competent non-induced proviruses in the latent reservoir increase barrier to HIV-1 cure. *Cell* 155:540–551. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.09.020>.

14. Lewin SR, Rouzioux C. 2011. HIV cure and eradication: how will we get from the laboratory to effective clinical trials? *AIDS* 25:885–897. <https://doi.org/10.1097/QAD.0b013e3283467041>.
15. Rasmussen TA, Tolstrup M, Brinkmann CR, Olesen R, Erikstrup C, Solomon A, Winkelmann A, Palmer S, Dinarello C, Buzon M, Lichterfeld M, Lewin SR, Østergaard L, Sogaard OS. 2014. Panobinostat, a histone deacetylase inhibitor, for latent-virus reactivation in HIV-infected patients on suppressive antiretroviral therapy: a phase 1/2, single group, clinical trial. *Lancet HIV* 1:e13–e21. [https://doi.org/10.1016/S2352-3018\(14\)70014-1](https://doi.org/10.1016/S2352-3018(14)70014-1).
16. Leth S, Schleimann MH, Nissen SK, Højen JF, Olesen R, Graversen ME, Jørgensen S, Kjær AS, Denton PV, Mørk A, Sommerfelt MA, Krogsgaard K, Østergaard L, Rasmussen TA, Tolstrup M, Sogaard OS. 2016. Combined effect of Vacc-4x, recombinant human granulocyte macrophage colony-stimulating factor vaccination, and romidepsin on the HIV-1 reservoir (REDUC): a single-arm, phase 1B/2A trial. *Lancet HIV* 3:e463–e472. [https://doi.org/10.1016/S2352-3018\(16\)30055-8](https://doi.org/10.1016/S2352-3018(16)30055-8).
17. Kiselina M, De Spiegelaere W, Buzon MJ, Malatinkova E, Lichterfeld M, Vandekerckhove L. 2016. Integrated and total HIV-1 DNA predict ex vivo viral outgrowth. *PLoS Pathog* 12:e1005472. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005472>.
18. Buzon MJ, Martin-Gayo E, Pereyra F, Ouyang Z, Sun H, Li JZ, Piovoso M, Shaw A, Dalmau J, Zangger N, Martinez-Picado J, Zurakowski R, Yu XG, Telenti A, Walker BD, Rosenberg ES, Lichterfeld M. 2014. Long-term antiretroviral treatment initiated at primary HIV-1 infection affects the size, composition, and decay kinetics of the reservoir of HIV-1-infected CD4 T cells. *J Virol* 88:10056–10065. <https://doi.org/10.1128/JVI.01046-14>.
19. Eriksson S, Graf EH, Dahl V, Strain MC, Yuki SA, Lysenko ES, Bosch RJ, Lai J, Chioma S, Emad F, Abdel-Mohsen M, Hoh R, Hecht F, Hunt P, Somsouk M, Wong J, Johnston R, Sliciano RF, Richman DD, O'Doherty U, Palmer S, Deeks SG, Sliciano JD. 2013. Comparative analysis of measures of viral reservoirs in HIV-1 eradication studies. *PLoS Pathog* 9:e1003174. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003174>.
20. Williams JP, Hurst J, Stöhr W, Robinson N, Brown H, Fisher M, Kinloch S, Cooper D, Schechter M, Tambussi G, Fidler S, Carrington M, Babiker A, Weber J, Koelsch KK, Kelleher AD, Phillips RE, Frater J, SPARTACTrial Investigators. 2014. HIV-1 DNA predicts disease progression and post-treatment virological control. *eLife* 3:e03821. <https://doi.org/10.7554/eLife.03821>.
21. Azzoni L, Foulkes AS, Pappasavvas E, Mexas AM, Lynn KM, Mounzer K, Tebas P, Jacobson JM, Frank I, Busch MP, Deeks SG, Carrington M, O'Doherty U, Kostman J, Montaner LJ. 2013. Pegylated interferon alfa-2a monotherapy results in suppression of HIV type 1 replication and decreased cell-associated HIV DNA integration. *J Infect Dis* 207:213–222. <https://doi.org/10.1093/infdis/jis663>.
22. Chomont N, El-Far M, Ancuta P, Trautmann L, Procopio FA, Yassine-Diab B, Boucher G, Boulassel MR, Ghattas G, Brechley JM, Schacker TW, Hill BJ, Douek DC, Routy JP, Haddad EK, Skalety RP. 2009. HIV reservoir size and persistence are driven by T cell survival and homeostatic proliferation. *Nat Med* 15:893–900. <https://doi.org/10.1038/nm.1972>.
23. Buzon MJ, Sun H, Li C, Shaw A, Seiss K, Ouyang Z, Martin-Gayo E, Leng J, Henrich TJ, Li JZ, Pereyra F, Zurakowski R, Walker BD, Rosenberg ES, Yu XG, Lichterfeld M. 2014. HIV-1 persistence in CD4+ T cells with stem cell-like properties. *Nat Med* 20:139–142. <https://doi.org/10.1038/nm.3445>.
24. Perreau M, Savoye AL, De Grignis E, Corpataux JM, Cubas R, Haddad EK, De Leval L, Graziosi C, Pantaleo G. 2013. Follicular helper T cells serve as the major CD4 T cell compartment for HIV-1 infection, replication, and production. *J Exp Med* 210:143–156. <https://doi.org/10.1084/jem.20121932>.
25. Puertas MC, Noguera-Julian M, Massanella M, Pou C, Buzon MJ, Clotet B, Stevenson M, Paredes R, Blanco J, Martinez-Picado J. 2016. Lack of concordance between residual viremia and viral variants driving de novo infection of CD4(+) T cells on ART. *Retrovirology* 13:51. <https://doi.org/10.1186/s12977-016-0282-9>.
26. Pasternak AO, Lukashov VV, Berkhout B. 2013. Cell-associated HIV RNA: a dynamic biomarker of viral persistence. *Retrovirology* 10:41. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-10-41>.
27. Chun TW, Justement JS, Lempicki RA, Yang J, Dennis G, Jr, Hallahan CW, Sanford C, Pandya P, Liu S, McLaughlin M, Ehler LA, Moir S, Fauci AS. 2003. Gene expression and viral production in latently infected, resting CD4+ T cells in viremic versus aviremic HIV-infected individuals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:1908–1913. <https://doi.org/10.1073/pnas.0437640100>.
28. Lassen KG, Ramyar KX, Bailey JR, Zhou Y, Sliciano RF. 2006. Nuclear retention of multiply spliced HIV-1 RNA in resting CD4+ T cells. *PLoS Pathog* 2:e68. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0020068>.
29. Procopio FA, Fromentin R, Kulpa DA, Brehm JH, Bebin AG, Strain MC, Richman DD, O'Doherty U, Palmer S, Hecht FM, Hoh R, Barnard RJ, Miller MD, Hazuda DJ, Deeks SG, Skalety RP, Chomont N. 2015. A novel assay to measure the magnitude of the inducible viral reservoir in HIV-infected individuals. *EBioMedicine* 2:874–883. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2015.06.019>.
30. Saksela K, Stevens CE, Rubinstein P, Taylor PE, Baltimore D. 1995. HIV-1 messenger RNA in peripheral blood mononuclear cells as an early marker of risk for progression to AIDS. *Ann Intern Med* 123:641–648. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-123-9-199511010-00001>.
31. Pasternak AO, Jurriaans S, Bakker M, Berkhout B, Lukashov VV. 2010. Steady increase in cellular HIV-1 load during the asymptomatic phase of untreated infection despite stable plasma viremia. *AIDS* 24:1641–1649. <https://doi.org/10.1097/QAD.0b013e32833b3171>.
32. Furtado MR, Kingsley LA, Wolinsky SM. 1995. Changes in the viral mRNA expression pattern correlate with a rapid rate of CD4+ T-cell number decline in human immunodeficiency virus type 1-infected individuals. *J Virol* 69:2092–2100.
33. Saltarelli MJ, Hadziyannis E, Hart CE, Harrison JV, Felber BK, Spira TJ, Pavlakis GN. 1996. Analysis of human immunodeficiency virus type 1 mRNA splicing patterns during disease progression in peripheral blood mononuclear cells from infected individuals. *AIDS Res Hum Retroviruses* 12:1443–1456. <https://doi.org/10.1089/aid.1996.12.1443>.
34. Iglesias-Ussel MD, Romero F. 2011. HIV reservoirs: the new frontier. *AIDS Rev* 13:13–29.
35. Fischer M, Joos B, Niederöst B, Kaiser P, Hafner R, von Wyl V, Ackermann M, Weber R, Günthard HF. 2008. Biphasic decay kinetics suggest progressive slowing in turnover of latently HIV-1 infected cells during antiretroviral therapy. *Retrovirology* 5:107. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-5-107>.
36. Kaiser P, Joos B, Niederöst B, Weber R, Günthard HF, Fischer M. 2007. Productive human immunodeficiency virus type 1 infection in peripheral blood predominantly takes place in CD4/CD8 double-negative T lymphocytes. *J Virol* 81:9693–9706. <https://doi.org/10.1128/JVI.00492-07>.
37. Deleage C, Wietgreffe SW, Del Prete G, Morcock DR, Hao XP, Platak M, Jr, Bess J, Anderson JL, Perkey KE, Reilly C, McCune JM, Haase AT, Lifson JD, Schacker TW, Estes JD. 2016. Defining HIV and SV reservoirs in lymphoid tissues. *Pathog Immun* 1:68–106. <https://doi.org/10.20411/pai.v1i1.100>.
38. Kimura T, Nishikawa M, Ohyama A. 1994. Intracellular membrane traffic of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoproteins: vpu liberates Golgi-targeted gp160 from CD4-dependent retention in the endoplasmic reticulum. *J Biochem* 115:1010–1020. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a124414>.
39. Garcia JV, Miller AD. 1991. Serine phosphorylation-independent down-regulation of cell-surface CD4 by nef. *Nature* 350:508–511. <https://doi.org/10.1038/350508a0>.
40. Fischer M, Joos B, Hirschel B, Bleiber G, Weber R, Günthard HF, Swiss HIV Cohort Study. 2004. Cellular viral rebound after cessation of potent antiretroviral therapy predicted by levels of multiply spliced HIV-1 RNA encoding nef. *J Infect Dis* 190:1979–1988. <https://doi.org/10.1086/425983>.
41. Pomerantz RJ, Seshamma T, Trono D. 1992. Efficient replication of human immunodeficiency virus type 1 requires a threshold level of Rev: potential implications for latency. *J Virol* 66:1809–1813.
42. Izquierdo-Useros N, Naranjo-Gómez M, Archer J, Hatch SC, Erkizia I, Blanco J, Borrás FE, Puertas MC, Connor JH, Fernández-Figueras MT, Moore L, Clotet B, Gummuluru S, Martinez-Picado J. 2009. Capture and transfer of HIV-1 particles by mature dendritic cells converges with the exosome-dissemination pathway. *Blood* 113:2732–2741. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-05-158642>.
43. Zhu T, Muthui D, Holte S, Nickle D, Feng F, Brodie S, Hwangbo Y, Mullins J, Corey L. 2002. Evidence for human immunodeficiency virus type 1 replication in vivo in CD14(+) monocytes and its potential role as a source of virus in patients on highly active antiretroviral therapy. *J Virol* 76:707–716. <https://doi.org/10.1128/JVI.76.2.707-716.2002>.
44. Marodon G, Warren D, Filomio M, Posnett DN. 1999. Productive infection of double-negative T cells with HIV in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:11958–11963. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.21.11958>.
45. Yuki SA, Shergill AK, Ho T, Killian M, Girling V, Epling L, Li P, Wong LK, Crouch P, Deeks SG, Havlir DV, McQuaid K, Sinclair E, Wong JK. 2013. The

- distribution of HIV DNA and RNA in cell subsets differs in gut and blood of HIV-positive patients on ART: implications for viral persistence. *J Infect Dis* 208:1212–1220. <https://doi.org/10.1093/infdis/jit308>.
46. Herbein G, Van Lint C, Lovett JL, Verdin E. 1998. Distinct mechanisms trigger apoptosis in human immunodeficiency virus type 1-infected and in uninfected bystander T lymphocytes. *J Virol* 72:660–670.
 47. Fischer M, Günthard HF, Opravil M, Joos B, Huber W, Bisset LR, Ott P, Böni J, Weber R, Cone RW. 2000. Residual HIV-RNA levels persist for up to 2.5 years in peripheral blood mononuclear cells of patients on potent antiretroviral therapy. *AIDS Res Hum Retroviruses* 16:1135–1140. <https://doi.org/10.1089/088922200414974>.
 48. Pasternak AO, Jurriaans S, Bakker M, Prins JM, Berkhout B, Lukashov VV. 2009. Cellular levels of HIV unspliced RNA from patients on combination antiretroviral therapy with undetectable plasma viremia predict the therapy outcome. *PLoS One* 4:e8490. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008490>.
 49. Kiselina M, Geretti AM, Malatinkova E, Vervisch K, Beloukas A, Messiaen P, Bonczkowski P, Trypsteen W, Callens S, Verhofstede C, De Spiegelaere W, Vandekerckhove L. 2015. HIV-1 RNA and HIV-1 DNA persistence during suppressive ART with PI-based or nevirapine-based regimens. *J Antimicrob Chemother* 70:3311–3316. <https://doi.org/10.1093/jac/dkv250>.
 50. Haase AT, Henry K, Zupancic M, Sedgewick G, Faust RA, Melroe H, Cavert W, Gebhard K, Staskus K, Zhang ZQ, Dailey PJ, Balfour HH, Jr, Erice A, Perelson AS. 1996. Quantitative image analysis of HIV-1 infection in lymphoid tissue. *Science* 274:985–989. <https://doi.org/10.1126/science.274.5289.985>.
 51. Cavert W, Notermans DW, Staskus K, Wietgreffe SW, Zupancic M, Gebhard K, Henry K, Zhang ZQ, Mills R, McDade H, Schuwirth CM, Goudsmit J, Danner SA, Haase AT. 1997. Kinetics of response in lymphoid tissues to antiretroviral therapy of HIV-1 infection. *Science* 276:960–964. <https://doi.org/10.1126/science.276.5314.960>.
 52. Masopust D, Schenkel JM. 2013. The integration of T cell migration, differentiation and function. *Nat Rev Immunol* 13:309–320. <https://doi.org/10.1038/nri3442>.
 53. Mahnke YD, Brodie TM, Sallusto F, Roederer M, Lugli E. 2013. The who's who of T-cell differentiation: human memory T-cell subsets. *Eur J Immunol* 43:2797–2809. <https://doi.org/10.1002/eji.201343751>.
 54. Archin NM, Liberty AL, Kashuba AD, Choudhary SK, Kuruc JD, Crooks AM, Parker DC, Anderson BM, Kearney MF, Strain MC, Richman DD, Hudgens MG, Bosch RJ, Coffin JM, Eron JJ, Hazuda DJ, Margolis DM. 2012. Administration of vorinostat disrupts HIV-1 latency in patients on antiretroviral therapy. *Nature* 487:482–485. <https://doi.org/10.1038/nature11286>.
 55. Martrus G, Niehrs A, Cornelis R, Rechten A, Garcia-Beltran W, Lütgehetmann M, Hoffmann C, Altfeld M. 2016. Kinetics of HIV-1 latency reversal quantified on the single-cell level using a novel flow-based technique. *J Virol* 90:9018–9028. <https://doi.org/10.1128/JVI.01448-16>.
 56. Baxter AE, Niessl J, Fromentin R, Richard J, Porichis F, Charlebois R, Massanella M, Brassard N, Alshafiq N, Delgado GG, Routy JP, Walker BD, Finzi A, Chomont N, Kaufmann DE. 2016. Single-cell characterization of viral translation-competent reservoirs in HIV-1-infected individuals. *Cell Host Microbe* 20:368–380. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.07.015>.
 57. Laird GM, Bullen CK, Rosenbloom DI, Martin AR, Hill AL, Durand CM, Sliciano JD, Sliciano RF. 2015. Ex vivo analysis identifies effective HIV-1 latency-reversing drug combinations. *J Clin Invest* 125:1901–1912. <https://doi.org/10.1172/JCI80142>.
 58. Bullen CK, Laird GM, Durand CM, Sliciano JD, Sliciano RF. 2014. New ex vivo approaches distinguish effective and ineffective single agents for reversing HIV-1 latency in vivo. *Nat Med* 20:425–429. <https://doi.org/10.1038/nm.3489>.
 59. Jordan A, Bisgrove D, Verdin E. 2003. HIV reproducibly establishes a latent infection after acute infection of T cells in vitro. *EMBO J* 22:1868–1877. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg188>.
 60. Baba M, Miyake H, Okamoto M, Iizawa Y, Okonogi K. 2000. Establishment of a CCR5-expressing T-lymphoblastoid cell line highly susceptible to R5 HIV type 1. *AIDS Res Hum Retroviruses* 16:935–941. <https://doi.org/10.1089/08892220050058344>.
 61. Li M, Salazar-Gonzalez JF, Derdeyn CA, Morris L, Williamson C, Robinson JE, Decker JM, Li Y, Salazar MG, Polonis VR, Mlisana K, Karim SA, Hong K, Greene KM, Biliska M, Zhou J, Allen S, Chomba E, Mulenga J, Waijika C, Gao F, Zhang M, Korber BT, Hunter E, Hahn BH, Montefiori DC. 2006. Genetic and neutralization properties of subtype C human immunodeficiency virus type 1 molecular env clones from acute and early heterosexually acquired infections in southern Africa. *J Virol* 80:11776–11790. <https://doi.org/10.1128/JVI.01730-06>.
 62. Hu Y, Smyth GK. 2009. ELDA: extreme limiting dilution analysis for comparing depleted and enriched populations in stem cell and other assays. *J Immunol Methods* 347:70–78. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2009.06.008>.

Figure S1

Detection of HIV RNA and Gag p24 protein in non-T cells. Unfractionated and unstimulated PBMCs from healthy donors were infected ex vivo and subjected to the RNA FISH-flow protocol after 5 days of infection. (A) Gating strategy used for the identification of HIV transcription and protein production in non-T cells. (B) Summary data of three HIV-negative donors.

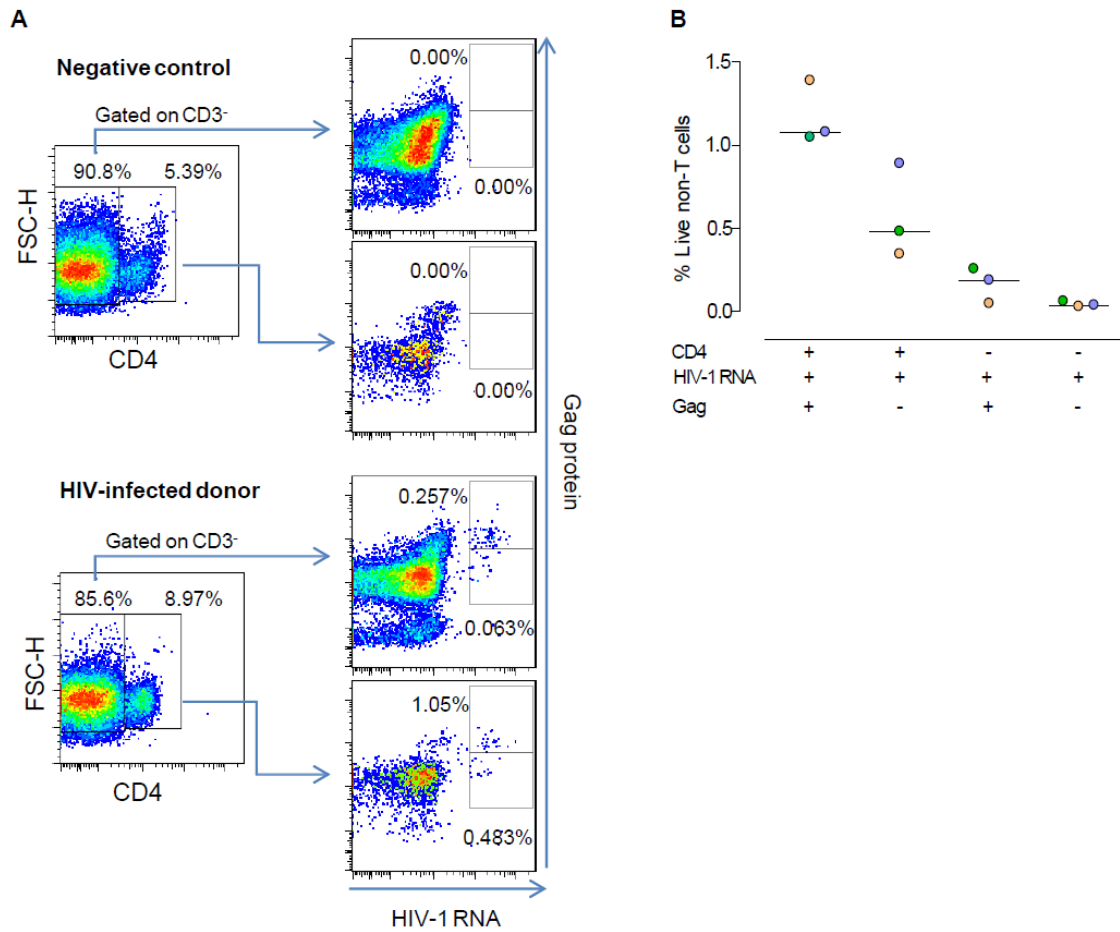


Figure S2

Linearity of the RNA FISH-flow assay with highly sensitive probes for detection of HIV transcription. (A) The latently infected cell line J-Lat (clone 9.2) spiked with the uninfected MOLT CCR5⁺ cell line was used to perform the quantification of predicted (blue symbols) versus experimental (orange symbols) results with single expression of HIV RNA. (B) Infection of primary CD4⁺ T cells from HIV-infected patients was expanded *in vitro*, and infected cells were diluted with uninfected cells to perform the quantification of predicted (blue symbols) versus experimental (orange symbols) values of HIV RNA expression measured by the RNA FISH-flow assay. Assay linearity was assessed by linear regression.

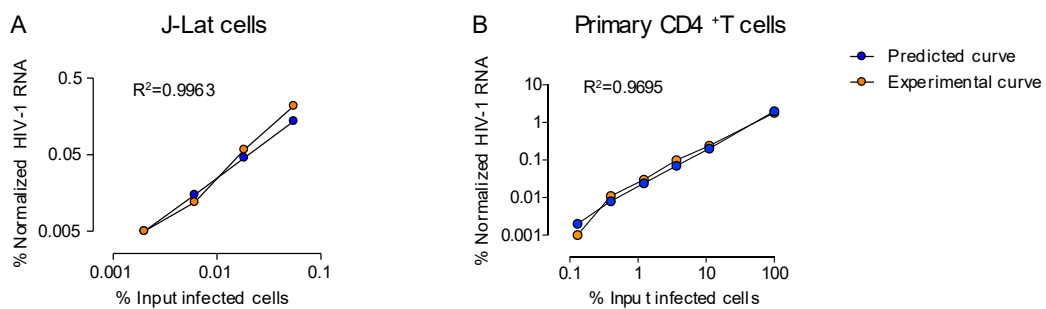


Figure S3

Representative flow cytometry plots of HIV RNA detection in CD4⁺ T cells from two uninfected (HIV⁻) persons, two ART-treated patients (plasma viral loads of <20 copies/ml), and six untreated patients with different plasma viral loads.

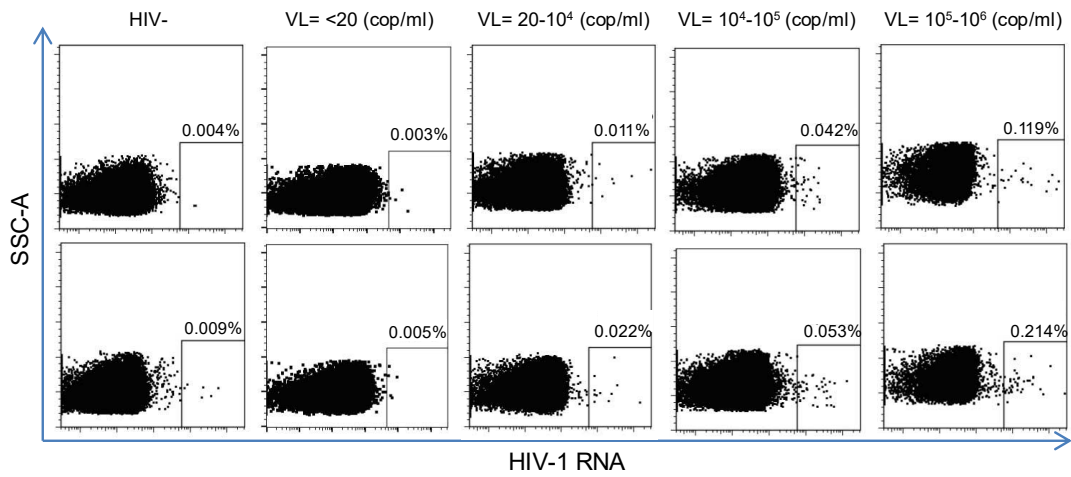


Figure S4

Reproducibility of the assay and specificity of the HIV RNA probe. (A) Reproducibility of the assay. Normalized values of HIV RNA expression in CD4⁺ T cells from three different patients assayed in independent experiments (patients 32, 35, and 37; Table S1). (B) HIV RNA-expressing cells imaged by confocal microscopy in a lymph node tissue sample from an uninfected donor (top) and an HIV-infected individual (patient 41, Table S1) (bottom). DAPI staining is blue, and HIV RNA transcripts are red. Clear symbols correspond to values below the limit of detection.

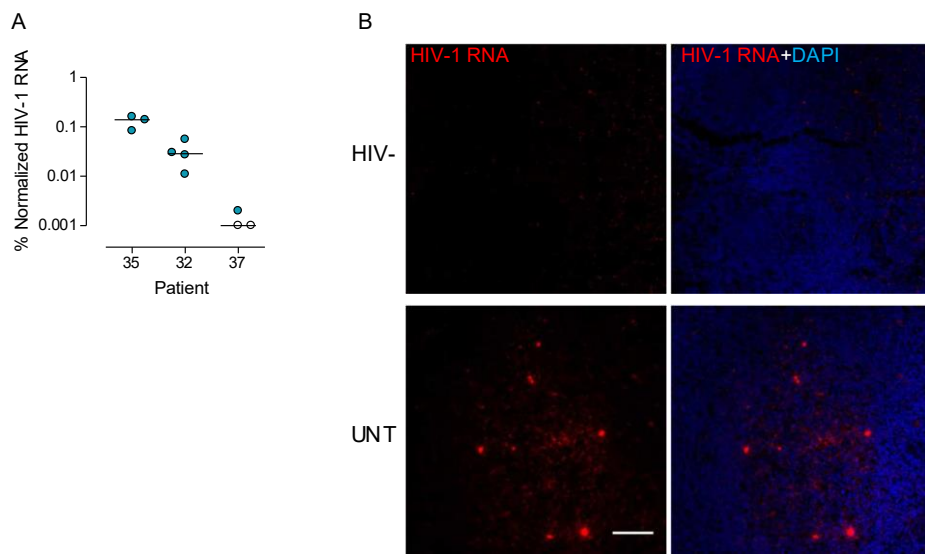


Figure S5

Correlations between the RNA FISH-flow technique and viral DNA and RNA quantification by conventional methods. (A) Spearman correlation between the percentage of HIV-expressing cells determined by the RNA FISH-flow assay and the total HIV DNA quantified by conventional qPCR. (B) Spearman correlation between the percentage of HIV-expressing cells determined by the RNA FISH-flow assay and intracellular HIV RNA quantification by qPCR. (C) Comparison of values obtained with the RNA FISH-flow assay, intracellular HIV RNA quantification by qPCR, and total HIV DNA quantification by qPCR. (D) Correlation between qVOA values and proportions of HIV RNA-expressing memory CD4⁺ T cells in samples from aviremic patients. Data for patients 3, 26, 27, 30, 32, 35, 36, and 38 to 40 are shown in panel A; those for patients 1, 3, 27, 30, 32, 35, 36, and 38 to 40 are shown in panel B; those for patients 1, 3, 26, 27, 30, 32, 35, 36, and 38 to 40 are shown in panel C; and those for patients 7, 10, 11, 16 to 20, and 24 are shown in panel D.

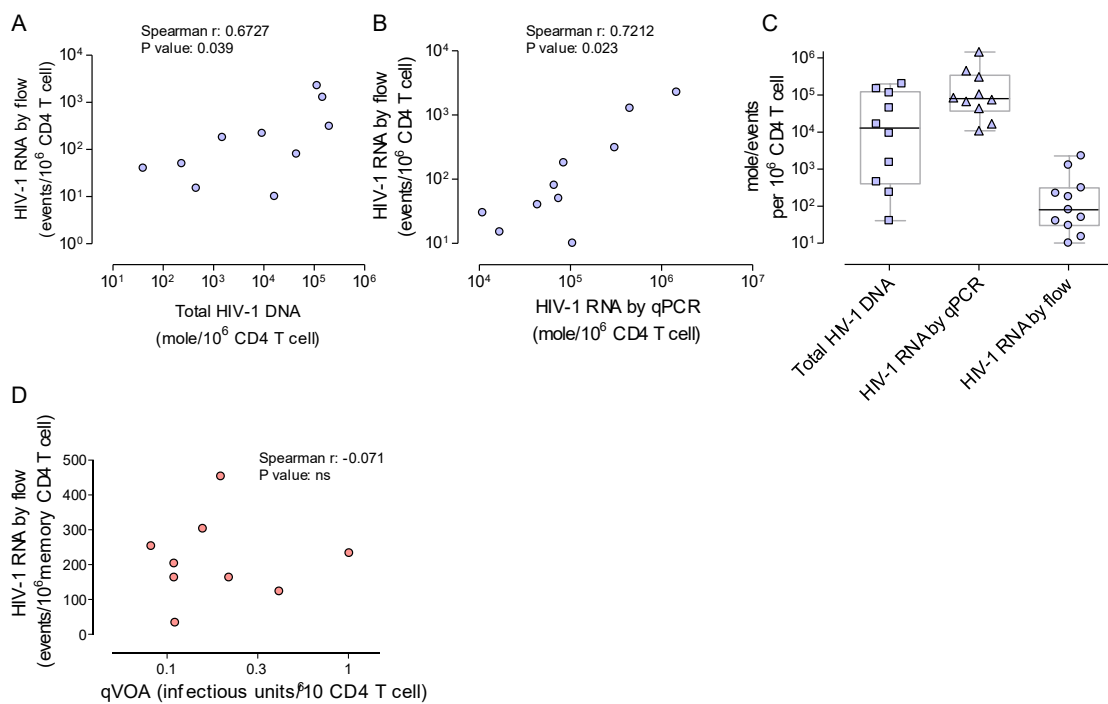


Figure S6

Representative example of the flow cytometry gating strategy used for the identification of CD4⁺ T cell subsets in patient samples. **(A)** Subpopulations are defined as T_{NA} (CD3⁺CD4⁺CD45RO⁻CCR7⁺), T_{CM} (CD3⁺CD4⁺CD45RO⁺CCR7⁺), T_{EM} (CD3⁺CD4⁺CD45RO⁺CCR7⁻), and T_{TD} (CD3⁺CD4⁺CD45RO⁻CCR7⁻). **(B)** Gating strategy used for the identification of HIV-expressing cells in different CD4⁺ T cell populations based on the expression of CD32 and HLA-DR.

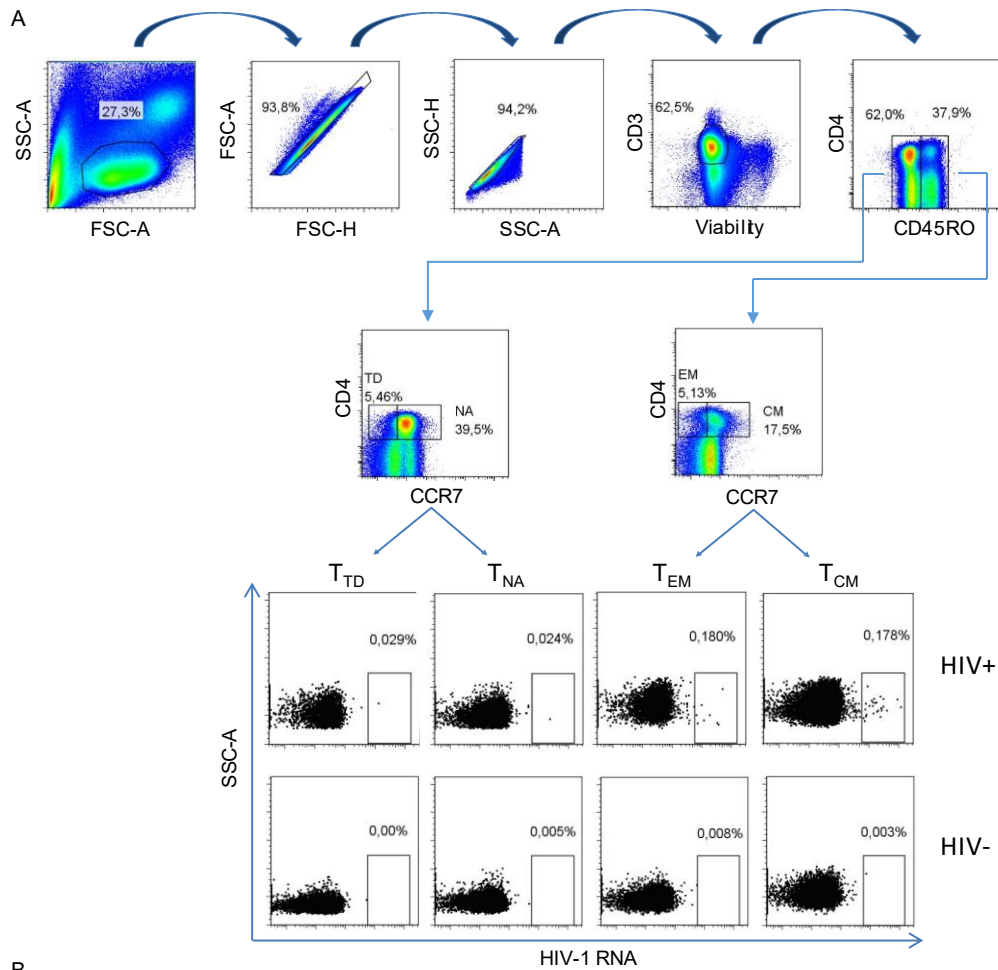


Table S1

Characteristics of the patients included in this study.

Patient ID	Time since HIV diagnosis (months)	CD4 Cell Count (cells/ μ l)	%CD4	Viral Load (copies/ml)	Time on HAART (months)	HAART regimen
1	336	250	20,85	<20	150	TDF/FTC+NVP
2	204	440	40,3	<20	96	ABC/3TC+NVP
3	33	930	30,9	<20	9	TDF/FTC+ATV/r
4	41	1390	40,6	<20	19	ABC/3TC+RAL
5	19	1310	42,30	<20	12	TDF/FTC/EFV
6	62	650	18,3	<20	8	TDF/FTC+EVG/c
7	44	790	35,4	<20	12	TDF/FTC+EVG/c
8	51	1120	40,2	<20	28	TDF/FTC+DRV/r
9	19	360	21,09	<20	1	TDF/FTC+EVG/c
10	31	320	20,81	<20	23	ABC/3TC+DTG
11	26	1450	54,99	<20	19	TDF/FTC+RPV
12	42	730	40,32	<20	21	TDF/FTC+RPV
13	28	1300	50,73	<20	19	ABC/3TC+DTG
14	9	630	34,84	<20	8	TDF/FTC+EVG/c
15	18	880	41,35	<20	6	ABC/3TC+DTG
16	30	940	47,07	<20	20	TDF/FTC+EVG/c
17	31	840	35,75	<20	23	TDF/FTC+EVG/c
18	18	1520	46,83	<20	6	ABC/3TC+ATV/r
19	47	800	40,42	<20	23	ABC/3TC+RAL
20	48	850	40,64	<20	27	TDF/FTC+RPV
21	25	1030	34,87	<20	16	TDF/FTC+EVG/c
22	73	1410	36,46	<20	24	TDF/FTC+EVG/c
23	48	490	36,57	<20	18	ABC/3TC+RPV
24	280	330	15,98	78	-	UNT
25	71	850	25,8	5.950	-	UNT
26	68	480	26,4	77.700	-	UNT
27	22	550	26,4	8.600	-	UNT
28	84	240	6,51	1.820.000	-	UNT
29	335	290	37,4	94.100	-	UNT
30	198	170	5,23	517.000	-	UNT
31	1	80	9,89	148.000	-	UNT
32	2	450	20,1	1.020.000	-	UNT
33	96	780	51,9	2.050	-	UNT
34	213	350	22,7	74.900	-	UNT
35	2	180	4,19	417.000	-	UNT
36	62	830	43,7	51.900	-	UNT
37	2	850	35,17	559	-	UNT
38	270	280	17,5	189	-	UNT
39	75	690	33,1	4.220	-	UNT
40	315	150	11,51	49.300	-	UNT
41	0,1	150	7,5	5.000.000	-	UNT

FTC, emtricitabine; TDF, tenofovir; NVP, nevirapine; ATV/r, atazanavir boosted with ritonavir; 3TC, lamivudine; EFV, efavirenz; ABC, abacavir; RAL, raltegravir; EVG/c, elvitegravir boosted with cobicistat; DTG, dolutegravir; DRV/r, darunavir boosted with ritonavir; RPV, Rilpivirine; UNT, untreated.

TREBALL 2: Els agents reversors de la latència afecten de manera diferent el reservori latent present en les diferents subpoblacions de cèl·lules T CD4⁺.

Títol: Latency reversal agents affect differently the latent reservoir present in distinct CD4⁺ T subpopulations.

Autors: Judith Grau-Expósito¹, Laura Luque-Ballesteros¹, Jordi Navarro¹, Adrian Curran¹, Joaquin Burgos¹, Esteban Ribera¹, Ariadna Torrella¹, Bibiana Planas¹, Rosa Badía¹, Mario Martin-Castillo¹, Jesús Fernández-Sojo², Meritxell Genescà¹, Vicenç Falcó¹, Maria J. Buzon^{1*}.

¹Infectious Diseases Department, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Institut de Recerca (VHIR), Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain, ²Banc de Sang i Teixits, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain

Objectiu: Avaluar la capacitat de reactivació que tenen els agents reversors de la latència individualment i en combinació en les diferents subpoblacions de cèl·lules T CD4⁺. La reactivació serà quantificada a través de la tècnica de RNA/FISH flow.

Mètodes: Es van realitzar assajos de reactivació viral en cèl·lules T CD4⁺ obtingudes per aïllament negatiu a partir de donacions de sang completa de 9 pacients en tractament antiretroviral. Un total de 13 condicions, inclosos els controls positiu i negatiu, Ingenol i Bryostatina-1 (agonistes de PKC), Romidepsin i Panobinostat (inhibidors de HDAC) i JQ1 (inhibidor de Bromodomini) i les combinacions de dos LRAs de diferents famílies, es van testar en cada pacient. La producció intracel·lular de VIH-ARN i p24 es va avaluar mitjançant la tecnologia RNA/FISH flow en les diferents subpoblacions de cèl·lules T CD4⁺ (Naïve-T_{NA}; Memory Stem Cell-T_{SCM}; Central Memory-T_{CM}, Effector memory-T_{EM}; Transitional Memory-T_{TM} i Terminally differentiated cells-T_{TD}) després de 22h en cultiu. Les sinèrgies i antagonismes entre compostos es van calcular mitjançant el model d'independència de Bliss.

Resultats: En general, es va induir l'expressió d'ARN viral després de la reactivació viral en una mediana del 16,28% de tot el reservori de VIH en cèl·lules T CD4⁺, però només el 10,1% d'aquestes cèl·lules reactivades van produir la proteïna viral p24. Els nivells més alts de VIH-ARN i la proteïna p24 van ser induïts per Ingenol, Romidepsin i Panobinostat seguits de Briostatina i JQ1. A més, la combinació de Romidepsina+Ingenol va induir una reactivació de 3,5 vegades més en comparació amb el control negatiu. En quant a les subpoblacions de cèl·lules T CD4⁺, la majoria de subpoblacions de memòria van ser reactivades per Romidepsina i la susceptibilitat més alta es va observar a les cèl·lules T_{EM} (FC=4.24). Panobinostat va ser més eficient a la reactivació de les cèl·lules T_{CM} (FC=2.11) i T_{EM} (FC=2.32) mentre que Ingenol va tenir un gran efecte en T_{CM} (FC=4.05) i T_{TM} (FC=5.27), però no en les cèl·lules T_{EM}. Pel que fa a les combinacions de LRAs, Romidepsina+Ingenol es va convertir en la condició més eficaç en totes les

subpoblacions de cèl·lules T CD4⁺ testades, principalment en T_{TM} (FC=6,72) i T_{EM} (FC=7,61), però sense produir cap efecte en les T_{SCM}. Paral·lelament, es va observar un efecte antagònic en termes de transcripció del VIH quan es van tractar les cèl·lules amb Panobinostat+Ingenol.

Conclusions: Els nostres resultats avalen l'eficiència de la tècnica RNA/FISH flow per avaluar la potència dels LRAs en les diferents subpoblacions de cèl·lules T CD4⁺. Tot i que s'identifiquen importants sinèrgies quan es combinen RMD i ING, els LRA existents presenten una capacitat limitada per induir la transcripció del VIH en les cèl·lules que actuen com a reservori. Aquest estudi posa de manifest la necessitat de generar nous fàrmacs amb una capacitat més àmplia de reactivació que actuïn a nivell de totes les cèl·lules T CD4⁺ per a futurs assaigs clínics.

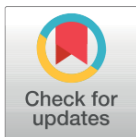
RESEARCH ARTICLE

Latency reversal agents affect differently the latent reservoir present in distinct CD4⁺ T subpopulations

Judith Grau-Expósito¹, Laura Luque-Ballesteros¹, Jordi Navarro ¹, Adrian Curran¹, Joaquin Burgos¹, Esteban Ribera¹, Ariadna Torrella¹, Bibiana Planas¹, Rosa Badía ¹, Mario Martín-Castillo ¹, Jesús Fernández-Sojo ², Meritxell Genescà¹, Vicenç Falcó ¹, Maria J. Buzon ^{1*}

1 Infectious Diseases Department, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Institut de Recerca (VHIR), Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain, **2** Banc de Sang i Teixits, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain

* mariajose.buzon@vhir.org


 OPEN ACCESS

Citation: Grau-Expósito J, Luque-Ballesteros L, Navarro J, Curran A, Burgos J, Ribera E, et al. (2019) Latency reversal agents affect differently the latent reservoir present in distinct CD4⁺ T subpopulations. *PLoS Pathog* 15(8): e1007991. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007991>

Editor: Ronald Swanson, University of North Carolina at Chapel Hill, UNITED STATES

Received: March 12, 2019

Accepted: July 19, 2019

Published: August 19, 2019

Copyright: © 2019 Grau-Expósito et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the manuscript and its Supporting Information files.

Funding: This study was supported by the American National Institutes of Health (grant R21AI118411 to MJB), the Spanish Secretariat of Science and Innovation and FEDER funds (grant SAF2015-67334-R [MINECO/FEDER]), a unrestricted research grant from Bristol-Myers Squibb SAU (PIC-2015 AI424-564) to MJB, the Spanish "Ministerio de Economía y Competitividad,

Abstract

Latency reversal agents (LRAs) have proven to induce HIV-1 transcription in vivo but are ineffective at decreasing the size of the latent reservoir in antiretroviral treated patients. The capacity of the LRAs to perturb the viral reservoir present in distinct subpopulations of cells is currently unknown. Here, using a new RNA FISH/flow ex vivo viral reactivation assay, we performed a comprehensive assessment of the viral reactivation capacity of different families of LRAs, and their combinations, in different CD4⁺ T cell subsets. We observed that a median of 16.28% of the whole HIV-reservoir induced HIV-1 transcripts after viral reactivation, but only 10.10% of these HIV-1 RNA⁺ cells produced the viral protein p24. Moreover, none of the LRAs were powerful enough to reactivate HIV-1 transcription in all CD4⁺ T cell subpopulations. For instance, the combination of Romidepsin and Ingenol was identified as the best combination of drugs at increasing the proportion of HIV-1 RNA⁺ cells, in most, but not all, CD4⁺ T cell subsets. Importantly, memory stem cells were identified as highly resistant to HIV-1 reactivation, and only the combination of Panobinostat and Bryostat-1 significantly increased the number of cells transcribing HIV within this subset. Overall, our results validate the use of the RNA FISH/flow technique to assess the potency of LRAs among different CD4⁺ T cell subsets, manifest the intrinsic differences between cells that encompass the latent HIV reservoir, and highlight the difficulty to significantly impact the latent infection with the currently available drugs. Thus, our results have important implications for the rational design of therapies aimed at reversing HIV latency from diverse cellular reservoirs.

Author summary

HIV infection is an incurable disease. Despite antiretroviral therapy, a pool of cells with HIV in a latent state persists and precludes fully eradication of the viral infection. The cells that contain this latent viral reservoir are very diverse, and therefore different

Instituto de Salud Carlos III" (ISCIII, PI17/01470) to MG, a research grant from Gilead Sciences (GLD17-00204) to M.B, GeSIDA and the Spanish AIDS network "Red Temática Cooperativa de Investigación en SIDA" (RD16/0025/0007) to ER. The Miguel Servet program funded by the Spanish Health Institute Carlos III (CP17/00179) to MJB. The "Pla estratègic de recerca i innovació en salut" (PERIS), from the Catalan Government to MG. The funders had no role in study design, data collection and analysis, the decision to publish or preparation of the manuscript.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

therapeutic strategies would be necessary to target and eliminate all infected cells. Latency Reversal Agents (LRAs) are compounds able to awake the latent virus from its dormant state with the purpose of making infected cells visible to the immune system. But the ability of the LRAs to target different cell types containing HIV is currently unknown. Here, using a novel methodology that interrogates individual cells, we found that current LRAs do not impact equally all infected cells. In fact, certain types of memory lymphocytes, recognized to harbor latent HIV for decades, are not fully impacted by most of the LRAs tested. Our study highlights the difficulty to cure HIV with the currently available LRAs. Different therapeutic approaches aimed at reversing HIV latency from diverse cellular reservoirs are needed to reduce HIV persistence.

Introduction

Current antiretroviral therapy (ART) is extremely effective at suppressing HIV viremia below the limit of detection of standard clinical assays and substantially reduces the morbidity and mortality associated with the HIV-1 infection. However, ART is unable to fully eliminate and eradicate HIV from the human body [1,2]. This is mainly due to the presence of latently HIV-infected cells generated in the early stages of the infection that are not susceptible to current antiretroviral drugs [3]. The development of new clinical strategies targeting the persistent virus may lead to a long-term drug-free remission of HIV infection, which currently represents a high priority for HIV-1 research [4,5].

Over the last years, the "kick and kill" therapeutic strategy has been pursued as an approach for eliminating HIV; latently HIV-infected cells are pharmacologically forced to induce HIV transcription with the hope that viral reactivated cells will be cleared by virus-induced cytopathic effects or by the immune system [6–8]. In this regard, drug discovery efforts have identified several latency reversal agents (LRAs), compounds that can efficiently induce HIV expression. Vorinostat, Romidepsin and Panobinostat belong to the histone deacetylase inhibitor (HDACi) family. HDACi can suppress the histone deacetylases enzymes that enzymatically remove the acetyl group from histones, and as a consequence they induce gene expression. Importantly, HDACi successfully reactivated latent HIV in the first-in-human clinical trials [9–11]. Further, Disulfiram, a drug previously used to treat alcoholism, has been shown to increase HIV transcription in a subgroup of ART-suppressed patients after in vivo administration [12]. However, so far, none of the current LRAs tested in patients have proven to be effective at decreasing the size of the latent HIV reservoir. Other compounds, not yet tested in humans, have shown promising results *ex vivo*. In this sense, the PKC (protein kinase C) agonists Ingenol [13] and Bryostatin-1 [14] are involved in the PKC pathway, which plays an important role in cellular latency and reactivation of HIV via NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) signaling and via P-TEFb (positive transcription elongation factor b). The bromo and extra terminal (BET) bromodomain inhibitor JQ1 [15] also reactivates HIV by its effect through the P-TEFb. Lastly, a novel family of LRAs has been identified; the benzotriazoles successfully increase viral transcription dependent on STAT5 phosphorylation [16].

An important issue for current and future clinical trials aimed at curing HIV infection through the administration of LRAs is to determine how effective these compounds are in fully reactivating the virus from all latently-infected CD4⁺ T cell subpopulations. The CD4⁺ T cell pool encompasses a heterogeneous population of cells defined by the differential expression of cell surface receptors associated with different stages of cell maturation, activation and

differentiation [17,18]. These CD4⁺ T cell subpopulations include naive cells (T_{NA}), stem cell memory (T_{SCM}), central memory (T_{CM}), transitional memory (T_{TM}), effector memory (T_{EM}) and terminally differentiated cells (T_{TD}). As HIV transcription level and infection frequency differ by cell type [19–22], the characterization of the responses of the different CD4⁺ T cell subpopulations to pharmacological HIV reactivation will guide us on the design of more effective therapies aimed at reducing HIV persistence.

Currently, the most used assay for measuring the impact of LRAs on HIV reactivation is the quantification of intracellular HIV-1 RNA by conventional quantitative PCR assays [11,23–25]. Several other methodologies, as the quantitative viral outgrowth assay (qVOA), Tat/rev induced limiting dilution assay (TILDA) or the quantification of viral DNA, have also been used to characterize the action of different LRAs in patient samples [26–28]. Recently, a new assay that detects HIV reactivation using a dual staining protocol of the viral protein p24 has been described [29]. However, due to the low number of cells responding to the LRAs in patients, current assays require the use of large quantities of cells to accurately measure viral transcription. Furthermore, the detailed characterization of the different cell subsets responding to LRAs has been scarce so far, since it requires the previous isolation of the specific cell subsets under evaluation. In order to overcome these limitations, we have recently reported a novel RNA FISH/flow method, which is based on the quantification of viral RNA by flow cytometry allowing the quantification and phenotyping of cells expressing HIV-1 RNA molecules at the single cell level [30,31]. Importantly, HIV-1 RNA expressed in different subpopulations of CD4⁺ T cells can be successfully determined by this novel system.

Here, we have used and validated the RNA FISH/flow assay as a novel methodology suitable to evaluate compounds that can be pursued to reactivate the latent virus in patient-derived HIV infected cells. Using this methodology, we have characterized the specific responses of different CD4⁺ T cell subpopulations to the action of several LRAs families and their combinations. Overall, in CD4⁺ T cells we found that, on average, 16.28% of cells containing HIV-1 DNA were able to reactivate HIV with the most potent LRAs tested. From these cells, only a small fraction (~10%) produced the viral protein p24. Furthermore, we observed heterogeneous responses of specific cell differentiation phenotypes to these compounds, and we identified the combination of Romidepsin plus Ingenol as the most effective drug combination to efficiently increase HIV transcription and p24 production in most CD4⁺ T cell subsets. These findings highlight the difficulty to find LRAs able to reactivate HIV present in all cellular reservoirs; an essential requirement for the “kick and kill” therapeutic strategy to successfully impact persisting HIV in infected patients.

Results

HIV reactivation kinetics with single and combined latency reversal agents in the latently infected cell line J-Lat

In order to evaluate the potency and timing of the different LRAs at reactivating latent HIV, we initially tested them in the latently infected cell line J-Lat (clone 10.6), which contains integrated but transcriptionally competent HIV proviruses that express the green fluorescence protein (GFP) after viral reactivation. We evaluated the following families of LRAs: HDACi (Panobinostat and Romidepsin), PKC agonists (Ingenol and Bryostatin-1) and a bromodomain inhibitor (JQ1). Drugs were used at concentrations previously shown to be effective at reversing HIV latency [23,32,33]. To best measure HIV reactivation and in order to avoid the loss of GFP signal due to the cell death of highly viral-reactivated cells, we treated cells with the pan-caspase inhibitor Q-VD-Oph before the addition of the compounds. Previous results showed that J-Lat cells and CD4⁺ T cells from patients stimulated with Panobinostat expressed

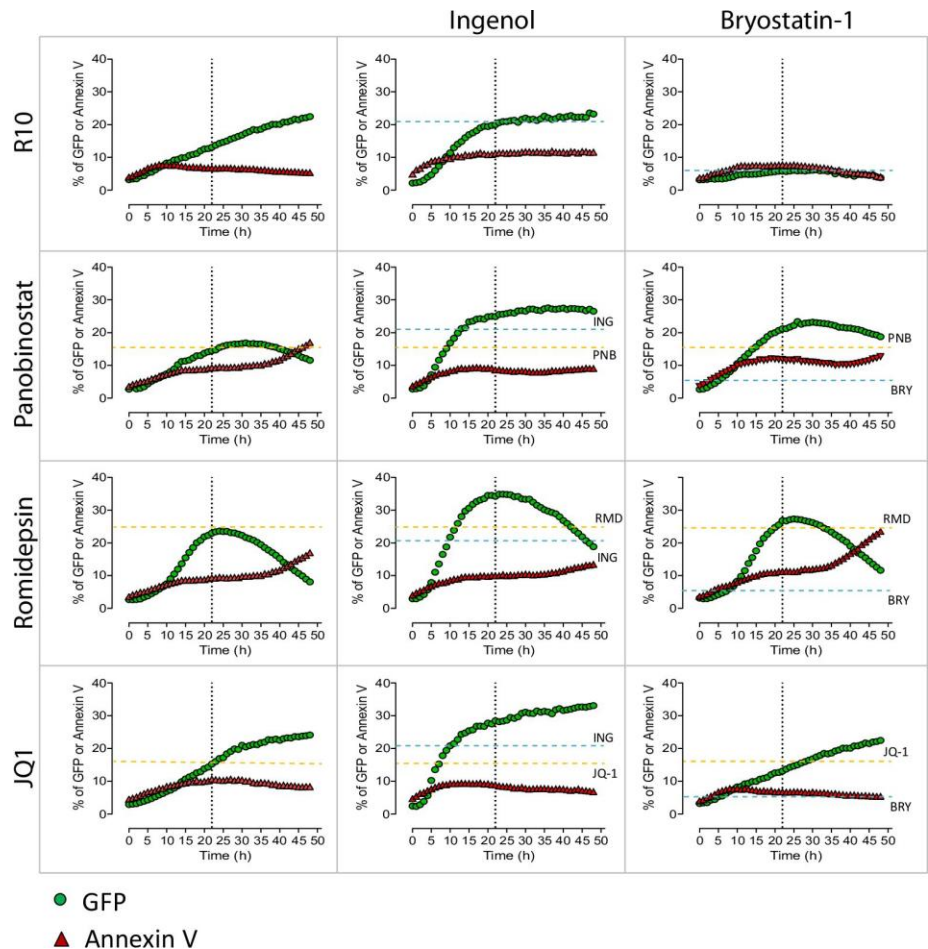


Fig 1. HIV reactivation kinetics in the latently infected cell line J-Lat. J-Lat cells were incubated for 50h with medium (R10), single LRAs or the combination of different families of these compounds; Panobinostat (PNB, 30 nM), Romidepsin (RMD, 40 nM), Ingenol (ING, 100 nM), Bryostatin-1 (BRY-1, 10 nM) and JQ1 (1 μ M). Percentage of GFP⁺ (in green) and Annexin V⁺ (in red) cells was monitored each hour using the IncuCyte ZOOM live cell imaging system (Essen Bioscience). Dashed lines show the effect at 22h for the single drugs Panobinostat, Romidepsin and JQ1 (in yellow) and for Ingenol and Bryostatin-1 (in blue). Dotted lines represent 22h.

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007991.g001>

higher levels of GFP and HIV-1 RNA, respectively, when cells were simultaneously treated with the pan-caspase inhibitor (S1A and S1B Fig).

In J-Lat cells, after incubation with single LRAs and a detailed monitoring of the viral dynamics, we observed that viral reactivation for most LRAs tested reached its maximum or a plateau after 20-24h of drug exposure, except for JQ1 that gradually increased the expression of GFP during the entire incubation period (50h). Romidepsin induced the highest reactivation level (24% of GFP⁺ cells), followed by Ingenol and Panobinostat (20 and 15% of GFP⁺ cells, respectively) (Fig 1). In this model of latent infection, Bryostatin-1 did not induce a significant viral reactivation. In addition, we analyzed the effect that the combination of different families of LRAs had on HIV transcription. Romidepsin plus Ingenol was the most potent combination of LRAs, reaching values of 35% of GFP⁺ cells. Moreover, we also observed an additive effect at reactivating HIV when Ingenol was combined with Panobinostat and with

JQ1 (27 and 28% of GFP⁺ cells, respectively). Importantly, in our experimental system, we observed that after 20–24h of drug treatment neither the single compounds nor their combinations induced more than 12% of cell apoptosis in J-Lat cells ([Fig 1](#)). Next, we tested the ability of the RNA FISH/flow assay to detect HIV-1 RNA and the viral protein p24 after the administration of LRAs. J-Lat cells were cultured with Romidepsin or with Romidepsin plus Ingenol for 22h ([S2A Fig](#)). We observed that, as previously shown [[30,34](#)], the RNA FISH/flow technology is able to distinguish two HIV-1 RNA positive populations: single HIV-1 RNA⁺ cells, and cells expressing both HIV-1 RNA and p24. Importantly, the population of cells expressing HIV-1 RNA and p24 was highly abundant (~90% of cells) when the culture was treated with the combination of the 2 LRAs, compared to single LRAs (~50% of cells) ([S2A Fig](#)). These values corresponded to percentages of GFP⁺ and HIV-1 RNA⁺ cells of 58.1% for Romidepsin alone and 90.2% for Romidepsin plus Ingenol ([S2B Fig](#)). Differences in the proportion of positive cells between these results and those provided in [Fig 1](#) are more likely due to the read out and the normalization method used to quantify viral reactivation with the different assays. Overall, we determined 22h as the more adequate timing to observe viral reactivation with all tested LRAs.

Detection of HIV-1 RNA after viral reactivation with single and combined LRAs in primary CD4⁺ T cells

First, we measured drug toxicity induced by the addition of LRAs to primary CD4⁺ T cells. Early apoptosis, late apoptosis and cell death were identified as shown in [S3A Fig](#). Overall, LRAs induced a maximum median of 11.34% of cell death (condition Romidepsin plus Ingenol) when drugs were added for 22h to previously-isolated CD4⁺ T cells obtained from uninfected donors ([S3C Fig](#)). However, under our experimental conditions, using the pan-caspase inhibitor Q-VD-OPh, no more than 3.04% of cell death was quantified ([S3B Fig](#)). Moreover, in CD4⁺ T cell subsets we observed that T_{TD} and T_{EM} cells, the more differentiated cell subsets, were more susceptible to cell death, especially when treated with the combination of Romidepsin and Ingenol (~10% dead cells, [S3D Fig](#)). On the contrary, T_{CM} and T_{NA} cells showed the lowest percentages of cell death when treated with different LRAs (maximum 2–3% of cell death) ([S3D Fig](#)). Drug toxicities in the absence of the caspase inhibitor are shown in [S3E Fig](#). Of note, drug toxicity that remains despite Q-VD-OPh treatment might be caused by other cell death mechanisms, such as pyroptosis or cell necrosis [[35](#)]. Overall, Romidepsin plus Ingenol was the most toxic combination of drugs in all CD4⁺ T cell subpopulations. Nevertheless, even in this condition drug toxicity still remained relatively low after 22h of cell culture, and thus it is very unlikely that drug toxicity might preclude the interpretation of the viral reactivation assays.

Then, we tested the potential of LRAs to reactivate latently HIV-infected cells in fresh samples from 9 ART-treated individuals. At least 6x10⁶ isolated CD4⁺ T cells were cultured per condition during 22h, and a total of 13 conditions were set up for each patient. After viral reactivation, cells were subjected to the RNA FISH/flow assay in order to evaluate the frequency of cells that responded to the action of LRAs and were able to reactivate the latent provirus. The sensitivity of this assay at detecting HIV-1 RNA⁺ cells was previously established at 10 HIV-RNA⁺ cells per million cells [[30](#)]. The representative flow cytometry gating strategy used to identify HIV expression and production of the viral protein p24 in different subpopulations of CD4⁺ T cells is shown in [S4A Fig](#). Overall, most tested LRAs and the combination of different families of LRAs significantly increased the frequency of cells expressing HIV-1 RNA in most patients compared to the non-reactivated control ($p < 0.05$) ([Fig 2A](#)). For single LRAs, we observed that Ingenol, Romidepsin and Panobinostat increased the proportion of HIV-1 RNA

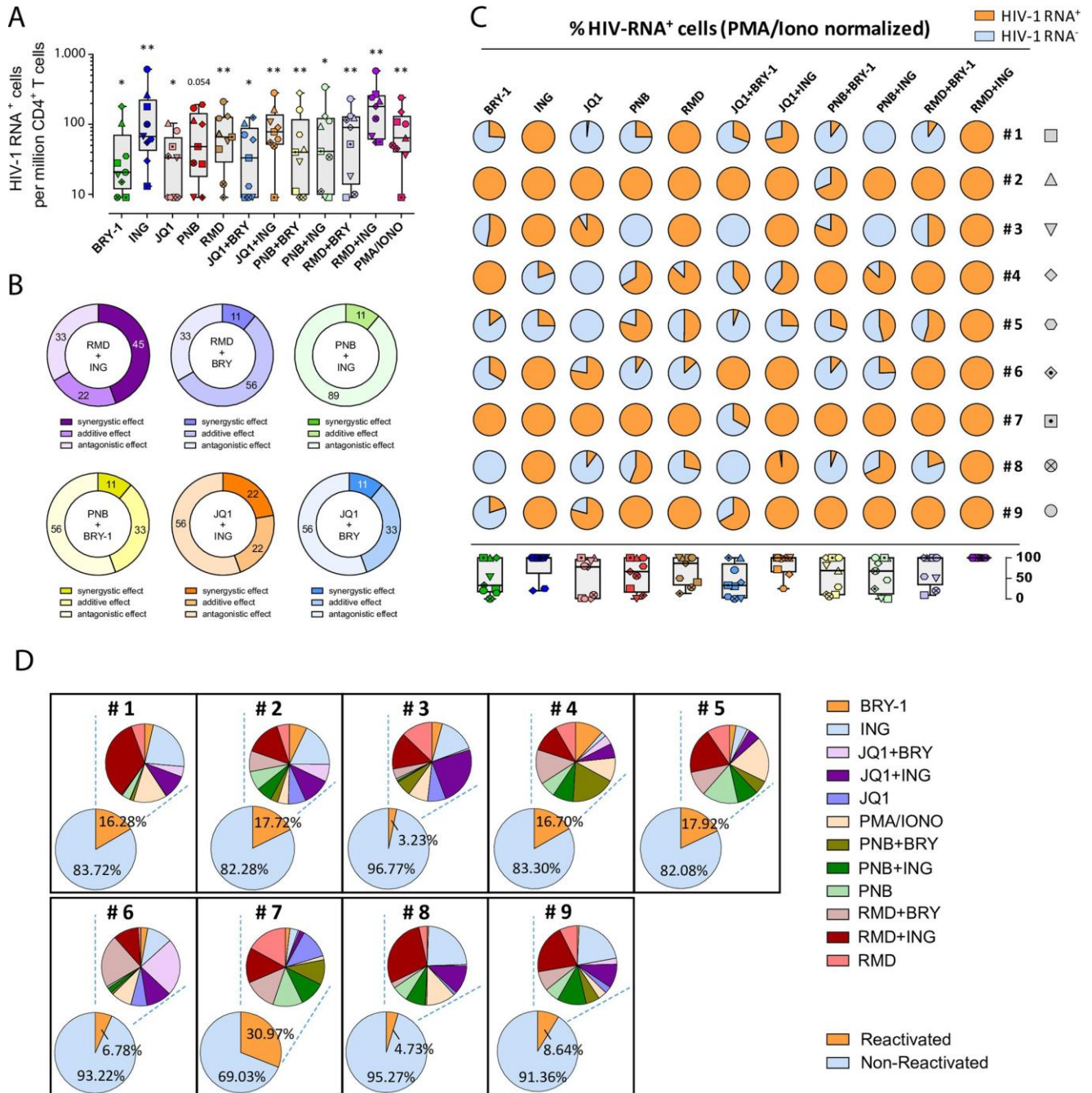


Fig 2. Detection of cells expressing HIV-1 RNA after viral reactivation with different LRAs. Freshly isolated CD4⁺ T cells from 9 ART-suppressed HIV-infected individuals were reactivated with different LRAs for 22h and subjected to the RNA FISH/flow protocol for detection of HIV transcripts. Drug concentrations were as follows: 40 nM Romidepsin (RMD), 30 nM Panobinostat (PNB), 1 μM JQ1, 100 nM Ingenol (ING), 10 nM Bryostat-1 (BRY-1), 81 nM PMA plus 1 μM Ionomycin (IONO) or media alone. **A.** Proportion of cells expressing HIV-1 RNA in CD4⁺ T cells for each condition normalized to the medium control from individual patients are shown. Medians and min and max ranks are represented and statistical comparisons with the control medium were performed using the Wilcoxon test. [†] p<0.05, [‡] p<0.01. **B.** Percentage of patients showing synergistic, antagonistic or additive effects (Bliss independence model) on HIV reactivation are shown as individual ring graphs for each combination of different LRA families studied. **C.** Proportion of HIV-transcribing cells relative to the positive control PMA/Ionomycin. Pies for individual patients normalized to the positive control and median values for all patients are represented in a box and whisker plot graph. HIV-1 RNA⁺ and HIV-1 RNA⁻

fractions are shown in orange and blue, respectively. **D**, Fraction of the HIV-reservoir susceptible to HIV reactivation after LRA treatment in CD4⁺ T cells from 9 ART-suppressed patients. Lower pies show the proportion of reactivated and non-reactivated cells. Upper pies show the fraction of reactivated cells after treatment with each compound depicted in the adjacent legend. We next calculated the percentage of the HIV-transcriptionally active viral reservoir after exogenous reactivation with the LRAs. We observed that between 3 and 31% (median value of 16.28%) of the total cells that encompass the viral reservoir (measured as the number of cells containing proviral DNA) were capable of transcribing HIV-1 RNA after viral reactivation (**Fig 2D**). The potency of each LRAs and their combinations in each individual patient is also shown in **Fig 2D**. Thus, while in general only a fraction of cells harboring HIV-1 DNA can be reactivated by current available LRAs, differences in terms of strength and consistency of this viral reactivation are observed in the whole population of CD4⁺ T cells from different ART-treated individuals.

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007991.g002>

expressing cells to higher levels (median values of 67 for Ingenol, 66 for Romidepsin and 48 for Panobinostat, expressed as cells per million, $p = 0.0039, 0.0039$ and 0.054 , respectively, compared to the media control) than Bryostatins-1 or JQ1 (median values of 19 for Bryostatins-1 and 33 for JQ1, $p = 0.015$ and 0.039 , respectively). However, only Ingenol was effective at reactivating HIV in all tested patients, compared to Romidepsin (8 out of 9 patients) and Panobinostat (7 out of 9 patients). For the combinations of LRAs, we observed that Romidepsin plus Ingenol promoted the highest induction of cells expressing HIV-1 RNA in all tested patients ($p = 0.0039$, fold change (FC) = 3.50, compared to the negative control) (**Fig 2A**). Of note, in this specific condition the proportion of HIV-1 RNA⁺ cells was even higher than the resulting proportion of cells cultured with the positive control of PMA and Ionomycin (median values of 180 for Romidepsin plus Ingenol and 64 for PMA and Ionomycin, $p = 0.0078$). We also observed that the combination of JQ1 with Ingenol induced a high proportion of cells expressing HIV-1 RNA (median value of 78, $p = 0.0039$) in 8 out 9 patients (**Fig 2A**). Furthermore, we calculated the synergistic, additive or antagonistic effects of the different combinations of LRAs using the Bliss independence Model [33,36]. We observed that Romidepsin and Ingenol presented the highest synergistic effect in 45% of the patients analyzed, while the other drug combinations promoted drug synergy in 22% of the patients at the most (**Fig 2B**). Moreover, it should be noted that the combination of Panobinostat and Ingenol induced an important antagonistic effect in 89% of the patients tested (**Fig 2B**). The synergistic effects between the different families of the LRAs in the individual patients are depicted in **S4B Fig**. Next, we normalized the values of RNA-expressing cells to the positive control, PMA and Ionomycin. Supporting the results showed in **Fig 2B**, we observed that Ingenol and Romidepsin were equally potent at reactivating cells expressing HIV than the positive control in 7 out of 9 and in 5 out of 9 patients, respectively. A more modest effect was observed for Panobinostat, Bryostatins-1 and JQ1 alone (**Fig 2C**). The best drug combinations again were Romidepsin plus Ingenol and JQ1 plus Ingenol, which increased the proportion of HIV-1 RNA expressing cells at levels comparable to the positive control in 9 out of 9, and 6 out of 9 patients, respectively. In addition, in patients #1, 3, 6 and 8, Panobinostat only reactivated at most half of the values obtained with the positive control. In the same patients, Ingenol was equally potent than the positive control; however, the combination of both drugs decreased the proportion of cells expressing HIV-1 RNA compared with the single drug Ingenol, compatible with an antagonist effect when both compounds are combined (**Fig 2C**). Besides, since we have recently described that CD4⁺ T cells expressing CD32^{dim} are enriched in HIV transcripts in vivo, and that viral infection upregulates this marker [30,37], we analyzed the expression of CD32^{dim} in viral-reactivated cells using different LRAs. We observed that CD32^{dim} was consistently upregulated after the pharmacological reactivation of HIV (**S4C Fig**).

Detection of HIV protein p24 after viral reactivation with LRAs in primary CD4⁺ T cells from HIV-infected patients

First, we determined the sensitivity of the assay at detecting HIV-1 RNA⁺ and p24⁺ cells. Primary ex vivo infected cells were spiked into uninfected cells at different ratios and the mixture

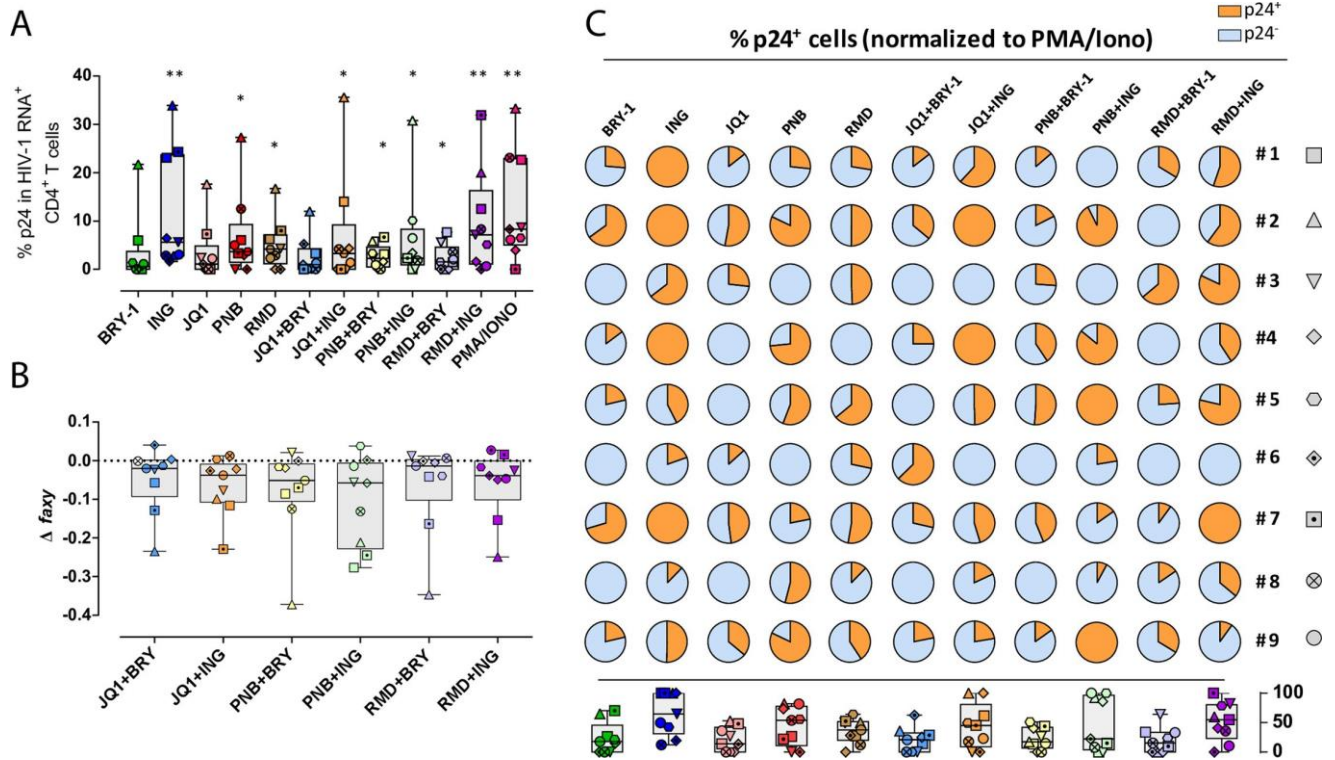


Fig 3. Proportion of CD4⁺ T cells expressing the viral protein p24 after viral reactivation with different LRAs. **A.** The proportion of HIV-transcribing CD4⁺ T cells that simultaneously produce the viral protein p24 is shown. Comparisons with the control medium were performed using the Wilcoxon test. * p<0.05, ** p<0.01. **B.** Calculation of synergistic, antagonistic or additive effect after the combination of LRAs using the Bliss independence model. White symbols correspond to patients in which production of p24 was not detected. Medians and min to max ranks are represented in panels A and B. **C.** Normalization of the percentage of HIV-transcribing cells expressing p24 relative to PMA/Ionomycin. Pies for individual patients and median values for all patients are represented in a box and whisker plot graph. Fractions of HIV-1 RNA⁺ cells expressing p24 and lacking the expression of p24 are shown in orange and blue, respectively.

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007991.g003>

was then subjected to the RNA FISH/flow protocol. We observed that dual expression of HIV-1 RNA and p24 determined by the experimental curve showed consistency with the predicted curve at all of the dilutions tested, establishing a limit of detection of 10–20 positive events per million cells (S2C Fig). Next, in order to determine whether LRAs and their different combinations were also capable of inducing the expression of the viral protein p24, we performed the RNA FISH/flow protocol with the simultaneous staining of intracellular p24. We analyzed the percentage of cells transcribing HIV-1 RNA that were also able to produce p24. As shown in Fig 3A, cells expressing p24 significantly increased after the addition of all LRAs but two, Bryostatin-1 and JQ1. Ingenol, Romidepsin and Panobinostat were the most potent LRAs at inducing the translation of viral transcripts (median values of 5.62, 4.17 and 3.64%, respectively). The combination of LRAs produced significant proportions of cells expressing p24, except when JQ1 was combined with Bryostatin-1 (median value of 0.99%). The positive control PMA and Ionomycin was the most potent drug (median value of 8.33%), followed by the combination of Ingenol and Romidepsin (median value of 7.14%, Fig 3A). However, in general, we did not detect more than 10% of HIV-1 RNA⁺ cells expressing p24. Of note, the combination of JQ1 and Ingenol produced high levels of cells transcribing HIV-1 RNA, however this combination only induced p24 in a modest proportion of cells (3.23%). Moreover, no synergies were detected for the production of the viral protein p24 in any of the combinations

tested and, in concordance with the transcription data, we determined an antagonistic effect in the majority of patients when the combination of Panobinostat and Ingenol was used for viral reactivation (Fig 3B). Next, we normalized the proportion of p24⁺ cells to the maximum values obtained with the positive control (Fig 3C). In agreement with the results described in Fig 2C, we observed a negative effect when we combined Panobinostat and Ingenol (i.e patients #1 and 3) (Fig 3C). Furthermore, we observed a statistical significant correlation between the proportion of HIV-1 RNA⁺ cells and the percentage of the cells that are able to produce p24 after different LRA treatments ($p < 0.0001$) (S4D Fig).

Taken together, individual LRAs have different capabilities of increasing the proportions of HIV-1 RNA and p24-expressing CD4⁺ T cells. In general, there was an agreement between the frequency of cells expressing HIV-1 RNA and p24, but some disconnection was observed for some LRAs; Romidepsin and Ingenol was the combination inducing the larger proportion of RNA-expressing cells, however PMA and Ionomycin outperformed them in their ability to induce p24-expressing cells. This is in agreement with previous reported results that determined that the positive control (anti-CD3/CD28 antibody-coated beads) was able to induce higher levels of multiply spliced Tat-Rev HIV-1 transcripts compared to unspliced HIV-1 RNA. On the contrary, Romidepsin induced higher levels of unspliced HIV-RNA compared to Tat-Rev transcripts [38]. Moreover, we detected an antagonistic effect, in both HIV-1 RNA⁺ and p24⁺ cells, when Panobinostat and Ingenol were combined.

Heterogeneous responses to LRAs of different CD4⁺ T cell subpopulations

Next, we focused our investigations on the capabilities of LRAs at reactivating HIV in different CD4⁺ T cell subpopulations. To do so, we isolated fresh CD4⁺ T cells from ART-treated patients and after LRA addition, transcription of HIV was measured by the RNA FISH/flow assay. Firstly, we assessed the impact of the different LRAs on the phenotypic markers used to identify the different CD4⁺ T cell subpopulations. We observe that the proportions of the different subsets were, in general, well maintained after treatment with the different drugs. Only very small differences were detected in some conditions (S5A Fig). We consider that these changes are negligible and it should not significantly impact the proportion of virally-reactivated cells. Moreover, we observed that Romidepsin increased the proportion of memory cells transcribing HIV-1 RNA compared to the control, including central memory (T_{CM}) (FC = 2.33, $p = 0.0039$), effector memory (T_{EM}) (FC = 4.24, $p = 0.007$) and transitional memory (T_{TM}) (FC = 4.06, $p = 0.046$) cells, and also naïve cells (T_{NA}) (FC = 1.72, $p = 0.0078$) (Fig 4A). However, Panobinostat was less potent at inducing HIV-1 RNA⁺ cells in T_{TM}; indeed, we observed the highest effect in T_{CM} (FC = 2.11, $p = 0.0039$) and a modest effect in T_{EM} and T_{NA} (FC = 2.32, $p = 0.031$ and FC = 1.27, $p = 0.0156$, respectively). Although significant, JQ1 induced a modest frequency of cells transcribing HIV-1 RNA in the majority of subsets analyzed, except for T_{SCM}. Moreover, Ingenol preferentially reactivated T_{CM} (FC = 4.05, $p = 0.0039$) and T_{TM} (FC = 5.27, $p = 0.0156$) in most patients, which reached statistical significance. Although not significant, Ingenol also reactivated HIV in T_{EM} cells in 4 out of 9 patients. Finally, Bryostatins-1 reactivated very modestly some subsets, including T_{NA}, T_{TD} and T_{CM} (FC = 1.49, $p = 0.0156$; FC = 1.94, $p = 0.031$; and FC = 1.22, $p = 0.0156$, respectively) (Fig 4A). A summary heatmap for the effect of single drugs is shown in S6A Fig. In addition, we analyzed the data stratified by CD4⁺ T cell subsets (Fig 4B). In general, T_{CM} and T_{NA} subpopulations were successfully reactivated by almost all tested drugs. T_{CM} and T_{TM} were more efficiently reactivated by Ingenol, while T_{EM} cells transcribed more HIV when cells were treated with Romidepsin. Moreover, HIV transcription was induced in T_{NA} cells more robustly after the addition of Ingenol and Romidepsin, and in T_{SCM} after Ingenol treatment. T_{TD} cells

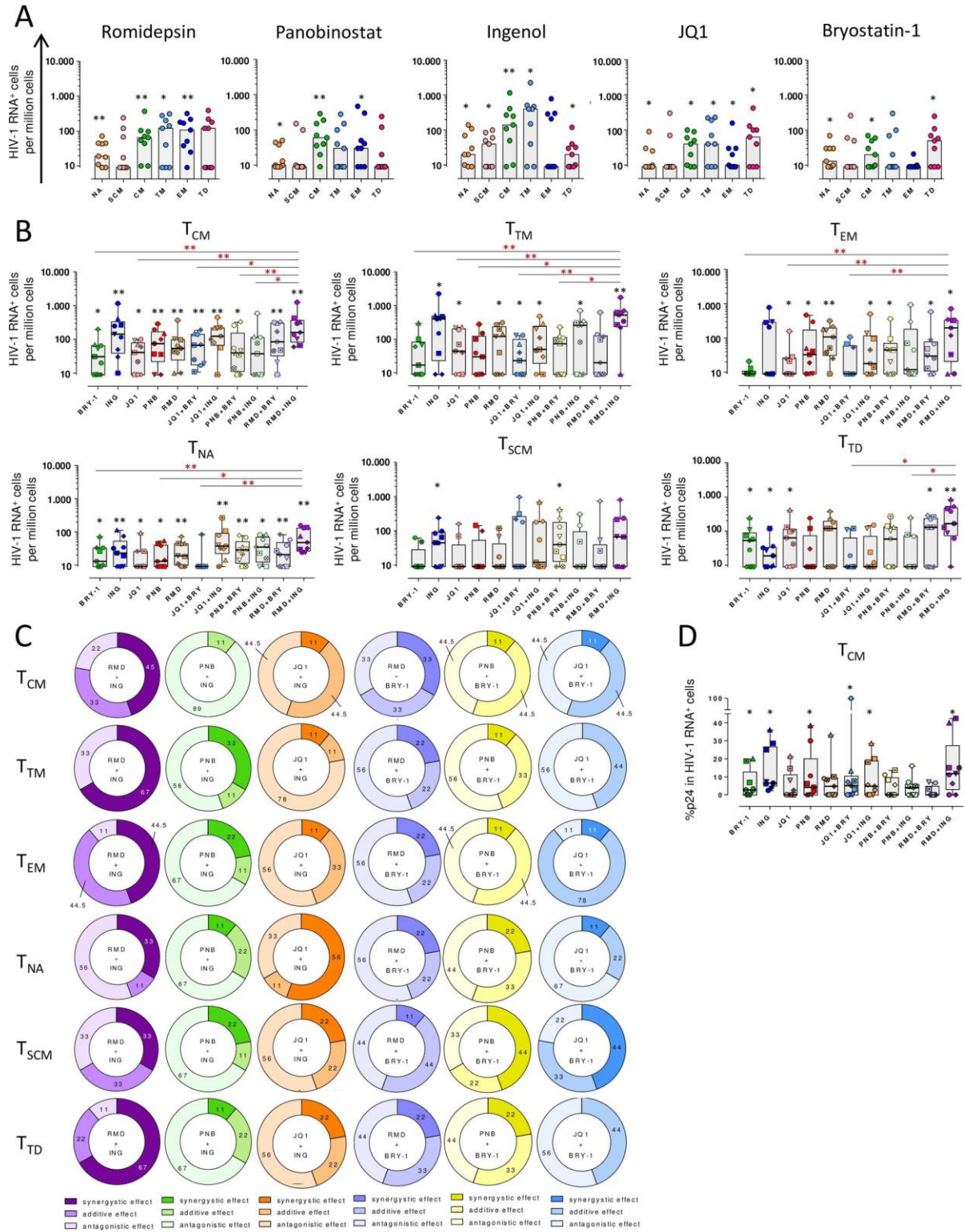


Fig 4. Proportion of cells expressing HIV-1 RNA and p24 after viral reactivation in different CD4⁺ T cell subpopulations. **A.** Proportion of cells transcribing HIV-1 RNA after viral reactivation with single LRAs in the following populations: T_{NA}, T_{SCM}, T_{CM}, T_{TM}, T_{EM} and T_{TD}. Medians are shown. **B.** Proportion of HIV-1⁺ cells per million cells in each CD4⁺ T cell subpopulation with all tested drugs and their combinations. **C.** Proportion of patients showing synergistic, antagonistic or additive effects (Bliss independence model) after HIV reactivation with combinations of LRAs are shown for each CD4⁺ T cell subset. Percentage of patients responding to LRAs interactions are shown for each cell subset. **D.** Proportion of HIV-1 RNA⁺ T_{CM} cells expressing the viral protein p24. Black asterisks denote statistical significance compared with the negative control (media) using a Wilcoxon test. Red asterisks denote statistical significance compared with the combination of Romidepsin plus Ingenol using a Friedman test followed by Dunn's post hoc tests. Medians and min to max ranks are represented in panels B and D. † p<0.05, †† p<0.01.

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007991.g004>

showed a distinct pattern of reactivation, since Ingenol, Bryostatatin-1 and JQ1 were the only single LRAs that increased the proportion of cells expressing HIV in this specific subset (Fig 4B). Importantly, the combination of Romidepsin and Ingenol induced the largest proportion of cells transcribing HIV in most CD4⁺ T subsets, outperforming most LRAs and their combinations (FC = 3.44, p = 0.0039 for T_{CM}; FC = 6.72, p = 0.0078 for T_{TM}; FC = 6.96, p = 0.0156 for T_{EM}; FC = 7.61, p = 0.0078 for T_{TD}; FC = 2.54, p = 0.0039 for T_{NA}; and FC = 2.61, p = 0.062 for T_{SCM}) (Fig 4B). However, within the T_{SCM} subset only the combination of Panobinostat plus Bryostatatin-1 was able to induce a significant increase of HIV-1 RNA⁺ cells (Fig 4B). A summary heatmap on the effect of drug combinations in the different CD4⁺ T cell subsets is shown in S6B Fig. Finally, we calculated the interactions between each drug combination in the individual patients (S6C Fig). In the majority of patients, the combination of Romidepsin and Ingenol was synergistic in memory cells (T_{CM} 45%, T_{TM} 67%, T_{EM} 44.5% and T_{TD} 67%) (Figs 4C and S6C). However, the combination of drugs that induced significant synergy in T_{NA} cells was JQ1 plus Ingenol (56%), and in T_{SCM} Panobinostat plus Bryostatatin-1 (44%). As we already observed in the total CD4⁺ T cell population, the combination of Panobinostat and Ingenol produced an antagonistic effect in memory cells (T_{CM} 89%, T_{EM} 67%, T_{TM} 56%, T_{SCM} 67% and T_{TD} 67%). However, for the T_{TM} subset the combination of JQ1 and Ingenol was also antagonistic in most patients (78%) (Figs 4C and S6C). The reactivation induced by the positive control, PMA and Ionomycin, was not evaluated in CD4⁺ T cells subsets due to the difficulty to gate accurately the different CD4⁺ T subpopulations.

Next, we investigated not only the capabilities of LRAs to induce HIV transcription, but also to generate the viral protein p24 expression in the different CD4⁺ T cell subsets. We observed that the combination of Romidepsin and Ingenol was able to induce a substantial increase of cells producing p24 in T_{CM} cells in most patients (Fig 4D), although it did not induce a synergistic effect (S6D Fig). Of note, for all remaining cell subsets, we were not able to detect significant number of cells expressing p24. The low percentage of cells expressing p24 and the low absolute number of HIV-1 RNA⁺ cells detected in the remaining subsets may explain this observation.

Overall, different CD4⁺ T cells subsets have different susceptibilities to LRAs and their combinations, but in general, we found that Romidepsin plus Ingenol was the most potent combination of LRAs, increasing significantly the proportion of HIV⁺ cells and producing a synergistic effect compared to the individual drugs. We also observed that T_{CM} and T_{NA} subpopulations presented broader susceptibility to the different families of LRAs, despite T_{TD} and, specially, T_{SCM} were more resistant to HIV reactivation. Furthermore, we determined a robust antagonistic effect when Panobinostat and Ingenol were used in combination in most subsets analyzed as we observed in the whole population of CD4⁺ T cells.

Discussion

The elimination of the latently infected cell reservoir is believed to be the most important requirement to definitively eradicate HIV from the human body. Currently, therapeutic

infected primary resting cells [13], while Wei et al. demonstrated that Romidepsin induced an important increase in HIV-1 transcription compared to Vorinostat in both total memory and resting cells from HIV infected patients [43]. Moreover, we observed that JQ1 and Bryostatatin-1 reactivated HIV-1 very poorly. In contrast to our results, it has been previously showed that in resting CD4⁺ T cells from HIV-patients only Bryostatatin-1 induced an increment in the production of RNA compared to the HDAC inhibitors Romidepsin, Panobinostat and Vorinostat, and the bromodomain inhibitor JQ1 [23]. In the study, the authors used qPCR to measure viral reactivation, thus a potent induction of HIV in a limited number of cells might help to explain the discrepancy between both studies. Another study from Jiang et al. [44], described a synergistic effect when JQ1 plus Ingenol were combined, but in our work we observed an antagonistic effect in the 56% of the patients. The fact that different Ingenol molecules can be used for viral reactivation studies, the different methods used to detect viral reactivation, and the discrepancies observed between cell lines and primary CD4⁺ T cells in viral reactivation protocols [32], might explain this contradictory result.

Furthermore, we characterized the responses of each CD4⁺ T subpopulation to different LRAs. These investigations have rarely been performed before, mainly due to the difficulty to obtain enough cells from each CD4⁺ T cell subset to comprehensively quantify viral reactivation. In order to overcome this limitation, we used the novel RNA FISH/flow methodology that allows the simultaneous detection of HIV-1 RNA transcripts and the viral protein p24 at the single cell level without the need to previously isolate the fraction of cells being evaluated [30]. In general, each LRA was impacting differently the CD4⁺ T cell subpopulations; even drugs belonging to the same family had a differential effect on the same cell subsets. For instance, Panobinostat successfully reactivated HIV in T_{CM} cells, whereas Romidepsin was capable of impacting all memory cells (T_{CM}, T_{TM} and T_{EM}). Importantly, it has been shown that both drugs have different capacity to inhibit cell-associated HDAC activity [43]. Thus, it is tempting to speculate that differential expression of HDAC isoforms within different CD4⁺ T cell subsets could be associated to their intrinsic capability to reactivate latent HIV. In concordance with our results, in a recent study, cells treated with Panobinostat that reactivated HIV appeared to be long-lived whereas Romidepsin appeared to reactivate HIV in shorter life span cells [45]. This study calculated the life span of cells that reactivated HIV in vivo using mathematical models. Consistently, Banga et al. showed that Panobinostat was slightly more robust than Romidepsin at reactivating HIV in isolated resting memory CD4⁺ T cells, a fraction enriched in long-lived central memory cells [25]. We also observed that T_{CM} and T_{NA} cells have the broadest susceptibility to the different families of LRAs, and Ingenol was extremely efficient at reactivating T_{NA}, T_{SCM}, T_{CM} and T_{TM} but did not show a significant effect on T_{EM} cells. In this regard, a recent study determined that the majority of cells expressing HIV-1 RNA in the presence of Ingenol had a T_{CM}/T_{TM} and T_{EM} phenotype [31]. Additionally, while the T_{NA} subpopulation has not traditionally been considered as a cellular HIV reservoir, this subset has been recently described as a large inducible cell reservoir of both latent and replication competent virus at levels similar observed in T_{CM} [46], which is in concordance with our results. One of the main limitations of the present study is our inability to detect p24 in most of the cell subsets. In general, there was an agreement between the frequency of cells expressing HIV-1 RNA and cells producing p24. However, we were only able to detect p24 in the whole CD4⁺ T cell population and in T_{CM} cells. This is not the result of a poor sensitivity of the RNA FISH/flow method (10–20 positive cells per million), instead it might be explained by the low absolute number of HIV-RNA⁺ cells observed within subsets that were represented in small frequencies as i.e. T_{SCM}, T_{TM}, T_{EM} and T_{TD} (all below 30%).

We observed that long-lived cells such as T_{CM} or T_{SCM}, previously defined to be important in the long-term maintenance of HIV reservoirs in patients [19,20], have different

infected primary resting cells [13], while Wei et al. demonstrated that Romidepsin induced an important increase in HIV-1 transcription compared to Vorinostat in both total memory and resting cells from HIV infected patients [43]. Moreover, we observed that JQ1 and Bryostatins-1 reactivated HIV-1 very poorly. In contrast to our results, it has been previously showed that in resting CD4⁺ T cells from HIV-patients only Bryostatins-1 induced an increment in the production of RNA compared to the HDAC inhibitors Romidepsin, Panobinostat and Vorinostat, and the bromodomain inhibitor JQ1 [23]. In the study, the authors used qPCR to measure viral reactivation, thus a potent induction of HIV in a limited number of cells might help to explain the discrepancy between both studies. Another study from Jiang et al. [44], described a synergistic effect when JQ1 plus Ingenol were combined, but in our work we observed an antagonistic effect in the 56% of the patients. The fact that different Ingenol molecules can be used for viral reactivation studies, the different methods used to detect viral reactivation, and the discrepancies observed between cell lines and primary CD4⁺ T cells in viral reactivation protocols [32], might explain this contradictory result.

Furthermore, we characterized the responses of each CD4⁺ T subpopulation to different LRAs. These investigations have rarely been performed before, mainly due to the difficulty to obtain enough cells from each CD4⁺ T cell subset to comprehensively quantify viral reactivation. In order to overcome this limitation, we used the novel RNA FISH/flow methodology that allows the simultaneous detection of HIV-1 RNA transcripts and the viral protein p24 at the single cell level without the need to previously isolate the fraction of cells being evaluated [30]. In general, each LRA was impacting differently the CD4⁺ T cell subpopulations; even drugs belonging to the same family had a differential effect on the same cell subsets. For instance, Panobinostat successfully reactivated HIV in T_{CM} cells, whereas Romidepsin was capable of impacting all memory cells (T_{CM}, T_{TM} and T_{EM}). Importantly, it has been shown that both drugs have different capacity to inhibit cell-associated HDAC activity [43]. Thus, it is tempting to speculate that differential expression of HDAC isoforms within different CD4⁺ T cell subsets could be associated to their intrinsic capability to reactivate latent HIV. In concordance with our results, in a recent study, cells treated with Panobinostat that reactivated HIV appeared to be long-lived whereas Romidepsin appeared to reactivate HIV in shorter life span cells [45]. This study calculated the life span of cells that reactivated HIV *in vivo* using mathematical models. Consistently, Banga et al. showed that Panobinostat was slightly more robust than Romidepsin at reactivating HIV in isolated resting memory CD4⁺ T cells, a fraction enriched in long-lived central memory cells [25]. We also observed that T_{CM} and T_{NA} cells have the broadest susceptibility to the different families of LRAs, and Ingenol was extremely efficient at reactivating T_{NA}, T_{SCM}, T_{CM} and T_{TM} but did not show a significant effect on T_{EM} cells. In this regard, a recent study determined that the majority of cells expressing HIV-1 RNA in the presence of Ingenol had a T_{CM}/T_{TM} and T_{EM} phenotype [31]. Additionally, while the T_{NA} subpopulation has not traditionally been considered as a cellular HIV reservoir, this subset has been recently described as a large inducible cell reservoir of both latent and replication competent virus at levels similar observed in T_{CM} [46], which is in concordance with our results. One of the main limitations of the present study is our inability to detect p24 in most of the cell subsets. In general, there was an agreement between the frequency of cells expressing HIV-1 RNA and cells producing p24. However, we were only able to detect p24 in the whole CD4⁺ T cell population and in T_{CM} cells. This is not the result of a poor sensitivity of the RNA FISH/flow method (10–20 positive cells per million), instead it might be explained by the low absolute number of HIV-RNA⁺ cells observed within subsets that were represented in small frequencies as i.e. T_{SCM}, T_{TM}, T_{EM} and T_{TD} (all below 30%).

We observed that long-lived cells such as T_{CM} or T_{SCM}, previously defined to be important in the long-term maintenance of HIV reservoirs in patients [19,20], have different

susceptibilities to the LRAs tested. For instance, T_{SCM} were poorly reactivated with most drugs. Only the combination of Panobinostat and Bryostat-1, and to a lesser extent Ingenol, were able to significantly increase the proportion of HIV-1 RNA⁺ cells in this subset. This finding highlights the difficulty to identify LRAs with a mechanism of action broad enough to reactivate latent HIV present in all HIV-infected cells. Moreover, the lack of effect of the LRAs on T_{SCM} cells is a concern, since viral recrudescence from these long-lived cells might significantly preclude the *in vivo* long-term efficacy of LRAs tested in clinical trials. Thus, our results have important implications for rational design of therapies aimed at reversing HIV latency; the knowledge of the individual mechanisms that lead to viral reactivation in the population of cells that encompass the latent HIV reservoir will help with the development of LRAs with which to impact HIV persistence.

Importantly, we found that the combination of Romidepsin and Ingenol induced the highest frequency of HIV-1 RNA⁺ cells, even more than the positive control with PMA and Ionomycin, and this finding was consistent in all tested samples. To our knowledge, the combination of Romidepsin plus Ingenol has never been explored before in this setting. The independent mechanism of action of both drugs is most likely the responsible for the high number of HIV-1 RNA⁺ cells detected. This argument is supported by the observation that the combination of both drugs does not induce higher number of HIV-1 RNA molecules per cell (mean fluorescence intensity) (**SSB Fig**), instead it induces a broader spectrum of cells that are able to express HIV-1 RNA upon viral reactivation. Moreover, the synergistic effect was particularly evident in the T_{CM} and T_{TM} memory subsets, indicating that the differentiation or maturation status of the cells may be a critical determinant for a successful viral reactivation with the different LRAs. In this sense, it has been recently reported that CD4⁺ T cell subsets have distinct transcriptional profiles that are related to the level of HIV-1 infection and might modulate the response to external stimulus [47]. We also determined a robust antagonistic effect (89% in whole CD4⁺ T cells) when Panobinostat and Ingenol were combined. This is in agreement with the study presented by Larragoite et al. [48], in which they showed that the co-treatment with both drugs inhibited the reactivation of HIV in an *ex vivo* model of resting CD4⁺ T cells isolated from aviremic patients, despite a synergistic relationship was demonstrated in an *in vitro* latency cell model (J-Lat 10.6). The authors speculate that the inhibition induced by Panobinostat of the chaperone heat shock protein 90 (Hsp90), which is directly involved in the reversion of HIV-1 latency by Ingenol [49], might reduce the activation of the NF-κB pathway caused by the PKC agonist. This could explain the antagonistic effect observed when these two drugs are combined. In addition, it has also been observed that Panobinostat induces latency reversal by an Hsp90 independent way [48]. Further, these results manifest again the existing discrepancies between latently infected T cell lines and primary cell models of HIV-1 latency [32].

In conclusion, this study highlights the inability of current LRAs to fully reactivate HIV hidden in diverse cellular reservoirs. The identification of compounds with a broader reactivation capacity or the use of complementary drugs with different mechanisms of action will be needed to reactivate latent virus present in different cell types, where more likely diverse cellular pathways are implicated in silencing HIV.

Materials and methods

Ethics statement

PBMCs (peripheral blood mononuclear cells) from adults (>18 years old) HIV-1-infected patients were obtained from the HIV unit of the Hospital Universitari Vall d'Hebron in Barcelona, Spain. Written informed consent was provided by all patients who participated in this

study, and the protocols used were approved by the Comitè d'Ètica d'Investigació Clínica (Institutional Review Board numbers 39–2016 and 196–2015) of the Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Spain. All samples were obtained only from adults and were totally anonymous and untraceable.

Study samples

Samples from HIV-1-infected patients under ART with CD4⁺ T cell counts higher than 100 cells/mm³ and viral load <50 cop/ml for a mean (min-max) of 3 (1–6.5) years were recruited in the HIV unit of the Hospital Universitari Vall d'Hebron in Barcelona (Spain) and were included in this study. Information on plasma viral loads, CD4⁺ T cell counts, and time on ART for treated patients is summarized in [S1 Table](#).

Cells

Fresh PBMCs were obtained from a whole blood donation (400ml) from HIV-infected patients by Ficoll-Paque density gradient centrifugation and cells were immediately used with- out previous cryopreservation. Isolated CD4⁺ T cells (MagneSort Human CD4⁺ T Cell Enrichment; eBioscience) were cultured in RPMI medium (Gibco) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Gibco), 100 µg/ml streptomycin (Capricorn Scientific) and 100 U/ml penicillin (Capricorn Scientific), (R10). The human latently infected cell line J-Lat (clone 10.6) was obtained through the NIH AIDS Reagent Program from Eric Verdin [50]; cells were grown in R10 and maintained at 37°C in a 5% CO₂ incubator.

Viral reactivation with latency reversal agents

Isolated CD4⁺ T cells were stimulated during 22h with latency reversal agents (LRAs) at the following concentrations: 40 nM Romidepsin (Selleckchem), 30 nM Panobinostat (Selleckchem), 1 µM JQ1 (Sigma-Aldrich), 100 nM Ingenol-3-angelate (Sigma-Aldrich), 10 nM Bryostat-1 (Tocris Bioscience), the positive control (PMA 81 nM plus Ionomycin 1 µM, both from Abcam), or the negative control (media alone, R10). Drugs were used at concentrations previously shown to be effective at reversing latency in studies performed in CD4⁺ T cells from HIV-infected individuals as well as studies performed in latency models in vitro [23,32,33]. All compounds were reconstituted in DMSO at the maximum concentration of 0.006%. Moreover, in order to prevent cell death induced by the reactivation of HIV and to evaluate the reactivation effect without confounding variables, cells were pre-treated with a pan-caspase inhibitor named Q-VD-OPh (quinolyl-valyl-O-methylaspartyl-[-2,6-difluorophenoxy]-methyl ketone, Selleckchem) [51,52]. Q-VD-OPh is a potent inhibitor for caspases 1, 3, 8 and 9, which are involved in the intrinsic and extrinsic apoptotic pathways, inhibiting consequently the specific cell death induced by HIV [53–56]. In all experiments, cells were treated with 10 µM of Q-VD-OPh for at least 2h prior to the addition of the latency reversal agents.

Detection of viral reactivation and cell death by the InCuCyte Live-Cell analysis technology

HIV reactivation and toxicity effects induced by the different LRAs were longitudinally and exhaustively determined in the latently infected cell line J-Lat 10.6. Viral reactivation and cell death was monitored using the InCuCyte ZOOM live cell imaging system (Essen Bioscience). The latently infected cell line J-Lat contains integrated but transcriptionally latent HIV proviruses, in which the reporter gene GFP replaces the *nef* coding sequence [50]. GFP was used to measure viral reactivation and the apoptotic marker Annexin V (Essen Bioscience) was used

to determine cell death induced by the drugs or by cytopathic effect. Briefly, cells were pre-treated with the pan-caspase inhibitor Q-VD-OPh for at least 2h and then seeded at 25,000 cells per well in a 96 well plate. Single LRA or combination of different families of LRAs were added to the corresponding well and Annexin V reagent (1:200) was immediately added on cells, with a final well volume of 100 μ l. Images were captured every hour for 48h from 2 independent wells per condition. Green (HIV expression) and red (Annexin V) object counts per well (1/mm²) were quantified at each time point and values were normalized to the confluence of each well.

Drug toxicity assays in CD4⁺ T cells

Cell toxicity was assessed for single drugs and the combination of different LRA families in previously isolated CD4⁺ T cells from three independent uninfected donors. CD4⁺ T cells were pre-incubated with the pan-caspase inhibitor Q-VD-OPh for 2h. Afterwards, CD4⁺ T cells (200,000 cells per well) were incubated for 22h with the compounds. Then, cells were stained with the apoptotic marker Annexin V (PE, Biolegend) and a viability dye (LIVE/DEAD fixable Violet Dead Cell Stain kit, Invitrogen) in order to identify the following stages of cell death: live cells (Annexin V⁻ Viability⁻), early apoptotic cells (Annexin V⁺ Viability⁻), late apoptotic+ necrotic cells (Annexin V⁺ Viability⁺) and total cell death (Annexin V⁻ Viability⁺). In addition, different surface markers, including CD3 (Pe-Cy7, BD Biosciences), CD4 (AF700, BD Biosciences), CD45RO (BV605, Biolegend) and CD27 (FITC, Biolegend), were used to identify drug toxicity induced in the different CD4⁺ T cell subpopulations. The CD4⁺ T cell subsets were identified as follows: Naïve (T_{NA}) and Stem Cell Memory (T_{SCM}) (CD3⁺CD4⁺CD27⁺CD45RO⁻), Central (T_{CM}) and Transitional Memory (T_{TM}) (CD3⁺CD4⁺CD27⁺CD45RO⁺), Effector Memory (T_{EM}) (CD3⁺CD4⁺CD27⁻CD45RO⁺) and Terminally Differentiated cells (T_{TD}) (CD3⁺CD4⁺CD27⁻CD45RO⁻).

RNA FISH/flow assay of single cells expressing HIV-1 RNA transcripts and p24 protein after viral reactivation

PBMCs from nine ART-treated HIV-infected patients were obtained from a whole blood donation (400ml) and CD4⁺ T cells were isolated by negative selection using magnetic beads (MagniSort Human CD4⁺ T Cell Enrichment; eBioscience). A total of 13 conditions were assayed per patient and at least 6x10⁶ of freshly-isolated CD4⁺ T cells were subjected to viral reactivation per condition, which included the individual LRAs, the combination of 2 different families, and the positive and negative controls. Prior to viral reactivation, cells were pre-incubated with the pan-caspase inhibitor Q-VD-OPh for 2h. In order to block new rounds of viral infection during viral reactivation, cells were treated with LRAs in the presence of Raltegravir (1 μ M) during 22h. Afterwards, cells were subjected to the RNA FISH/flow protocol for the detection of HIV transcripts and the viral protein p24 following the manufacturer's instructions (Human PrimeFlow RNA Assay; eBioscience) with some modifications, as previously described [30]. Briefly, PBMCs were stained with antibodies against cell surface markers and viability dye. Cells will be then fixed, permeabilized, and intracellularly stained for detection of the viral p24 protein. After an additional fixation step, cells will be ready for 3h of probes hybridization at 40 \pm 1 $^{\circ}$ C with a high-sensitivity target-specific set of 50 probes spanning the whole Gag-Pol HIV mRNA sequence (bases 1165 to 4402 of the HXB2 consensus genome). The cells will be then subjected to different amplification steps (sequential 2h incubations at 40 $^{\circ}$ C). Finally, multiple label probes will be hybridized with the specific amplifiers (1 h at 40 $^{\circ}$ C) and samples will be run on an LSR Fortessa four-laser flow cytometer (Becton Dickinson).

In these experiments, to identify the different CD4⁺ T cell subpopulations expressing HIV-1 RNA and the viral protein p24, the following antibodies were used for cell surface staining: CD3 (AF700, Biolegend), CCR7 (Pe-CF594, BD Biosciences), CD27 (FITC, BD Biosciences), CD45RO (BV605, Biolegend) and CD95 (Pe-Cy5, BD Biosciences). The CD4⁺ T cell subset phenotypes were identified as follows: T_{NA} (CD3⁺ CCR7⁺ CD45RO⁻ CD27⁺ CD95⁻); T_{SCM} (CD3⁺ CCR7⁺ CD45RO⁻ CD27⁺ CD95⁺); T_{CM} (CD3⁺ CCR7⁺ CD45RO⁺); T_{EM} (CD3⁺ CCR7⁻ CD45RO⁺ CD27⁻); T_{TM} (CD3⁺ CCR7⁻ CD45RO⁺ CD27⁺) and T_{TD} (CD3⁺ CCR7⁻ CD45RO⁻). The surface marker CD32 (Pe-Cy7, Biolegend) was also included in the analysis. The expression of HIV-1 RNA transcripts was analyzed with target-specific AF647-labelled probes, and the expression of the Gag p24 viral protein was detected with a PE-anti-p24 antibody (clone KC57 RD1; Beckman Coulter). Cell viability was determined using a violet viability dye for flow cytometry (LIVE/DEAD fixable Violet Dead Cell Stain kit, Invitrogen). All values of HIV-1 RNA were normalized to the negative control (R10) corresponding to the non-reactivated cells from each patient.

Sensitivity of the assay at detecting productive HIV-infected cells

To test the sensitivity of the assay at detecting cells expressing both HIV-1 RNA and p24, primary infected CD4⁺ T cells from HIV-infected patients were expanded. We used the same protocol described for the qVOA assay [30], and the positive wells were mixed up and diluted into uninfected cells at six different ratios. Samples were then subjected to the RNA FISH-flow assay. The predictive curve was determined by the basal expression of HIV-1 RNA and p24 and the subsequent theoretical values of the serial dilutions. The infection rate (experimental curve of percent HIV RNA⁺p24⁺ cells) was calculated by using the values obtained with the RNA FISH-flow assay. Linear regression was computed to determine the linearity of the relationship between the predicted and experimental values of the assay.

Proviral HIV-DNA quantification by qPCR

CD4⁺ T cells were isolated by negative selection as mentioned above. For proviral quantification, 1 million CD4⁺ T cells were immediately lysed in a Proteinase K-containing lysis buffer (at 55°C overnight and at 95°C for 5 minutes). Cell lysates were subjected to HIV-DNA quantification by qPCR using primers and probes specific for the 1-LTR HIV region (LTR forward 5'-TTAAGCCTCAATAAAGCTTGCC-3', LTR reverse 5'-GTTTCGGGCGCCACTGCTAG-3' and probe 5'/56-FAM/CCAGAGTCA/ZEN/CACAACAGACGGGCA/31ABkFQ/3'), as previously described [57]. CCR5 gene was used for cell input normalization. Samples were analyzed in an Applied Biosystems 7000 Real-Time PCR System.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using the Prism software (GraphPad) version 6.01. Data are shown as the median and the min-max rank. Comparisons among the frequency of HIV-1 RNA expressing cells between unstimulated control (R10) and viral-reactivated conditions were performed using the Wilcoxon signed rank test. For correlations, Spearman's correlation coefficient was calculated. To test the linearity of the assay, a linear regression was performed. A Friedman ANOVA test was used to compare the frequency of HIV-1 RNA⁺ cells induced by Romidepsin plus Ingenol with the levels induced by the other drugs in the different CD4⁺ T cell subsets, with corrected p-values for multiple comparisons (Dunn's test). A p value of <0.05 was considered statistically significant. Synergies and antagonisms effects between drugs were calculated using the Bliss independence model (values <-0.09 were considered as highly antagonistic, values > 0.09 were considered as highly synergistic. Intermediate values

between 0.09 and -0.09 were considered to have an additive effect). Data are presented as the difference between the observed and the predicted responses of each combination ($\Delta f_{axy} = f_{axy,O} - f_{axy,P}$), where $f_{axy,O}$ is the observed fraction affected and $f_{axy,P}$ is the predicted fraction affected. The $f_{axy,P}$ is calculated as $f_{axy,P} = f_{ax} + f_{ay} - (f_{ax} \times f_{ay})$ where f_{ax} is the fraction affected by drug X and f_{ay} is the fraction affected by drug Y [33].

Supporting information

S1 Fig. Q-VD-Oph inhibits the apoptosis of viral-reactivated cells. The effect of the pan-caspase inhibitor Q-VD-Oph on the detection of viral-reactivated cells was evaluated in isolated CD4⁺ T cells from ART-suppressed HIV-infected patients and in the latently infected cell line J-Lat (clone 10.6). **A.** GFP expression in J-Lat cells was monitored by the IncuCyte ZOOM live cell imaging system (Essen Bioscience) every hour for 50 hours after the addition of Panobinostat (30 nM) with or without Q-VD-Oph. **B.** CD4⁺ T cells were reactivated with Panobinostat (PNB, 30 nM) in the presence of Q-VD-Oph (10 μM). Control cultures were treated with media alone (R10) or treated with media and Panobinostat (PNB). Copies of HIV-1 RNA per million CD4⁺ T cells were quantified in samples from 6 HIV⁺ patients by qPCR. Open circles show values under the limit of detection. Fold-change (FC) of viral reactivation is compared between conditions, but only in those where HIV-1 RNA was detected. (TIF)

S2 Fig. Detection of HIV-1 RNA and p24 after viral reactivation by the RNA FISH/flow assay in J-Lat cells. Cells were incubated for 22h with medium alone (R10), Romidepsin (RMD, 40 nM) or Romidepsin (40 nM) plus Ingenol (ING, 100 nM). Cells were then subjected to the RNA FISH/flow protocol and the proportion of HIV-1 RNA⁺ and p24⁺ (**A**) and HIV-1 RNA⁺ and GFP⁺ (**B**) cells was determined by flow cytometry. A flow cytometry plot for each condition is shown. **C.** Infection of primary CD4⁺ T cells from HIV-infected patients were expanded in vitro, and infected cells were diluted with uninfected cells to perform the quantification of predicted (blue symbols) versus experimental (orange symbols) values of HIV-1 RNA⁺ p24⁺ expression measured by the RNA FISH/flow assay. Assay linearity was assessed by linear regression. (TIF)

S3 Fig. Drug toxicities in CD4⁺ T cells and in CD4⁺ T cell subpopulations. Isolated CD4⁺ T cells from 3 uninfected donors were incubated with the different drugs for 22 hours (40 nM Romidepsin, 30 nM Panobinostat, 1 μM JQ1, 100 nM Ingenol, 10 nM Bryostatin-1, 81 nM PMA plus 1 μM Ionomycin or media alone) and cell death was evaluated by flow cytometry in the whole CD4⁺ T cell population and in the different CD4⁺ T cell subsets. Cell subsets were identified as Naïve and Stem Cell Memory (T_{NA}/T_{SCM}) (CD3⁺CD4⁺CD27⁺CD45RO⁻), Central and Transitional Memory (T_{CM}/T_{TM}) (CD3⁺CD4⁺CD27⁺CD45RO⁺), Effector Memory (T_{EM}) (CD3⁺CD4⁺CD27⁻CD45RO⁺) and Terminally Differentiated cells (T_{TD}) (CD3⁺CD4⁺CD27⁻CD45RO⁻). Cells were stained with the apoptotic marker Annexin V and a viability dye. **A.** Gating strategy used to identify the following stages of cell death: live cells (Annexin V⁻ Viability⁺), early apoptotic cells (Annexin V⁺ Viability⁺), late apoptotic+necrotic cells (Annexin V⁺ Viability⁻) and total cell death (Annexin V⁺ Viability⁻). **B-C.** Percentage of cell death and apoptosis induced by the different single LRAs and their combinations in total CD4⁺ T cell population in presence (**B**) or absence (**C**) of the pan-caspase inhibitor Q-VD-Oph. **D-E.** Drug toxicities in different CD4⁺ T cell subpopulations, including T_{NA}/T_{SCM}, T_{CM}/T_{TM}, T_{EM} and T_{TD} in presence (**D**) or in absence (**E**) of Q-VD-Oph. Median values and min-max ranks are represented in panels B-E. In all panels, total dead cells are represented in green, early apoptosis is shown in orange

and late apoptosis and necrosis is represented in blue.
(TIF)

S4 Fig. Detection by the RNA FISH/flow assay of cells expressing HIV-RNA and p24 after viral reactivation in primary CD4⁺ T cells from HIV-infected patients. Isolated CD4⁺ T cells from 9 ART-suppressed HIV-infected individuals were reactivated with different LRAs for 22h and subjected to the RNA FISH/flow assay to analyze the frequency of cells expressing HIV-RNA and the viral protein p24. **A.** Gating strategy used to analyze HIV reactivation in CD4⁺ T cells and in the different CD4⁺ T cells subsets. **B.** Calculation of synergistic, antagonistic or additive effects in CD4⁺ T cells for the different combination of LRA families using the Bliss independence model. **C.** Percentage of cells expressing CD32^{dim} in HIV-1 RNA⁺ and HIV-1 RNA⁻ CD4⁺ T cells after treatment with the different LRAs plotted by Tukey boxplot. Medians of 9 independent experiments are shown in panels B and C. **D.** Correlation between the proportion of HIV-1 RNA⁺ cells per million cells, and the proportion of cells HIV-1 RNA⁺ expressing the viral protein p24. Spearman's nonparametric correlation coefficient and associated P value are shown.
(TIF)

S5 Fig. A. Percentage of different CD4⁺ T cell subpopulations after treatment with the LRAs. Percentage of each subset (T_{NA} , T_{SCM} , T_{CM} , T_{TM} , T_{EM} and T_{TD}) was determined after 22 hours of culture with single or combination of LRAs (40 nM Romidepsin, 30 nM Panobinostat, 1 μ M JQ1, 100 nM Ingenol, 10 nM Bryostatatin-1, 81 nM PMA plus 1 μ M Ionomycin or media alone) by flow cytometry. Dashed red line show the effect at 22h for the negative control, R10. Asterisks denote statistical significance compared with the negative control (R10) using a Friedman test followed by Dunn's post hoc tests. [†] $p < 0.05$, ^{††} $p < 0.01$. **B.** Mean Fluorescence Intensity (MFI) of HIV-1 RNA⁺ cells after viral reactivation with Romidepsin (RMD), Ingenol (ING) and the combination of Romidepsin with Ingenol (RMD+ING).
(TIF)

S6 Fig. Heatmaps and drug synergies in viral-reactivated CD4⁺ T cell subsets. A-B. Summary heatmaps of the potency of single LRAs (**A**) and their combinations (**B**) at increasing the proportion of HIV-1 RNA⁺ cells in the different CD4⁺ T cell subpopulations. **C.** Analysis of the interactions between LRAs, using the Bliss independence model, is shown for each CD4⁺ T cell subset. **D.** Interaction between LRAs on the ability to increase the proportion of p24⁺ cells within HIV-1 RNA⁺ cells in the T_{CM} subset are shown for each patient. Medians and min to max ranks are represented in panels C and D.
(TIF)

S1 Table. Clinical data of patients included in the study. Patient ID, time since HIV diagnosis, CD4 cell count, % of CD4, viral load (cop/ml), time on suppressive ART and HAART regimen were included.
(PDF)

Author Contributions

Conceptualization: Judith Grau-Expósito, Maria J. Buzon.

Data curation: Judith Grau-Expósito.

Formal analysis: Judith Grau-Expósito, Maria J. Buzon.

Funding acquisition: Maria J. Buzon.

Investigation: Judith Grau-Expòsito, Laura Luque-Ballesteros, Meritxell Genescà, Maria J. Buzon.

Methodology: Judith Grau-Expòsito, Laura Luque-Ballesteros, Maria J. Buzon.

Project administration: Ariadna Torrella, Bibiana Planas, Mario Martin-Castillo, Maria J. Buzon.

Resources: Jordi Navarro, Adrian Curran, Joaquin Burgos, Esteban Ribera, Ariadna Torrella, Bibiana Planas, Rosa Badà, Jesús Fernández-Sojo, Vicenç Falcó.

Software: Judith Grau-Expòsito.

Supervision: Maria J. Buzon.

Validation: Judith Grau-Expòsito, Maria J. Buzon.

Writing – original draft: Judith Grau-Expòsito, Maria J. Buzon.

Writing – review & editing: Judith Grau-Expòsito, Laura Luque-Ballesteros, Jordi Navarro, Adrian Curran, Joaquin Burgos, Ariadna Torrella, Bibiana Planas, Rosa Badà, Mario Martin-Castillo, Jesús Fernández-Sojo, Meritxell Genescà, Vicenç Falcó, Maria J. Buzon.

References

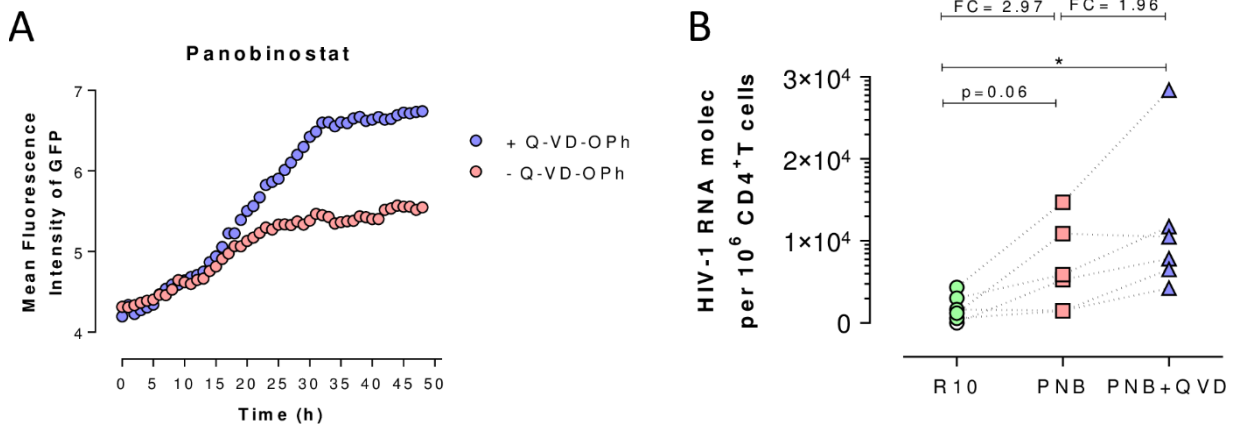
- Palmer S, Josefsson L, Coffin JM (2011) HIV reservoirs and the possibility of a cure for HIV infection. *J Intern Med* 270: 550–560. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2796.2011.02457.x> PMID: [21929712](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21929712/)
- Coiras M, Lopez-Huertas MR, Perez-Olmeda M, Alcamí J (2009) Understanding HIV-1 latency provides clues for the eradication of long-term reservoirs. *Nat Rev Microbiol* 7: 798–812. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2223> PMID: [19834480](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19834480/)
- Chun TW, Engel D, Berrey MM, Shea T, Corey L, et al. (1998) Early establishment of a pool of latently infected, resting CD4(+) T cells during primary HIV-1 infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 8869–8873. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.15.8869> PMID: [9671771](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9671771/)
- Trono D, Van Lint C, Rouzioux C, Verdin E, Barre-Sinoussi F, et al. (2010) HIV persistence and the prospect of long-term drug-free remissions for HIV-infected individuals. *Science* 329: 174–180. <https://doi.org/10.1126/science.1191047> PMID: [20616270](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20616270/)
- Richman DD, Margolis DM, Delaney M, Greene WC, Hazuda D, et al. (2009) The challenge of finding a cure for HIV infection. *Science* 323: 1304–1307. <https://doi.org/10.1126/science.1165706> PMID: [19265012](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19265012/)
- Deeks SG (2012) HIV: Shock and kill. *Nature* 487: 439–440. <https://doi.org/10.1038/487439a> PMID: [22836995](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22836995/)
- Hernandez-Vargas EA (2017) Modeling Kick-Kill Strategies toward HIV Cure. *Front Immunol* 8: 995. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00995> PMID: [28894444](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28894444/)
- Thorlund K, Horwitz MS, Fife BT, Lester R, Cameron DW (2017) Landscape review of current HIV 'kick and kill' cure research—some kicking, not enough killing. *BMC Infect Dis* 17: 595. <https://doi.org/10.1186/s12879-017-2683-3> PMID: [28851294](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28851294/)
- Archin NM, Liberty AL, Kashuba AD, Choudhary SK, Kuruc JD, et al. (2012) Administration of vorinostat disrupts HIV-1 latency in patients on antiretroviral therapy. *Nature* 487: 482–485. <https://doi.org/10.1038/nature11286> PMID: [22837004](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22837004/)
- Sogaard OS, Graversen ME, Leth S, Olesen R, Brinkmann CR, et al. (2015) The Dipeptidase Romidepsin Reverses HIV-1 Latency In Vivo. *PLoS Pathog* 11: e1005142. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005142> PMID: [26379282](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26379282/)
- Rasmussen TA, Tolstrup M, Brinkmann CR, Olesen R, Erikstrup C, et al. (2014) Panobinostat, a histone deacetylase inhibitor, for latent-virus reactivation in HIV-infected patients on suppressive antiretroviral therapy: a phase 1/2, single group, clinical trial. *Lancet HIV* 1: e13–21. [https://doi.org/10.1016/S2352-3018\(14\)70014-1](https://doi.org/10.1016/S2352-3018(14)70014-1) PMID: [26423811](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26423811/)
- Spivak AM, Andrade A, Eisele E, Hoh R, Bacchetti P, et al. (2014) A pilot study assessing the safety and latency-reversing activity of disulfiram in HIV-1-infected adults on antiretroviral therapy. *Clin Infect Dis* 58: 883–890. <https://doi.org/10.1093/cid/cit813> PMID: [24336828](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24336828/)

13. Pandelo Jose D, Bartholomeeusen K, da Cunha RD, Abreu CM, Glinski J, et al. (2014) Reactivation of latent HIV-1 by new semi-synthetic ingenol esters. *Virology* 462–463: 328–339. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2014.05.033> PMID: [25014309](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25014309/)
14. Gutierrez C, Serrano-Villar S, Madrid-Elena N, Perez-Elias MJ, Martin ME, et al. (2016) Bryostatin-1 for latent virus reactivation in HIV-infected patients on antiretroviral therapy. *AIDS* 30: 1385–1392. <https://doi.org/10.1097/QAD.0000000000001064> PMID: [26891037](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26891037/)
15. Li Z, Guo J, Wu Y, Zhou Q (2013) The BET bromodomain inhibitor JQ1 activates HIV latency through antagonizing Brd4 inhibition of Tat-transactivation. *Nucleic Acids Res* 41: 277–287. <https://doi.org/10.1093/nar/gks976> PMID: [23087374](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23087374/)
16. Bosque A, Nilson KA, Macedo AB, Spivak AM, Archin NM, et al. (2017) Benzotriazoles Reactivate Latent HIV-1 through Inactivation of STAT5 SUMOylation. *Cell Rep* 18: 1324–1334. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.01.022> PMID: [28147284](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28147284/)
17. Gattinoni L, Klebanoff CA, Restifo NP (2012) Paths to stemness: building the ultimate antitumour T cell. *Nat Rev Cancer* 12: 671–684. <https://doi.org/10.1038/nrc3322> PMID: [22996603](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22996603/)
18. Roetynck S, Olotu A, Simam J, Marsh K, Stockinger B, et al. (2013) Phenotypic and functional profiling of CD4 T cell compartment in distinct populations of healthy adults with different antigenic exposure. *PLoS One* 8: e55195. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055195> PMID: [23383106](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23383106/)
19. Chomont N, El-Far M, Ancuta P, Trautmann L, Procopio FA, et al. (2009) HIV reservoir size and persistence are driven by T cell survival and homeostatic proliferation. *Nat Med* 15: 893–900. <https://doi.org/10.1038/nm.1972> PMID: [19543283](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19543283/)
20. Buzon MJ, Sun H, Li C, Shaw A, Seiss K, et al. (2014) HIV-1 persistence in CD4⁺ T cells with stem cell-like properties. *Nat Med* 20: 139–142. <https://doi.org/10.1038/nm.3445> PMID: [24412925](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24412925/)
21. Agosto LM, Henderson AJ (2018) CD4⁺ T Cell Subsets and Pathways to HIV Latency. *AIDS Res Hum Retroviruses* 34: 780–789. <https://doi.org/10.1089/AID.2018.0105> PMID: [29869531](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29869531/)
22. Iglesias-Ussel MD, Romero F (2011) HIV reservoirs: the new frontier. *AIDS Rev* 13: 13–29. PMID: [21412386](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21412386/)
23. Bullen CK, Laird GM, Durand CM, Siliciano JD, Siliciano RF (2014) New ex vivo approaches distinguish effective and ineffective single agents for reversing HIV-1 latency in vivo. *Nat Med* 20: 425–429. <https://doi.org/10.1038/nm.3489> PMID: [24658076](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24658076/)
24. Cillo AR, Sobolewski MD, Bosch RJ, Fyne E, Piatak M Jr., et al. (2014) Quantification of HIV-1 latency reversal in resting CD4⁺ T cells from patients on suppressive antiretroviral therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111: 7078–7083. <https://doi.org/10.1073/pnas.1402873111> PMID: [24706775](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24706775/)
25. Banga R, Procopio FA, Cavassini M, Perreau M (2016) In Vitro Reactivation of Replication-Competent and Infectious HIV-1 by Histone Deacetylase Inhibitors. *J Virol* 90: 1858–1871. <https://doi.org/10.1128/JVI.02359-15> PMID: [26656693](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26656693/)
26. Laird GM, Rosenbloom DI, Lai J, Siliciano RF, Siliciano JD (2016) Measuring the Frequency of Latent HIV-1 in Resting CD4⁺ T Cells Using a Limiting Dilution Coculture Assay. *Methods Mol Biol* 1354: 239–253. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3046-3_16 PMID: [26714716](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26714716/)
27. Leth S, Schleimann MH, Nissen SK, Hojen JF, Olesen R, et al. (2016) Combined effect of Vacc-4x, recombinant human granulocyte macrophage colony-stimulating factor vaccination, and romidepsin on the HIV-1 reservoir (REDUC): a single-arm, phase 1B/2A trial. *Lancet HIV* 3: e463–472. [https://doi.org/10.1016/S2352-3018\(16\)30055-8](https://doi.org/10.1016/S2352-3018(16)30055-8) PMID: [27658863](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27658863/)
28. Procopio FA, Fromentin R, Kulpa DA, Brehm JH, Bebin AG, et al. (2015) A Novel Assay to Measure the Magnitude of the Inducible Viral Reservoir in HIV-infected Individuals. *EBioMedicine* 2: 874–883. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2015.06.019> PMID: [26425694](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26425694/)
29. Pardons M, Baxter AE, Massanella M, Pagliuzza A, Fromentin R, et al. (2019) Single-cell characterization and quantification of translation-competent viral reservoirs in treated and untreated HIV infection. *PLoS Pathog* 15: e1007619. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007619> PMID: [30811499](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30811499/)
30. Grau-Exposito J, Serra-Peinado C, Miguel L, Navarro J, Curran A, et al. (2017) A Novel Single-Cell FISH-Flow Assay Identifies Effector Memory CD4⁺ T cells as a Major Niche for HIV-1 Transcription in HIV-Infected Patients. *MBio* 8.
31. Baxter AE, Niessl J, Fromentin R, Richard J, Porichis F, et al. (2016) Single-Cell Characterization of Viral Translation-Competent Reservoirs in HIV-Infected Individuals. *Cell Host Microbe* 20: 368–380. PMID: [27545045](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27545045/)
32. Spina CA, Anderson J, Archin NM, Bosque A, Chan J, et al. (2013) An in-depth comparison of latent HIV-1 reactivation in multiple cell model systems and resting CD4⁺ T cells from aviremic patients. *PLoS Pathog* 9: e1003834. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003834> PMID: [24385908](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24385908/)

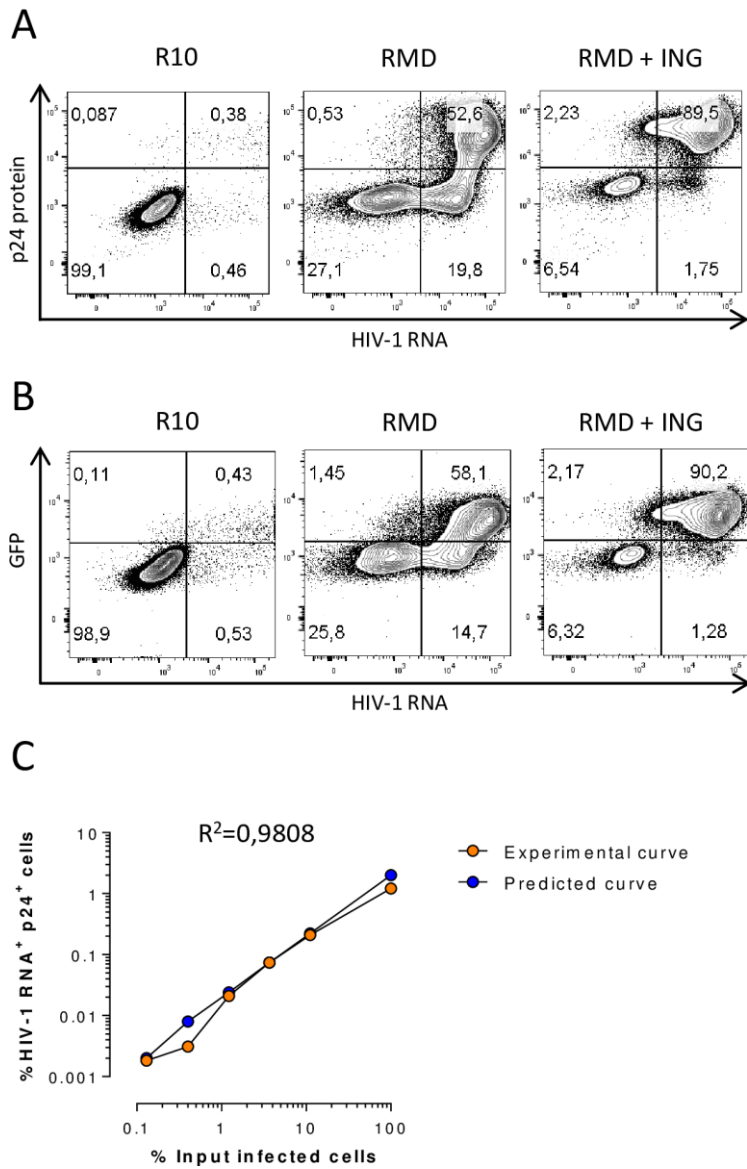
33. Laird GM, Bullen CK, Rosenbloom DI, Martin AR, Hill AL, et al. (2015) Ex vivo analysis identifies effective HIV-1 latency-reversing drug combinations. *J Clin Invest* 125: 1901–1912. <https://doi.org/10.1172/JCI80142> PMID: [25822022](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25822022/)
34. Martrus G, Niehrs A, Cornelis R, Rechten A, Garcia-Beltran W, et al. (2016) Kinetics of HIV-1 Latency Reversal Quantified on the Single-Cell Level Using a Novel Flow-Based Technique. *J Virol* 90: 9018–9028. PMID: [27466424](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27466424/)
35. Doitsh G, Galloway NL, Geng X, Yang Z, Monroe KM, et al. (2014) Cell death by pyroptosis drives CD4 T-cell depletion in HIV-1 infection. *Nature* 505: 509–514. <https://doi.org/10.1038/nature12940> PMID: [24356306](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24356306/)
36. I B C. (1939) The toxicity of poison. *Annals of Applied Biology* 26: 585–615.
37. Abdel-Mohsen M, Kuri-Cervantes L, Grau-Exposito J, Spivak AM, Nell RA, et al. (2018) CD32 is expressed on cells with transcriptionally active HIV but does not enrich for HIV DNA in resting T cells. *Sci Transl Med* 10.
38. Yukl SA, Kaiser P, Kim P, Telwatte S, Joshi SK, et al. (2018) HIV latency in isolated patient CD4(+) T cells may be due to blocks in HIV transcriptional elongation, completion, and splicing. *Sci Transl Med* 10.
39. Derdeyn CA, Kilby JM, Miralles GD, Li LF, Sfakianos G, et al. (1999) Evaluation of distinct blood lymphocyte populations in human immunodeficiency virus type 1-infected subjects in the absence or presence of effective therapy. *J Infect Dis* 180: 1851–1862. <https://doi.org/10.1086/315117> PMID: [10558941](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10558941/)
40. Bruner KM, Wang Z, Simonetti FR, Bender AM, Kwon KJ, et al. (2019) A quantitative approach for measuring the reservoir of latent HIV-1 proviruses. *Nature* 566: 120–125. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-0898-8> PMID: [30700913](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30700913/)
41. Ho YC, Shan L, Hosmane NN, Wang J, Laskey SB, et al. (2013) Replication-competent noninduced proviruses in the latent reservoir increase barrier to HIV-1 cure. *Cell* 155: 540–551. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.09.020> PMID: [24243014](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24243014/)
42. Pinzone MR, VanBelzen DJ, Weissman S, Bertuccio MP, Cannon L, et al. (2019) Longitudinal HIV sequencing reveals reservoir expression leading to decay which is obscured by clonal expansion. *Nat Commun* 10: 728. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08431-7> PMID: [30760706](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30760706/)
43. Wei DG, Chiang V, Fyne E, Balakrishnan M, Barnes T, et al. (2014) Histone deacetylase inhibitor romidepsin induces HIV expression in CD4 T cells from patients on suppressive antiretroviral therapy at concentrations achieved by clinical dosing. *PLoS Pathog* 10: e1004071. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004071> PMID: [24722454](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24722454/)
44. Jiang G, Mendes EA, Kaiser P, Sankaran-Walters S, Tang Y, et al. (2014) Reactivation of HIV latency by a newly modified ingenol derivative via protein kinase Cdelta-NF-kappaB signaling. *AIDS* 28: 1555–1566. <https://doi.org/10.1097/QAD.000000000000289> PMID: [24804860](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24804860/)
45. Petravic J, Rasmussen TA, Lewin SR, Kent SJ, Davenport MP (2017) Relationship between Measures of HIV Reactivation and Decline of the Latent Reservoir under Latency-Reversing Agents. *J Virol* 91.
46. Zerbato JM, McMahon DK, Sobolewski MD, Mellors JW, Sluis-Cremer N (2019) Naive CD4+ T Cells Harbor a Large Inducible Reservoir of Latent, Replication-Competent HIV-1. *Clin Infect Dis*.
47. Valle-Casuso JC, Angin M, Volant S, Passaes C, Monceaux V, et al. (2018) Cellular Metabolism Is a Major Determinant of HIV-1 Reservoir Seeding in CD4(+) T Cells and Offers an Opportunity to Tackle Infection. *Cell Metab*.
48. Erin T. Larragoite LJM, Spivak Adam M., Racheal A. Nell, Vicente Planelles (2017) Histone deacetylase inhibition reduces deleterious cytokine release induced by ingenol stimulation BioRxiv [Preprint].
49. Anderson I, Low JS, Weston S, Weinberger M, Zhyvoloup A, et al. (2014) Heat shock protein 90 controls HIV-1 reactivation from latency. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111: E1528–1537. <https://doi.org/10.1073/pnas.1320178111> PMID: [24706778](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24706778/)
50. Jordan A, Bisgrove D, Verdin E (2003) HIV reproducibly establishes a latent infection after acute infection of T cells in vitro. *EMBO J* 22: 1868–1877. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg188> PMID: [12682019](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12682019/)
51. Keoni CL, Brown TL (2015) Inhibition of Apoptosis and Efficacy of Pan Caspase Inhibitor, Q-VD-OPh, in Models of Human Disease. *J Cell Death* 8: 1–7. <https://doi.org/10.4137/JCD.S23844> PMID: [25922583](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25922583/)
52. Chauvier D, Ankri S, Charriaud-Marlangue C, Casimir R, Jacotot E (2007) Broad-spectrum caspase inhibitors: from myth to reality? *Cell Death Differ* 14: 387–391. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402044> PMID: [17008913](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17008913/)
53. Alimonti JB, Ball TB, Fowke KR (2003) Mechanisms of CD4+ T lymphocyte cell death in human immunodeficiency virus infection and AIDS. *J Gen Virol* 84: 1649–1661. <https://doi.org/10.1099/vir.0.19110-0> PMID: [12810858](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12810858/)

54. Pitrak DL, Novak RM, Estes R, Tschampa J, Abaya CD, et al. (2015) Short communication: Apoptosis pathways in HIV-1-infected patients before and after highly active antiretroviral therapy: relevance to immune recovery. *AIDS Res Hum Retroviruses* 31: 208–216. <https://doi.org/10.1089/aid.2014.0038> PMID: [25386736](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25386736/)
55. Timilsina U, Gaur R (2016) Modulation of apoptosis and viral latency—an axis to be well understood for successful cure of human immunodeficiency virus. *J Gen Virol* 97: 813–824. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000402> PMID: [26764023](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26764023/)
56. Massanella M, Curriu M, Carrillo J, Gomez E, Puig J, et al. (2013) Assessing main death pathways in T lymphocytes from HIV infected individuals. *Cytometry A* 83: 648–658. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.22299> PMID: [23650261](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23650261/)
57. Buzon MJ, Martin-Gayo E, Pereyra F, Ouyang Z, Sun H, et al. (2014) Long-term antiretroviral treatment initiated at primary HIV-1 infection affects the size, composition, and decay kinetics of the reservoir of HIV-1-infected CD4 T cells. *J Virol* 88: 10056–10065. <https://doi.org/10.1128/JVI.01046-14> PMID: [24965451](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24965451/)

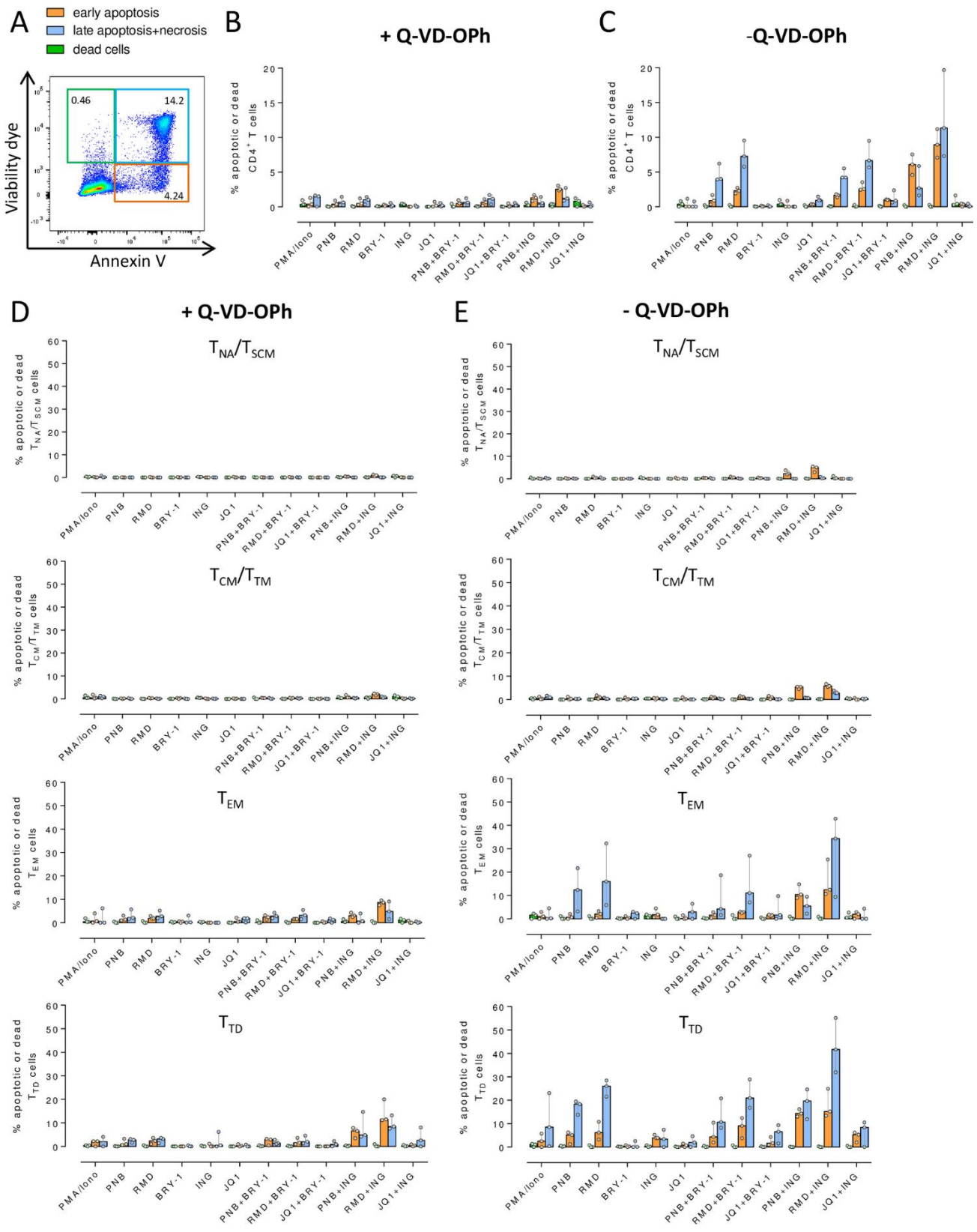
S1 Fig.



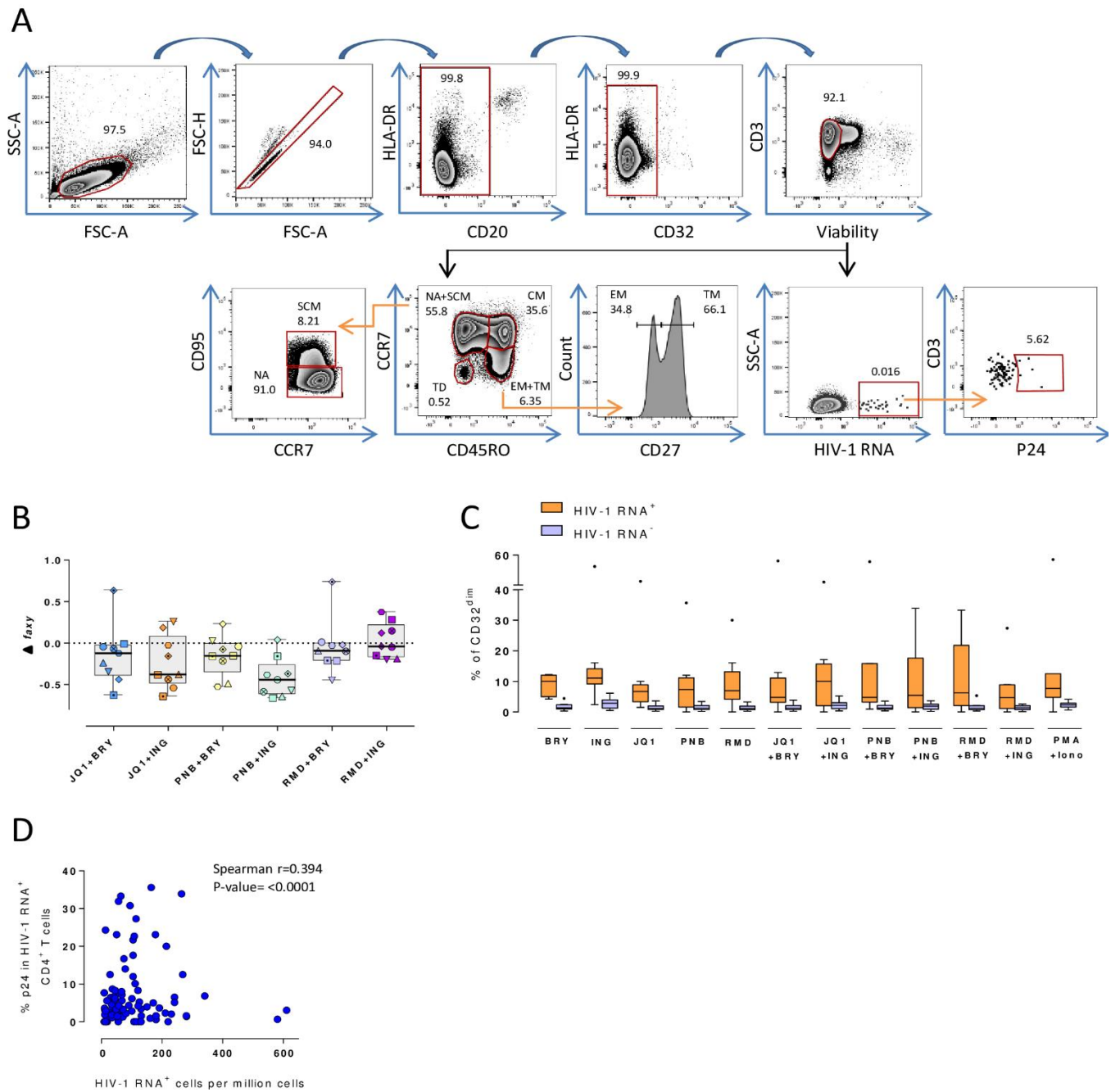
S2 Fig.



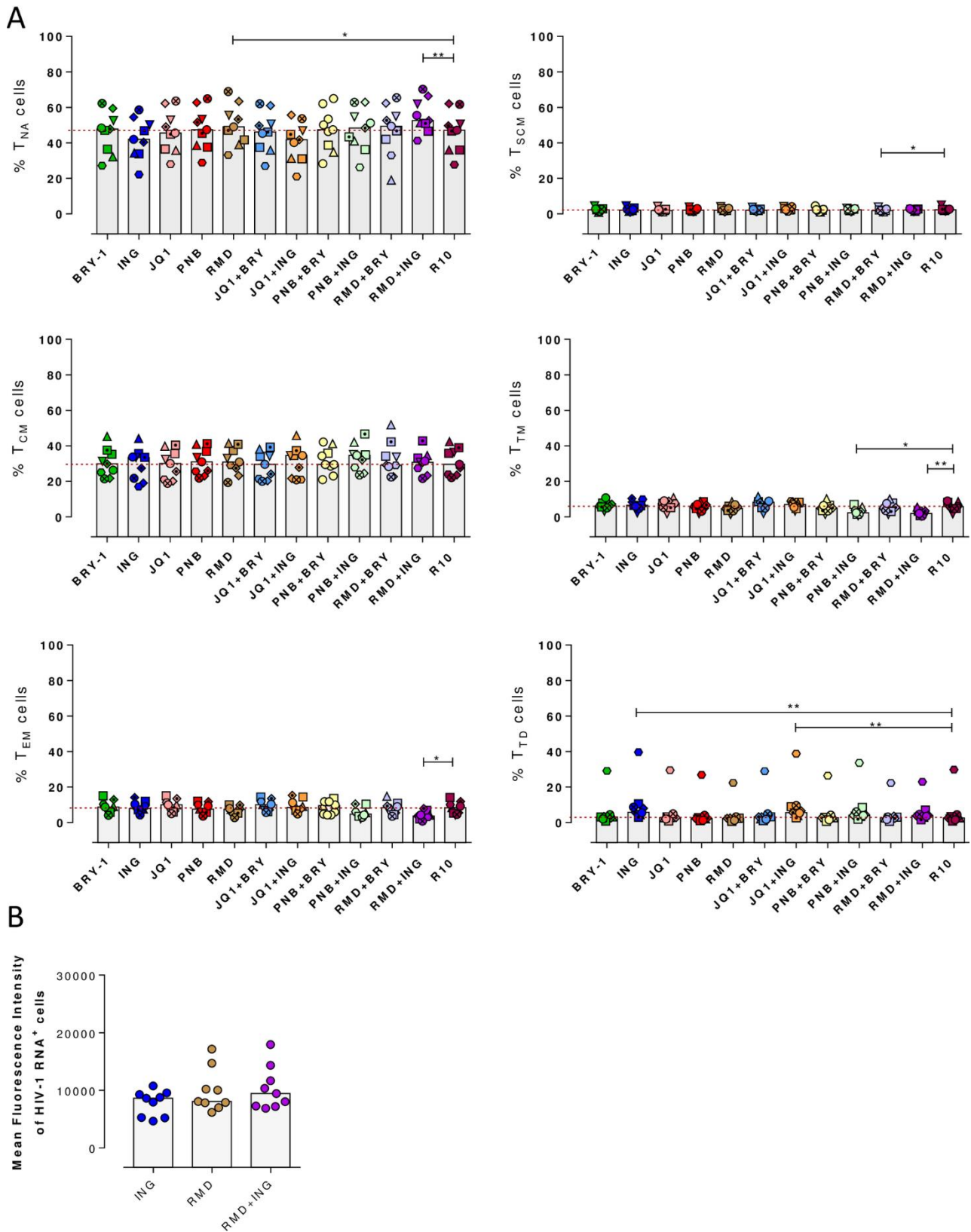
S3 Fig.



S4 Fig.



S5 Fig.



S6 Fig.

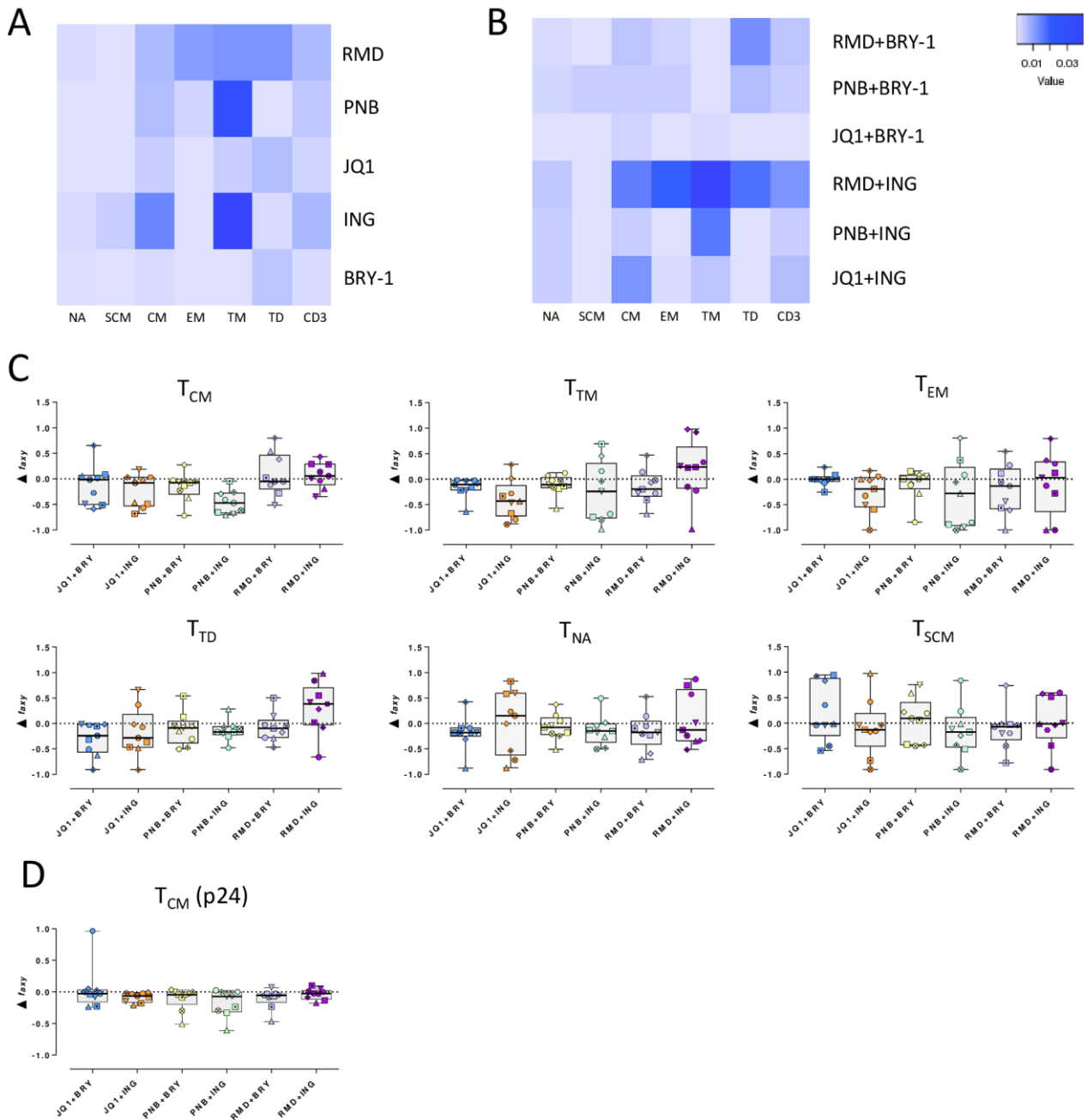


Table S1

Patient ID	Time since HIV diagnosis (months)	CD4 Cell Count (cells/ μ l)	%CD4	Viral Load (copies/ml)	Time on suppressive ART (months)	HAART regimen
1	72	800	23.12	<20	18	ABC/3TC+DTG
2	33	490	21.03	<20	28	TDF/FTC+EVG/c
3	31	560	27.92	<20	11	TDF/FTC+EVG/c
4	49	1070	38.14	<20	39	TDF/FTC/EFV
5	31	810	34.70	<20	22	ABC/3TC+DTG
6	42	1150	37.05	<20	37	ABC/3TC+RPV
7	13	1760	57.71	<20	>13	TDF/FTC+EVG/c
8	55	970	NA	<20	45	ABC/3TC+DTG
9	168	540	NA	<20	54	TDF/FTC+EVG/c
10	25	800	42.99	<20	19	TDF/FTC+EVG/c
11	35	1160	45.83	<20	31	TDF/FTC/EFV
12	276	520	29.50	<20	78	TDF/FTC+ETV
13	33	720	NA	<20	13	TDF/FTC+EVG/c
14	331	930	29.7	<20	71	TDF/FTC/EFV
15	127	960	45	<20	56	ABC/3TC+DTG
16	31	840	35.75	<20	23	TDF/FTC+EVG/c
17	18	1520	46.83	<20	6	ABC/3TC+ATV/r
18	48	850	40.64	<20	27	TDF/FTC+RPV

FTC, emtricitabine; TDF, tenofovir; 3TC, lamivudine; EFV, efavirenz; ABC, abacavir; EVG/c, elvitegravir boosted with cobicistat; DTG, dolutegravir; DRV/c, darunavir boosted with cobicistat; ETV, Etravirine; RPV, Rilpivirine; ATZ/r, atazanavir boosted with ritonavir; NA, not available.

TREBALL 3: La reprogramació metabòlica induïda per l'àcid làuric, un àcid gras saturat natural, reactiva el VIH latent i preserva l'eliminació de les cèl·lules que actuen com a reservoris virals.

ARTICLE PENDENT DE PUBLICACIÓ

Títol: Metabolic reprogramming induced by Lauric Acid, a natural saturated fatty acid, reactivates latent HIV and preserves immune-mediated killing of HIV-reservoir cells.

Objectiu: Avaluar la capacitat d'una nova molècula d'origen natural, l'àcid làuric, com a potencial agent reversor de la latència del VIH i com a immunomodulador de la resposta antiviral en cèl·lules primàries de pacients infectats pel VIH.

Mètodes: Es van realitzar assajos de reactivació viral en models de latència i en cèl·lules primàries T CD4⁺ de pacients en tractament antiretroviral. Mitjançant l'ús de tècniques convencionals tals com la qPCR i la citometria de flux es va avaluar la capacitat de l'àcid làuric per promoure la transcripció viral i la producció de proteïnes. Es van realitzar assajos funcionals per determinar l'efecte d'aquest àcid gras en la capacitat citotòxica de les cèl·lules T CD8⁺. I, per últim, es van dur a terme anàlisis de metabolòmica, proteòmica i lipidòmica per determinar la repercussió del l'àcid làuric a nivell del metabolisme cel·lular en un context de reactivació.

Resultats: L'àcid làuric ha estat capaç de promoure la transcripció viral i la producció de proteïna viral tant en models de latència com en cèl·lules primàries, presentant una toxicitat cel·lular associada molt reduïda. A més els assajos funcionals han demostrat que l'àcid làuric no deteriora la funció efectora de les cèl·lules T CD8⁺. Els anàlisis de lipidòmica en CD4⁺, han mostrat que l'àcid làuric promou la formació de fosfatidilcolines i diacilglicerols, necessaris per a la producció de proteïna viral durant la reactivació. I els anàlisis de metabolòmica i proteòmica han determinat l'àcid làuric podria induir la reprogramació metabòlica en cèl·lules T CD8⁺ per obtenir energia no només a través de la glicòlisi sinó també per la β -oxidació d'àcids grassos.

Conclusions: Els nostres resultats confirmen l'eficiència *in vitro* de l'àcid làuric per reactivar el VIH del reservori cel·lular sense afectar la capacitat citotòxica de les cèl·lules T CD8⁺, postulant-se com un nou agent reversor de la latència d'origen natural. A més, presenta la capacitat de reprogramar el metabolisme cel·lular sense afectar la funcionalitat de les cèl·lules T CD8⁺ citotòxiques. La disponibilitat i aprovació de l'àcid làuric com a additiu alimentari, la reduïda toxicitat *in vitro* i *in vivo*, el baix cost i la seva eficàcia per reactivar el VIH fan que l'àcid làuric sigui un molt bon candidat per ser testat en futurs assajos clínics amb l'objectiu d'eliminar els reservoris virals.

Metabolic reprogramming induced by Lauric Acid, a natural saturated fatty acid, reactivates latent HIV and preserves immune-mediated killing of HIV-reservoir cells

Abstract

Elimination of the latent HIV reservoirs that persist in antiretroviral treated (ART) HIV-infected patients is recognized as the main barrier to cure HIV. Latency reversal agents (LRA) are compounds that reactivate latent HIV from its dormant state, however LRAs do not impact the reservoir in vivo. The poor reactivation capacity of these compounds, the inability of the immune system to recognize and to kill viral reactivated cells and the cell-associated toxicity, preclude the clinical use of current LRAs. Here, we find that Lauric acid (LA), a natural-derived fatty acid, significantly reprograms the metabolic signatures of host cells. In CD4⁺ T cells LA repurposes the composition of the lipid content upregulating diacylglycerols and producing de novo phosphatidylcholines, potentially reactivating latent HIV in samples from ART-treated patients. Moreover, LA impacts the metabolism of CD8⁺ T cells with the significant upregulation of the β -oxidation pathway and the proteasome activity, and the preservation of the cytotoxic capacity of CD8⁺ T at killing viral-reactivated cells from primary cell reservoirs. The functionality of LA at reactivating the latent virus and preserving immune responses, together with the low toxicity found in human studies and its low cost, make LA an excellent candidate for cost-effective therapeutic strategy directed to impact the HIV reservoir.

Introduction

The infection caused by HIV is an incurable condition. The presence of latent cell reservoirs that persist in antiretroviral treated HIV-infected patients is considered the main obstacle to cure HIV. In recent years, new therapeutic strategies targeting the HIV reservoir are being developed with limited success. The “shock and kill” approach depends on compounds that induce broad and robust induction of viral transcription, coupled with corresponding competent immune responses capable of purging the latently infected population. In this sense, latency reversal agents (LRAs) are compounds tested in clinical trials that are able to reactivate part of the latent HIV present in cell reservoirs. However, infected cells do not die as a consequence of the viral cytopathogenic effects or the action of the immune system. Importantly, current LRAs are relatively toxic compounds, which limits its extended use and the number of doses that can be given to patients. Human clinical trials using LRAs have not been completely effective at reducing the viral reservoirs[1]. Because current LRAs are thus

unlikely to be effective on their own, new therapies are focused on combinations of treatments that could identify and eliminate the latent HIV population[2, 3]. For instance, the combination of LRAs with therapeutic vaccines, which stimulate CD8⁺ T cell responses, has showed promising results in a clinical trial[4]. Other proposed strategies rely on newly developed high-tech and high-cost approaches, including the design of recombinant antibodies or genome editing. These approaches, however, might be difficult to implement to the majority of infected individuals in developing countries. Although it is largely accepted that single compounds dually acting on the HIV reservoir and the immune system could significantly impact the latent reservoir, these compounds could also induce global immune activation and might have life-threatening toxic effects by causing a cytokine release syndrome. Therefore, it is necessary to find novel non-toxic compounds, which could be administrated daily, broadly acting on the reactivation of most HIV reservoir cells without a deleterious impact on immune effectors cells.

Natural fatty acids are non-toxic compounds approved for human use at high concentrations. For instance, Lauric acid (LA) or dodecanoic acid is a saturated fatty acid with a 12-carbon atom chain that is found naturally in various plant and animal fats and oils, and represents a large proportion of the fatty acid content in coconut milk, coconut oil, laurel oil, and palm kernel oil[5, 6]. It is also found in human breast milk, cow's milk and goat's milk. Moreover, it has been suggested that LA have a different metabolic and hence health effects compared with other saturated fatty acids like myristic or palmitic acid[7, 8]. Importantly, there are no evidence for toxic effects of LA at dose levels equivalent to 9,000 mg LA/kg body weight[9]. Furthermore, LA have been extensively identified in the literature as a microbicide, with a potent activity against gram positive bacteria[10, 11] and a number of fungi and lipid-coated viruses[12, 13]. In fact, LA has been associated with health benefits related with the cardiovascular system[14-16], weight loss[17], diabetes[18], and Alzheimer's Disease[19, 20] among others, probably due to its ability to reduce the adipose tissue and the promotion of a more favorable lipid profile, increasing high-density lipoproteins (HDL) instead of low density lipoproteins (LDL)[21, 22]. Several studies have demonstrated that LA is directly transported to the kidney to produce energy and ketone bodies, the energy source for the heart and brain, and it is not accumulated as fat in the body. In addition, LA is not involved in the cholesterol biosynthesis or transport [22, 23]. Moreover, LA has the potential to reciprocally modulate both innate and adaptive immune responses, mediated in part, through the activation of Toll-like receptors [24, 25]. Previous studies have demonstrated that fatty acids are also involved

in diverse transduction pathways, in gene transcription and relevant biological events as cell metabolism, inflammation, apoptosis and production of bioactive lipid mediators, thus contributing to multiple pathophysiological responses[26]. Importantly, both fatty acid biosynthesis and fatty acid uptake programs are required for the early activation of CD4+ T cells [27], an essential step for HIV reactivation. Furthermore, a recent report suggested that fatty acid metabolism may also participate in the late steps of viral replication [28].

Here, using different models of HIV latency, human lymphoid tissues and cells from ART-treated patients, we prove the ability of LA to reprogram cell metabolism and serve as a potent LRA. Its low cost and reduced toxicity in vivo warrant its evaluation in clinical trials.

Results

Lauric acid reactivates latent HIV through the activation of NF- κ B

First, to test the ability of LA to reactivate latent HIV, we used the latently infected cell line J-lat 10.6, which has the latent provirus integrated and encodes the GFP gene, providing a fluorescent marker of the HIV-1 transcriptional activity. Cells were treated with increasing concentrations of LA (from 20 to 100 μ g/ml) and HIV reactivation was quantified as the percentage of cells expressing GFP. We observed that 20 and 40 μ g/ml of LA were able to reactivate HIV above the negative control (**Figure 1A**). Higher concentrations of LA reduced viral reactivation due to cell toxicity (**Figure S1A**). We also tested if LA was able to induce the production of the viral protein p24 in a primary model of HIV latency using CD4⁺ T cells. In concordance with the previous data, we observed a robust production of p24 in the culture (median of 0.059%), reaching p24 levels similar to those observed with the positive control PMA/Ionomycin (median of 0.050%), a potent global cell stimulus (**Figure 1B**). Then, in order to dig into the mechanism of viral reactivation induced by LA, we evaluated if the activation of the TLR-2 was involved in viral reactivation, since previous reports have shown the ability of LA to activate both TLR-2 and 4[29, 30]. We used a J-lat 10.6 cells genetically engineered to express TLR-2[31]. Pam2CSK4, a specific TLR1/2 agonist and PMA/Ionomycin, were used as positive controls (**Figure 1C left**). We failed to observe a direct involvement of the TLR-2 receptor on viral reactivation (**Figure 1C right**), since lower viral reactivation was observed in TLR-2 expressing cells compared with wild type cells. We also evaluated the role of NF- κ B, an important transcription factor involved in HIV transcription. J-lat 10.6 cells were stimulated with LA in the presence of the NF- κ B specific inhibitor Bay 11-7082. We observed a statistically significant reduction of viral reactivation (50%) at the highest concentration of the inhibitor ($p < 0.0001$), confirming that viral reactivation induced by LA is, at least partially, dependent on NF- κ B activation (**Figure 1D**).

Overall, we observed that LA is able to reactivate latent HIV in the latently infected cell line J-lat 10.6 and in a latency model using primary CD4⁺ T cells, and viral reactivation is modulated by the transcription factor NF- κ B.

Lauric acid reactivates latent HIV in samples from ART-treated patients

Because cell lines do not always recapitulate the physiology of cells from HIV-infected patients, we evaluated the capacity and potency of this natural compound to reactivate latent HIV in fresh samples from ART-treated individuals. First, we sought to test the LA activity and cytotoxicity in

immune cells as a means to explore its therapeutic window. Cell surface expression of CD69, a biomarker of early T cell activation, is well known to directly correlate with the activity of potent LRAs[32]. We tested cell toxicity in CD4⁺ T, CD8⁺ T and NK cells and, in contrast with our finding in the cell line, we found no cell death at any of the concentrations tested using our experimental conditions (**Figure S1B**). We also observed that levels of CD69 increased with concentrations of LA starting at 80µg/ml, inducing higher activation in CD4⁺ T cells, both in percentage and in intensity of expression, in all tested patients (**Figure 2A and S1C**). However, a very modest increase of CD69 expression was observed in CD8⁺ T cells, with no changes detected in NK cells (**Figure 2A**). Then, we tested viral reactivation in patient's samples. We isolated at least 4x10⁶ CD4⁺ T cells from patient's PBMCs and cultured them with different concentrations of LA. We observed that LA was able to efficiently reactivate latent HIV, with a half maximal effective concentration (EC₅₀) of 57µg/ml (**Figure 2B**). When LA was compared to the positive control, PMA/Ionomycin, we observed no statistical differences, indicating that LA is equally potent than the positive control at producing viral RNA, and significantly higher than the negative control (DMSO vehicle) (p<0.001) with a fold-change of viral reactivation of 2.6 (mean of HIV-RNA molecules/million cells of 10.239 for PMA/Ionomycin and 9.222 for LA) (**Figure 2C right and left**). In general, we observed significant viral reactivation in 14 out of 15 patients when cells were treated with LA.

To better characterize the cells that express HIV-1 RNA after viral reactivation with LA, we used the RNA/FISH flow protocol, which allows the identification of HIV-RNA⁺ cells in different subpopulations of CD4⁺ T cells [33, 34]. We observed that several CD4⁺ T cell subsets, including central and effector/transitional memory subsets, reported as the largest cell populations that support long-term viral persistence[35], were susceptible to the LA action (**Figure 2D**) (Total CD4 T cells (T_{CD3}) (FC=3,75; p= 0,03), Central memory (T_{CM}) (FC=1,34, p=0,09) and effector and transitional memory (T_{EM/TM}) (FC=4,00, p=0,03). We determined that the effector/transitional cells supported to a larger extent HIV-1 transcription induced by LA, which is in concordance with our previous results in which we determined that memory cells are more susceptible to viral reactivation and are the main source of residual transcription in ART-treated patients[33, 34].

Once the reactivation in terms of RNA was demonstrated, we ought to analyse if LA was also able to induce the production of viral protein in patient's samples. After 22h of incubation with the fatty acid, isolated CD4⁺ T cells were interrogated for the production of the p24 viral protein by flow cytometry (**Figure 2E**). A representative example is shown in **Figure 2E left**. We observed

that LA induced statistically significant amounts of p24⁺ cells compared to the vehicle control (p=0.02). In general, the positive control PMA/Ionomycin, induced higher expression of p24⁺ cells (median of p24⁺ cells 0.28 for PMA/Ionomycin, 0.03 for LA and 0.01 for vehicle control) (**Figure 2E right**). Finally, we evaluated whether LA might impact the total HIV reservoir size *ex vivo*. At least 1 million of isolated CD4⁺ T cells from ART-treated patients were subjected to viral reactivation using LA, after we quantified total HIV-DNA. We observed that LA was able to decrease HIV-DNA in 2 out of 3 patients, indicating that this natural compound might disrupt HIV latency and promote the killing of viral-reactivated cells (**Figure 2F**). Despite the trend observed in this representative experiment, more samples should be assayed to confirm these results.

Taken together, these results demonstrate the capacity of LA to activate CD4⁺ T cells and induce both viral RNA and protein in samples from ART-treated patients, highlighting its potential as a new latency reversal agent.

Exogenous administration of LA to CD4⁺ T cells generates new lipid products involved in viral production

Many viruses induce glycolysis, fatty acid synthesis and/or glutaminolysis in the host cell that might help to produce viral particles. In this regard, HIV infection has showed to increase host fatty acid synthase levels, and a decrease in this enzyme attenuates HIV replication during late stages of its replication cycle[28]. This is in line with the general knowledge that fatty acid biosynthesis is required for viral replication, and concordant with the exclusive lipid composition of cell membranes of HIV-infected cells, which are characterized by a high cholesterol to phospholipid ratio. Here, we hypothesized that supplementation of CD4⁺ T cells with LA might induce an advantageous environment for viral reactivation. Thus, we investigated the lipidomic profiling of CD4⁺ T cells from 5 HIV-suppressed ART-treated patients after *ex vivo* administration of LA. Different lipidomic signatures were observed compared with the control group (**Figure 3A**). Specifically, *de novo* production of Phosphatidylcholines (PC) (**Figure 3B and Table S1**), and significant upregulation of cholesteryl esters (CE), Diacylglycerols (DG), Lysophosphatidylcholines (LPC) and Triglycerols (TG) (**Figure 3C and Table S1**) were observed in cells treated with LA. Importantly, it has been reported that hydrolysis of Phosphatidylcholines, which products are diacylglycerols, activates the pathway leading to induction of nuclear NF- κ B-binding activity and transactivation of HIV expression[36]. Moreover, Diacylglycerols are potent activators of Protein Kinase C (PKC) enzymes[37], a well-known family of LRAs[38, 39].

Therefore, these results suggest that LA might induce a lipidome-wide remodelling of the host cell to provide a suitable cell environment for viral production.

Lauric acid activates immune cells in lymphoid tissue

LA was previously described to be able to activate TLRs [24, 30]. Although we failed to show a direct link between activation of the TLR-2 and LA in cell models (**Figure 1C**), we tested the activation of immune cells in lymphoid tissue compared to the drug GS-9620, an agonist of TLR-7. Cell activation, measured as percentage of CD69⁺ cells, was observed in tonsil samples at concentrations starting at 40µg/ml in CD4⁺ T, CD8⁺ T and NK cells. However, at these drug concentrations we observed a decrease in cell viability (**Figure 4A** and **S1C**). In general, percentages of CD69⁺ immune cells were very similar to those observed for GS-9620 and LA, with responses outreaching the vehicle control in CD4⁺ T, CD8⁺ T, NK, B and pDC cells for both GS-9620 and LA (**Figure 4B**). Importantly, we determined that LA was able to promote an increase of cell activation in all tested immune subpopulations, being extremely efficient at activating pDCs and B cells. This result might indicate that besides the potential of LA to reactivate latent HIV in CD4 T cells, this natural compound might trigger an antiviral response by activation of pDCs in lymphoid tissue, with similar levels of those obtained by the positive control GS-9620.

Lauric acid does not impair CD8⁺T cell cytotoxic functionality and reprograms cell metabolism

After confirming the capacity of LA to promote the reactivation of latent HIV, we wanted to evaluate whereas the CD8⁺ T cytotoxic responses were impaired in the presence of LA, as shown for other LRAs[40, 41]. We performed functional assays using CD4⁺ T cells from ART-treated patients which were viral-reactivated with PMA and Ionomycin. Next day, cells were co-cultured with autologous CD8⁺ T cells previously treated with LA. The cytotoxic response of CD8⁺ T cells was evaluated as the reduction of p24⁺ cells. Scheme panel of the experiment is shown in **Figure 5A**. We observed that CD8⁺ T cells treated with LA were able to reduce the number of viral-reactivated cells (FC=3,34) at the same level as untreated CD8⁺ T cells (FC=3,82) (median CD4⁺ alone (vehicle)=0.02; CD4⁺ treated with PMA/Ionomycin= 0.18; CD4⁺ (PMA/Ionomycin)+CD8⁺ (R10)=0.047 and CD4⁺ (PMA/Ionomycin) +CD8⁺ (LA)=0.054) (**Figure 5B**). These results indicate that LA does not impair the killing capacity of CD8 T cell against viral-reactivate cells.

In order to better understand the effect of LA on CD8⁺ T cells, we also performed metabolomic and proteomic studies using isolated CD8⁺ T cells from 5 HIV-suppressed ART-treated patients

that were treated with LA. A total of 74 metabolites were quantified by GC-QTOF/ MS. The principal component analysis (PCA) showed different metabolic signatures when cells were treated with LA compared with the control group (**Figure 5C**). 9 metabolites (**Table S2**) were differentially expressed between conditions and the metabolomic pathway analysis revealed a significant increase of Fumaric and Citric acid, among others, suggesting an upregulation of the Krebs cycle (TCA cycle) after LA treatment (**Figure 5D**). Moreover, two enzymes implicated in the metabolism of fatty acids, Acyl-CoA thioesterase implicated in the esterification of fatty acids, and Acetyl-CoA dehydrogenase which is implicated in the β -oxidation of fatty acids (**Figure S2A**), were upregulated with LA. A concomitant decrease of Glucose-6-P isomerase, an enzyme implicated in glycolysis, was also detected (**Figure S2B**). Altogether, our results suggest that LA might reprogramme CD8⁺ T cells to obtain energy through the β -oxidation pathway, beside glycolysis. In this sense, it has been described that CD8⁺T from elite controllers (EC) exhibited, *ex vivo*, notably higher fatty acid oxidation to fuel mitochondrial oxidative phosphorylation, compared to ART-treated individuals. Moreover, CD8⁺ T cells from EC presented a higher fatty acid/glucose uptake ratio than cells from ART-treated individuals[42].

Additionally, we performed a proteomic analysis of CD8⁺ T cells after LA treatment. The results reinforced our previous findings showing that LA did not impair the effector functionality of CD8⁺T cells (**Figure 5B**). No differences in the expression of genes related with the cytotoxic activity of CD8 T cells, like granzyme B or T-bet were found when cells were treated with LA (**Figure 5E**). This is significant since LA might position as advantageous compared to other latency reversal agents, such as HDACi, which have been shown to alter the functionality of CD8⁺ T cells[41, 43]. When differentially expressed genes were subjected to pathway analysis to determine relevant Gene Ontology biological processes, we identified significant pathways altered, including cell activation, secretion by cell, cellular protein metabolism, and vesicle mediated transport (**Figure S2C**). In general, a decrease in global CD8⁺ T cells activation was observed in cells treated with LA. This is consistent with the metabolic switch from glycolysis to β -oxidation as a main source to obtain energy by the cell. Finally, the proteomic analysis also showed that LA promoted an up-regulation of proteasome-related genes in CD8⁺ T cells; we observed a significant increase in the expression of several subunits of the proteasome, including subunit 4, 6 and beta 10, which might indicate the enhancement of proteasome activity (**Figure 5F**). Interestingly, the increase of the proteasomic activity within CD8⁺ T cells has been associated with the differentiation of naïve CD8⁺ T cells to memory cells *in vivo*[44].

Materials and methods

Ethic statement

PBMCs from HIV-1-infected patients were obtained from the HIV unit of the Hospital Universitari Vall d'Hebron in Barcelona, Spain. Written informed consent was provided by all of patients who participated in this study, and the protocols used were approved by the Comité d'Ètica d'Investigació Clínica (Institutional Review Board numbers 39-2016 and 196-2015) of the Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Spain. Samples were obtained only from adults and were totally anonymous and untraceable. In addition, tonsil tissue was obtained from eight children who were undergoing routine tonsillectomy from the Otolaryngology Department of the Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Spain (Institutional Review Board number PR(AG)116/2018). All participants gave written informed consent for their participation in these studies.

Study samples

Samples from HIV-1-infected patients with CD4⁺ T cell counts higher than 200 cells/mm³ and viral load <50 cop/ml for at least 2 years were recruited in the HIV unit of the Hospital Universitari Vall d'Hebron in Barcelona (Spain) and were included in this study. Information on plasma viral loads, CD4⁺ T cell counts, and time on ART for treated patients is summarized in **Table S4**.

Cells and virus

PBMCs were obtained from viral-suppressed HIV-infected patients by Ficoll-Paque density gradient centrifugation. Isolated CD4⁺T cells were obtained by negative selection using the MagniSort Human CD4⁺ T Cell Enrichment kit (Invitrogen). The human latently infected cell line J-Lat 10.6 were provided by Dr. Eric Verdin and J-Lat-TLR2 cells were generated in A. Bosque laboratory, both contain a full-length HIV-1 genome with a frameshift in env that restricts the insert from expressing env or nef. Both primary cells and cell line were grown in RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Gibco) 100 U/ml penicillin, and 100 g/ml streptomycin (Capricorn Scientific) (R10) and maintained at 37°C in a 5% CO₂ incubator.

The plasmid encoding HIV-1 strain NL4.3 (pNL4.3) was obtained through the NIH AIDS Reagent Program from Malcom Martin. Viral stocks were generated by transfection of 293T cells with pNL4.3, and the resulting viral particles were titrated in TZMbl cells by enzyme luminescence

assay (britelite plus kit; PerkinElmer) as described previously [45]. The viral stock of HIV_{Bal} was obtained through virus expansion cultures by infecting PHA-stimulated normal donor peripheral blood mononuclear cells (PBMC) with infectious culture supernatant[46].

A partial resection or total tonsils were obtained from paediatric donors following surgery. The tonsillar tissue was placed in R20 (RPMI 1640 medium supplemented with 20% of FBS and antibiotics) and processed immediately under aseptic conditions. Tonsils were then dissected into ~8-mm³ blocks after removing all the cauterized and blooded sections. Tissue blocks were then mechanically digested by disrupting the tissue with a disposable pellet pestle (turning 20 times left and 20 times right). Once digested, the cellular suspension was filtered, using a 70 µm filter, and washed twice with PBS 1X.

HIV-latency model using primary CD4⁺ T cells

PBMCs from healthy donors were thawed and CD4 T cells were isolated, as described above. Cells were infected with HIV-1_{NL4.3} or HIV-1_{Bal} for 4 hours at 37°C and 5% CO₂. Cells were washed twice with PBS 1X and cultured in R10 with IL-2 (10 U/ml) and IL-7 (0.1 nM). After 2 days of infection, Raltegravir (1 µM), Darunavir (1 µM) and Nevirapine (1 µM) were added to the cell culture to prevent new rounds of viral infection. Next day, cells were incubated with Q-VD-OPh (quinolyl-valyl-O-methylaspartyl-[-2,6-difluorophenoxy]-methyl ketone, Selleckchem) (10 µM) for 2 hours at 37°C and 5% CO₂, in R10 medium containing IL-2, IL-7 and antiretroviral drugs at the indicated concentrations, and then latent viral infection was reactivated during 22h with LA (100 µg/ml) or PMA and Ionomycin (81 nM PMA; 1 µM Ionomycin). For the quantification of the viral protein p24, the following antibodies were used for cell surface and intracellular staining: CD3 (PerCP, BD Biosciences), CD8 (APC, BD Biosciences) and p24 (PE, clone KC57 RD1; Beckman Coulter). Cell viability was determined using a far red viability dye for flow cytometry (LIVE/DEAD fixable Far Red Dead Cell Stain kit, Invitrogen). Samples were acquired in a BD FACS Calibur flow cytometer and analyzed with FlowJo v10.6.1 software (TreeStar).

Viral reactivation in samples from suppressed ART-treated patients

For HIV-RNA quantification, CD4⁺ T cells were isolated from PBMC samples from aviremic patients. To prevent apoptosis of viral reactivated cells, CD4⁺ T cells were incubated with Q-VD-OPh for 2 hours before the addition of the stimulus. Then, LA (100 µg/ml), PMA (81 nM) and Ionomycin (1µM) or the vehicle (DMSO) were added to the culture during 22h. At least 5M of CD4⁺ T cells were used per condition. In order to prevent new rounds of viral infection after viral

reactivation, cells were also treated with Raltegravir (1 μ M). Then, cells were washed twice with PBS 1X and lysed with the specific buffer (NLR buffer, NZYTech) for RNA extraction and viral quantification.

To determine the half maximal effective concentration (EC₅₀) of LA at reactivate latent HIV, 4 serial dilutions were tested in CD4⁺ T cells from 3 different ART-treated patients (100 μ g/ml, 50 μ g/ml, 25 μ g/ml and 12.5 μ g/ml). After 22h cells were washed and subjected to nucleic acid extraction and HIV-RNA quantification.

Viral reactivation was also measured as the percentage of cells expressing p24 after drug exposure. Isolated CD4⁺ T cells were previously treated with Q-VD-OPh for 2 hours to prevent cell apoptosis, followed by 22h incubation with LA, PMA/Ionomycin or DMSO control. After, cells were washed and stained with antibodies to identify CD4⁺ T cells expressing the viral protein p24. The following antibodies were used for cell surface and intracellular staining: CD3 (PerCP, BD Biosciences), CD8 (APC, BD Biosciences) and p24 (PE, clone KC57 RD1; Beckman Coulter). Cell viability was measured using a far red viability dye for flow cytometry (LIVE/DEAD fixable Far Red Dead Cell Stain kit, Invitrogen). Fixed cells were finally acquired in a BD FACS Calibur flow cytometer and analyzed with FlowJo v10.6.1 software (TreeStar).

Quantification of viral nucleic acids by qPCR.

At least 1 million cells were subjected to RNA extraction using the NZY Total RNA Isolation kit (NZYTech). HIV-RNA was reverse transcribed with SuperScript III (Invitrogen) in accordance with the instructions provided by the manufacturer, and cDNA was quantified by qPCR with primers and probes against the HIV long terminal repeat (LTR forward 5'-TTAAGCCTCAATAAAGCTTGCC-3' and LTR reverse 5'-GTTCGGGCGCCACTGCTAG-3'; LTR probe 5'-CCAGAGTCACACACCAGACGG GCA-3'). Copies of HIV RNA were quantified using a standard, and values were normalized to micrograms of RNA of the original sample. For HIV-DNA quantification, between 0.1-1 million CD4⁺ T cells were lysed with a proteinase K-containing lysis buffer (55°C over-night and 5 min at 95°C). Cell lysates were subjected to total HIV-DNA quantification using the same primers described above. The gene for CCR5 was used for cell input normalization.

Cell activation in PBMCs and tonsils

To determine the EC₅₀ of LA at activating immune cells, PBMCs from HIV-infected individuals and cells from tonsillar tissue from HIV negative donors were incubated with different concentrations of LA (100, 80, 60, 40 and 20 μ g/ml) for 22 hours. Cells were then washed and

stained with surface antibodies to identify different subpopulations. The following antibodies were used: CD3 (Pe Cy7, Biolegend), CD4 (AF700, BD Biosciences), CD8 (APC, BD Biosciences), CD56 (FITC, BD Biosciences), CD69 (Pe-CF594, BD Biosciences), CD123 (BV786, BD Biosciences) and HLA-DR (SB600, eBioscience). Cell viability was determined using a violet viability dye for flow cytometry (LIVE/DEAD fixable Violet Dead Cell Stain kit, Invitrogen). Samples were run on an LSR Fortessa four-laser flow cytometer (Becton Dickinson) and analyzed with FlowJo v10.6.1 software (TreeStar).

CD8⁺ T cell cytotoxicity assay against viral reactivated cells

At least 100 million PBMCs from 9 suppressed ART-treated patients were used. 50 million cells were used to isolate CD4⁺ T cells (Magnisort Human CD4 T cell Enrichment kit, Invitrogen), and 50 million cells were set aside for CD8⁺ T cell isolation (Magnisort Human CD8 T cell Enrichment kit, Invitrogen). CD4⁺ and CD8⁺ T cells were incubated with Q-VD-OPh for 2 hours before the addition of the stimulus to prevent cell apoptosis. CD8⁺ T cells were incubated with LA (100µg/ml) or DMSO control for 4 hours. Then, CD8⁺ T were washed and co-cultured (ratio 2:1, CD4:CD8) with previously virally reactivated CD4⁺ T cells using PMA (81nM)/Ionomycin (1µM) during 22h. Co-cultures were maintained for 20 hours and then cells expressing p24 were assessed by flow cytometry using the following antibodies: CD3 (PerCP, BD Biosciences), CD8 (APC, BD Biosciences) and p24 (PE, clone KC57 RD1; Beckman Coulter). Cell viability was determined using a far red viability dye for flow cytometry (LIVE/DEAD fixable Far Red Dead Cell Stain kit, Invitrogen). Fixed cells were finally acquired in a BD FACS Calibur flow cytometer and analyzed with FlowJo v10.6.1 software (TreeStar).

RNA FISH/flow assay of single cells expressing HIV-1 RNA transcripts after viral reactivation

PBMCs from 5 ART-treated HIV-infected patients were obtained by Ficoll Hypaque and CD4⁺ T cells were isolated by negative selection using magnetic beads (MagniSort Human CD4⁺ T Cell Enrichment; eBioscience). Prior to viral reactivation, cells were pre-incubated with the pan-caspase inhibitor Q-VD-OPh for 2h. In order to block new rounds of viral infection during viral reactivation, cells were treated with LRAs in the presence of Raltegravir (1µM) during 22h. Afterwards, cells were subjected to the RNA FISH/flow protocol for the detection of HIV transcripts following the manufacturer's instructions (Human PrimeFlow RNA Assay; eBioscience) with some modifications, as previously described[33]. Briefly, PBMCs were stained with antibodies against cell surface markers and viability dye. Cells will be then fixed and permeabilized. After an additional fixation step, cells will be ready for 3h of probes hybridization

at $40\pm 1^\circ\text{C}$ with a high-sensitivity target-specific set of 50 probes spanning the whole Gag-Pol HIV mRNA sequence (bases 1165 to 4402 of the HXB2 consensus genome). The cells will be then subjected to different amplification steps (sequential 2h incubations at 40°C). Finally, multiple label probes will be hybridized with the specific amplifiers (1 h at 40°C) and samples will be run on an LSR Fortessa four-laser flow cytometer (Becton Dickinson).

In these experiments, to identify the different CD4^+ T cell subpopulations expressing HIV-1 RNA, the following antibodies were used for cell surface staining: CD3 (AF700, Biolegend), CCR7 (Pe-CF594, BD Biosciences), CD45RO (BV605, Biolegend) and CD95 (Pe-Cy5, BD Biosciences). The CD4^+ T cell subset phenotypes were identified as follows: T_{NA} ($\text{CD3}^+ \text{CCR7}^+ \text{CD45RO}^- \text{CD95}^-$); T_{SCM} ($\text{CD3}^+ \text{CCR7}^+ \text{CD45RO}^- \text{CD95}^+$); T_{CM} ($\text{CD3}^+ \text{CCR7}^+ \text{CD45RO}^+$); $T_{\text{EM/TM}}$ ($\text{CD3}^+ \text{CCR7}^- \text{CD45RO}^+$) and T_{TD} ($\text{CD3}^+ \text{CCR7}^- \text{CD45RO}^-$). The surface marker CD32 (Pe-Cy7, Biolegend) was also included in the analysis. The expression of HIV-1 RNA transcripts was analyzed with target-specific AF647-labelled probes and cell viability was determined using a violet viability dye for flow cytometry (LIVE/DEAD fixable Violet Dead Cell Stain kit, Invitrogen). All values of HIV-1 RNA were normalized to the negative control (R10) corresponding to the non-reactivated cells from each patient.

Metabolomic analysis

CD8^+ T cells from 5 viral-suppressed ART-treated individuals were isolated by negative selection and were treated with LA ($60\mu\text{g}/\text{ml}$) for 22h. For metabolomics analysis, a protein precipitation extraction was performed by 0.5 mL of methanol:water (8:2) containing internal standard mixture (succinic acid-d4, myristic acid-d27, glicerol-13C3 and D-glucose13C6) to cell pellets and homogenized with an ultrasonic probe (3 cycles, 20% amplitude, 10 sec/cycle) for 1 minute and incubated at -20°C for 30 min. Then, the samples were centrifuged at 15,000 rpm and supernatant was evaporated to dryness before compound derivatization (metoximation and silylation). The derivatized compounds were analysed by GCqTOF (model 7200 of Agilent, USA). The chromatographic separation was based on Fiehn Method, using a J&W Scientific HP5-MS (30 m x 0.25 mm i.d., 0.25 μm film capillary column and helium as carrier gas using an oven program from 60 to 325°C . Ionization was done by electronic impact (EI), with an electron energy of 70eV and operated in full sScan mode. In addition of targeted compounds from central carbon metabolism which were quantified using internal standard calibration curves, a screening for the identification of more metabolites was performed by matching their EI mass spectrum and retention time to metabolomic Fiehn library (from Agilent) which contains more

than 1.400 metabolites. After putative identification of metabolites, these were semi-quantified in terms of internal standard response ratio.

Proteomic analysis

Cell lysis and protein extraction from CD8⁺ T cell pellets were performed according to RIPA buffer protocol (Fisher Scientific). First, protein extraction was performed by adding 0.5 mL of RIPA buffer and homogenized with an ultrasonic probe (3 cycles, 20% amplitude, 10 sec/cycle) for 1 minute. Afterwards, homogenised extracts were incubated under stirring for 15 min at 4°C and centrifuged at 14000 rpm, for 15 min. The supernatants were collected for protein precipitation with the addition of 10% TCA/acetone. Then, protein pellets were resuspended in 6M urea/50 mM ammonium bicarbonate (ABC) for digestion. Then, 20 µg of total protein for CD8 cells (quantified by Bradford's method) were reduced with 4 mM 1,4-Dithiothreitol (DTT) for 1h at 37°C and alkylated with 8 mM iodoacetamide (IAA) for 30 min at 25°C in the dark. Afterwards, samples were digested overnight (pH 8.0, 37°C) with sequencing-grade trypsin (Promega) at an enzyme:protein ratio of 1:50. Peptides were desalted on Oasis HLB SPE column (Waters) and labelled with TMT 11-plex reagents (Thermo Fisher) following the manufacturer's instructions. To normalize all samples in the study, a pool containing all of the samples was labeled with TMT-126 tag and included in each TMT batch.

Multiplexed samples were on-line fractionated by High pH Reversed-Phase Peptide Fractionation Kit (ThermoFisher) coupled to a C18 trap nano-column (100 µm x 2 cm; 5 µm, Thermo Fisher) and a C-18 analytical nano-column (75 µm x 15 cm; 3 µm, Nikkyo Technos) on an EASY-II nanoLC chromatograph (Thermo Fisher) by a gradient a continuous water-acetonitrile (0.1% formic acid) elution gradient at 300 nl/min. Mass spectrometry analyses were performed on an LTQ-Orbitrap Velos Pro (Thermo Fisher) by acquiring an enhanced FT-resolution spectrum (R=30,000 FHMW) followed by two data-dependent MS/MS scan events from the most intense ten-parent ions with a charge state rejection of one and a dynamic exclusion of 0.5 min. Thus, an HCD fragmentation (40% NCE) with FT-MS/MS acquisition (R=15,000 FHMW) was conducted for peptide quantification. Protein identification/quantification was performed on Proteome Discoverer software v.1.4.0.288 (Thermo Fisher) by Multidimensional Protein Identification Technology (MudPIT). For protein identification, the MS and MS/MS spectra were analyzed using Mascot search engine (v.2.5) with SwissProt_2016_07.fasta database, restricted for human taxonomy and assuming trypsin digestion. Two missed cleavages and an error of 0.02 Da for FT-MS/MS, 0.8 Da for IT-MS/MS and 10.0 ppm for a FT-MS spectra were allowed. The TMT-

10plex was set as quantification modification, oxidation of methionine and acetylation of N-termini were set as dynamic modifications, whereas carbamidomethylation of cysteine was set as static modification. The false discovery rate (FDR) and protein probabilities were calculated by Percolator.

Discussion

Current antiretroviral drugs maintain the viral load under the limit of detection; however, the interruption of the treatment results in an immediately rebound of the virus. Several strategies are investigated as an additional treatment despite ART, aimed to reduce or eliminate the HIV reservoirs. The “shock and kill” strategy is based on the reactivation of the latent virus using drugs called latency reversal agents (LRAs), and the killing of those reactivated cells by the cytopathic effects or the action of the immune system. Clinical trials using LRAs, however, have not shown significant efficacy at reducing the size of viral reservoirs. The most accepted hypotheses that would explain these results are that current LRAs do not induce viral transcription in all infected cells, and that immune effector cells do not efficiently kill viral reactivated cells. Concurring with the first statement, we have recently reported that LRAs do not fully reactivate latent HIV present in all subpopulations of CD4⁺ T cells that compose the latent reservoir [34]. This is noteworthy because in order to reduce the viral reservoir and induce prolonged remission (>20 years), new strategies will need to target at least 99.9% of all infected cells [47]. Moreover, it has been shown that multiple rounds of LRAs are needed to increase the pool of viral-reactivated cells [48]; but long-term exposure to current LRAs are not possible due to their intrinsic toxicity. In addition, previous investigations have shown that LRAs might have deleterious effects on the main effector immune cells: NK[49] and CD8⁺ T cells[40, 41] showing an imbalance between HIV-reactivation efficacy and cell toxicity. For instance, only the use of LRAs in combination with therapeutic vaccines that stimulate CD8⁺ T cell responses has showed promising results in a clinical trial [50]. Thus, broader LRAs acting in most HIV infected cells and with a low toxicity profile allowing its daily use, will significantly overcome this important limitation. Thus, here we propose Lauric Acid (LA), a natural compound, as a novel latency reversal agent.

In this study, we investigated for the first time the impact of LA on its ability to reactivate the latent HIV reservoir and on its capacity to modulate cytotoxic CD8⁺ T cells responses. Using several methodologies, we studied the reactivation of latent HIV from cellular reservoirs induced by LA by the detection of HIV-1 RNA transcripts and the viral protein p24, and the effect of this fatty acid on the function and metabolism of CD4⁺ T cells and the cytotoxic CD8⁺ T cell population. We observed that in viral latency models, both in cell lines and in primary CD4⁺ T cells, LA was able to induce a notable reactivation of HIV at concentrations of 40µg/ml producing also detectable levels of viral proteins. Of note, in vivo there are no evidence for toxic effects of LA at dose levels equivalent to 9,000 mg LA/kg body weight[9]. When we focused on the cell

primary latency model, the levels of p24 achieved by LA were comparable of those obtained with the positive control PMA and Ionomycin. It has been described that some LRAs, such as Givinostat or Ingenol among others, can produce, *in vitro*, higher or similar p24 protein levels than those induced by the positive control[51, 52]. This suggest that LA might be able to produce higher levels of multiply spliced Tat-Rev HIV-1 transcripts instead of unspliced HIV-1, as has been reported during TCR stimulation with anti-CD3/CD28 antibody-coated beads[53]. To further elucidate the mechanism by which LA reactivates latent HIV, we first focused on its ability to activate toll-like receptors (TLR). We used a modified clone of J-lat cells expressing TLR-2, since it has been shown that LA could induce the activation of transcription factors such as NF- κ B through the activation of TLR 2 and 4[54-56]. For instance, a study performed in primary CD4⁺ T cells from healthy donors, determined that memory CD4⁺ T cells could express constitutively TLR-2[57]. We observed that J-lat cells expressing TLR-2 were readily reactivable after exposure to LA, however levels were lower than cells not expressing TLR-2, indicating that this TRL might have a limited impact on viral reactivation. Furthermore, our results indicated that the expression of HIV in the presence of LA was partially dependent on the downstream activation of NF- κ B, since its specific inhibition significantly reduced HIV reactivation. This result is in fully agreement with the widely reported role of NF- κ B on HIV reactivation[58-62]. Interestingly, we observed in our lipidomic analysis that CD4⁺ T cells treated with LA produced significant amounts of Phosphatidylcholines. Arenzana-Seisdedos et al., showed that breakdown of phosphatidylcholine induced functional activation of NF- κ B and increased HIV transcription[36], which is in fully agreement with the role of NF- κ B in viral reactivation in the presence of LA observed in **Figure 1D**. Thus, HIV might repurpose the composition of the lipid content of the cells to enhance the production of new viral particles. Moreover, we observed upregulation of Diacylglycerol, a product of Phosphatidylcholine hydrolysis, but also a metabolite directly involved in the activation of PKC enzymes [37]. This is significant, since PKC agonists and their analogs, are a well-recognized family of latency reversal agents and have been showed to upregulate cell surface expression of CD69 in CD4⁺T cells, which is well-known to directly correlate with PKC activity[32]. In this sense, several recent studies with PKC agonists have demonstrated a direct correlation between CD69 expression and HIV-1 latency reversal *in vitro*[63, 64], which is in agreement with our findings and suggests that LA might share a similar mechanism of action than the traditional PKC agonists.

Besides, several other mechanisms might also be responsible of the LA action on the viral reservoir; it may signal trough the mitochondrial antiviral signaling protein (MAVS), a

downstream effector protein of RLRs RIG-I and MDA-5. As previously shown for Ingenol (PCK agonist) and Acitretin[65, 66], LA may induce HIV-1 reactivation from latency by the chemical generation of reactive oxygen species (ROS) that activates the anti-Oxidative Stress (AOS) response through a MAVS dependent mechanism.

We also showed that LA was able to induce a significant increase in HIV-transcription, mostly supported by cells with effector/transitional memory phenotypes. This finding is in agreement with our previous works in which we determined that effector subsets are the main source of residual transcription in ART-treated patients and are the most susceptible subsets to viral reactivation[33, 34]. Moreover, LA not only induced the transcription of HIV-RNA but also the production of the viral protein p24 in samples from ART-treated patients. Of note, most of the LRAs that have been currently tested *in vitro* are somehow efficient at stimulating viral transcription, but they have showed moderate capacity to produce viral proteins[34, 67]. In this regard LA accomplish the essential features of a potent LRA candidate because induces viral transcription with the concomitant production of proteins, and without compromising the viability of target cells.

Importantly, our flow cytometry expression assay and the metabolomic analysis showed that LA did not induce a global activation of CD8⁺ T cells, nor precluded their cytotoxic function. This finding is relevant because it is well known that HIV-infected patients, including those virally-suppressed by ART, present an altered CD8⁺ T functional profile[68, 69]. During the acute infection, cytotoxic CD8⁺ T cells develop robust responses that led to control of viremia and to the establishment of the viral set point. However, this viral control is partial and HIV-specific CD8⁺ T cells gradually lose cytotoxic potential and their capacity to proliferate and to produce cytokines[70]. In addition, the inflammatory environment, the continuous antigen stimulation and the persistent activation of these cells lead to the upregulation of inhibitory immune checkpoint and the inevitable development of T cell exhaustion and immunosenescence[71]. Importantly, CD8⁺ T cells treated with LA present a less activated profile and maintain their capacity to kill viral-reactivated cells, measured by functional assays and by the expression of genes related to effector functions. In contrast, other LRAs tested in clinical trials, such as Vorinostat, Romidepsin and Panobinostat, have shown to compromise the cell viability and impair the killing of infected cells by CD8⁺ T cells *in vitro*[41].

It has been described that fatty acids and their metabolism play an important role in HIV infection. A recent report from Kulkarni et al.[28], demonstrates that fatty acid synthase (FASN)

is essential for the late steps of HIV viral replication, suggesting that the regulation of fatty acid metabolism could be a key point to develop new antiretroviral strategies. Moreover, other study from Angela et al.[27], suggested that the metabolism of fatty acid, including the regulation of fatty acid biosynthesis and fatty acid uptake programs, is crucial to the full activation of CD4+ T cells, an essential step for the reactivation of latent HIV. Several studies demonstrated the implication of fatty acid metabolism in the T cell function, indicating that regulation of this mechanisms may reveal strategies for manipulating immune responses towards therapeutic outcomes[68, 72-75]. In this study, we observed that LA reprograms CD8⁺ T cells to obtain energy through the β -oxidation pathway. It has been well described that T cell function is intimately linked to cellular metabolism[75]. A clear example of the implication of metabolism on the activity of cytotoxic CD8⁺ T cells is found in elite controller individuals. Several studies demonstrate that these HIV-infected patients present different metabolic profiles of memory CD8⁺ T cells associated with control or progression of HIV-1 infection compared with ART-treated patients[68, 72]. Tarancon-Diez determined that the spontaneous loss of control of HIV infection observed in transient controllers was related with aerobic glycolytic metabolism, deregulated mitochondrial function and increased immunological activation. In the same line, Sáez-Ciri3n observed that CD8⁺ T cells from EC had higher levels of fatty acid uptake and relied on both glucose and fatty acid metabolism to respond efficiently to HIV-1 antigens, despite CD8⁺ T cells from non-controllers ART-treated patients had strict dependency on glucose metabolism and limited capacity to control infection. Thus, our results are in line with the hypothesis that reprogramming CD8⁺ T cells to rely on fatty acid metabolism might be a critical step to promote an efficient cytotoxic response and to induce the clearance of the HIV reactivated cells.

Interestingly, we also observed that LA treatment promoted the enhancement of the proteasome activity. It has been previously described that an increase of the proteasomic activity in CD8⁺ T cells early during differentiation results in the acquisition of memory cell characteristics, whereas reduction of proteasome activity confers attributes of terminal effector lymphocytes[44]. Thus, cell energy metabolism may be pharmacologically manipulated during an immune response to promote CD8⁺ T memory to generate protective immunity. It is tempting to speculate that *in vivo* administration of LA could induce the generation of memory cells after viral gene expression and therefore might help to control viral persistence. Our work indicates that compounds with the potential to regulate cell metabolism, like LA, hold promise as immunotherapeutics and as modulators of CD8 T cell responses for *in vivo* therapies.

In conclusion, this study highlights the ability of LA to reactivate HIV hidden in diverse cellular reservoirs and preserves immune cytotoxicity, postulating as a new natural latency reversal agent. The high availability of LA as a food additive, the reduced associated toxicity in vitro and in vivo, the cost-efficacy and its effectiveness at reactivating latent HIV, makes LA a suitable candidate to be tested in future clinical trials aimed to purge the viral reservoir.

Figure 1

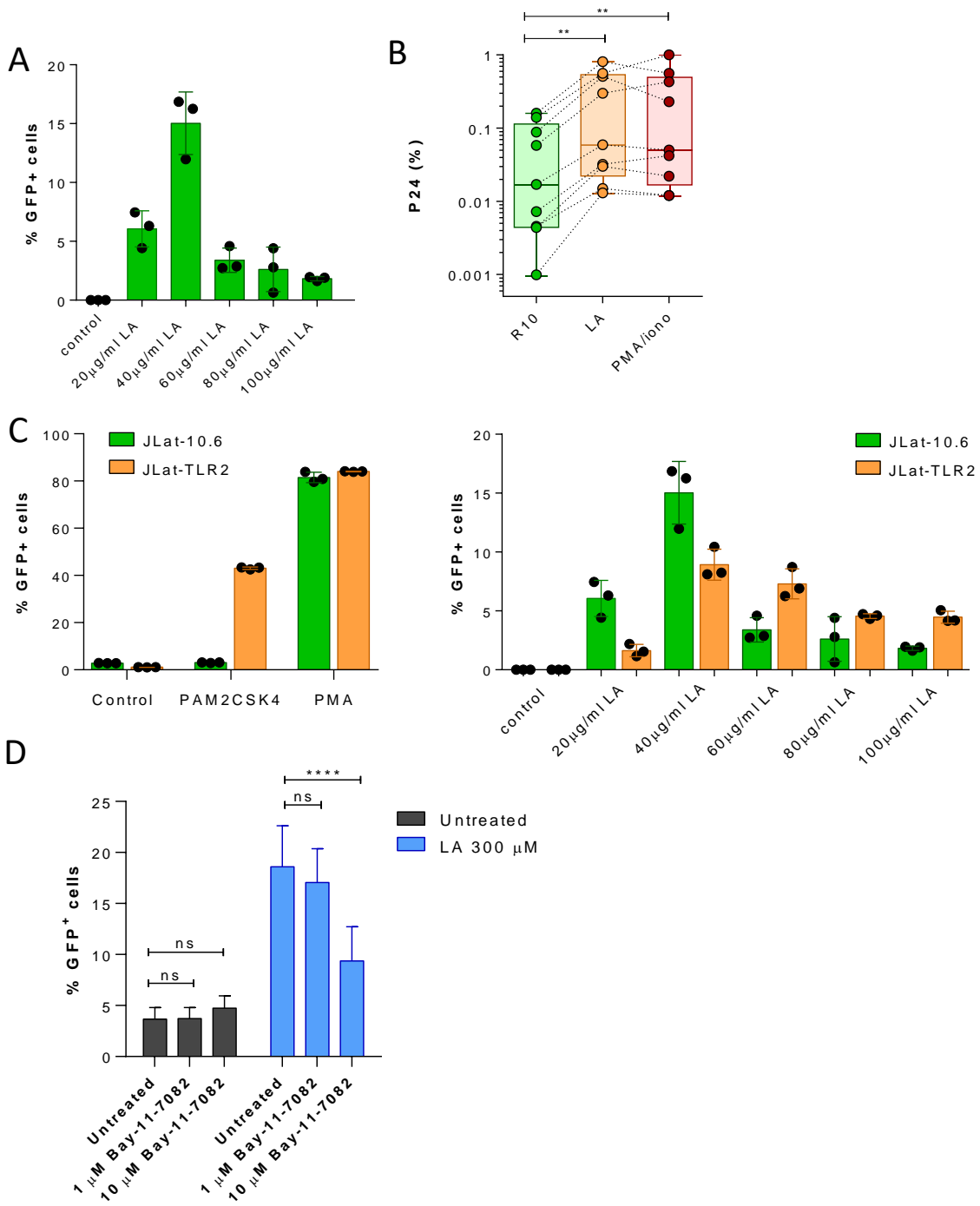


Figure 2

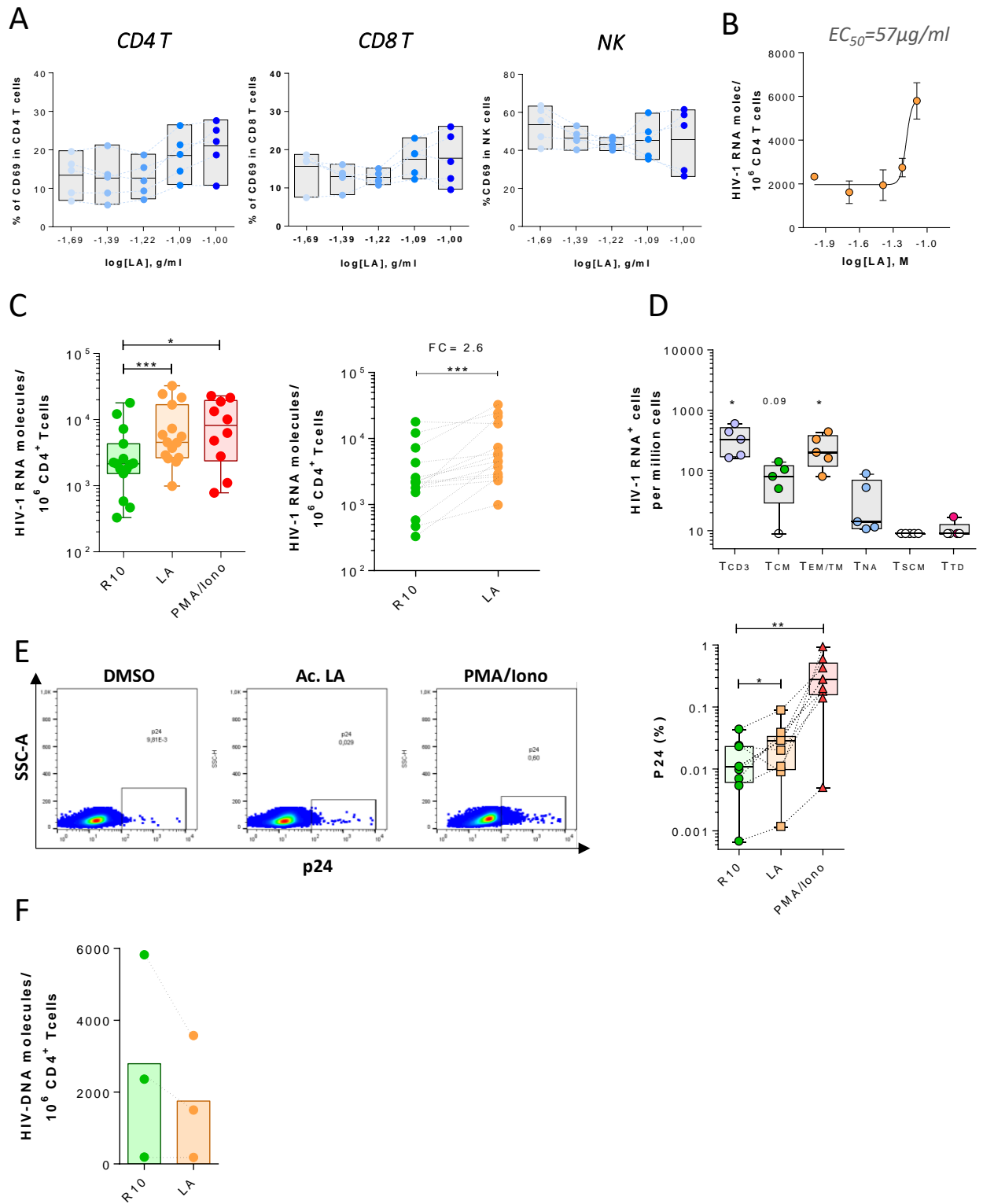


Figure 3

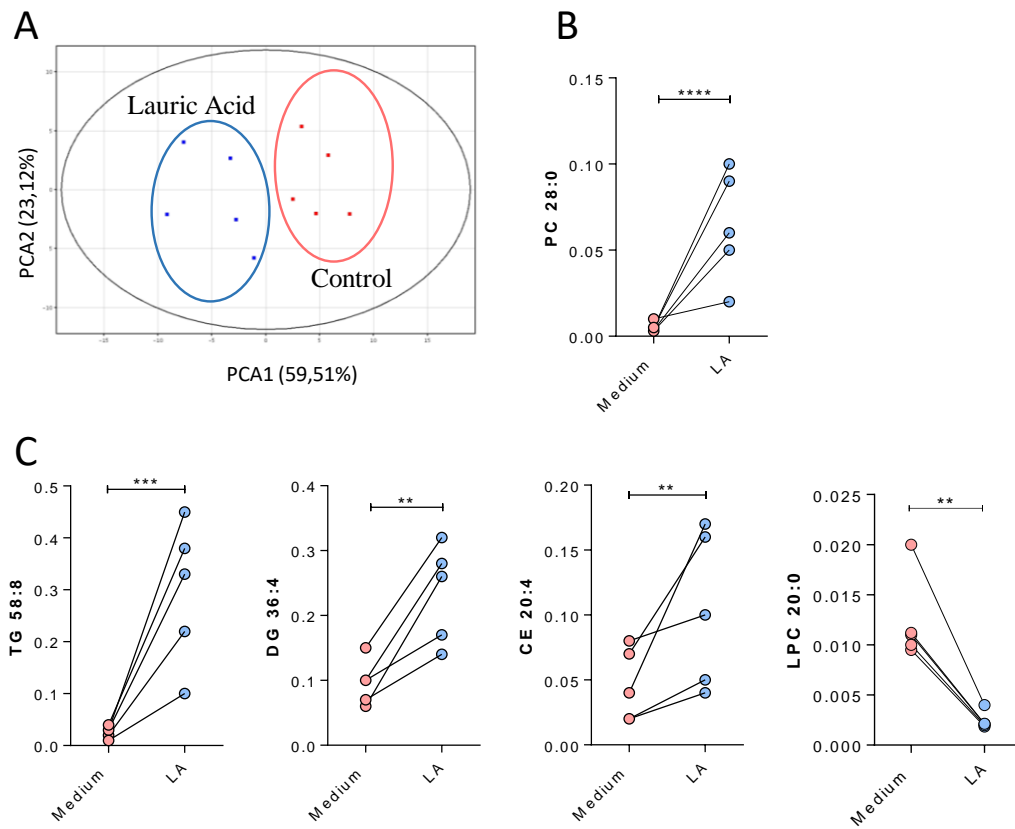


Figure 4

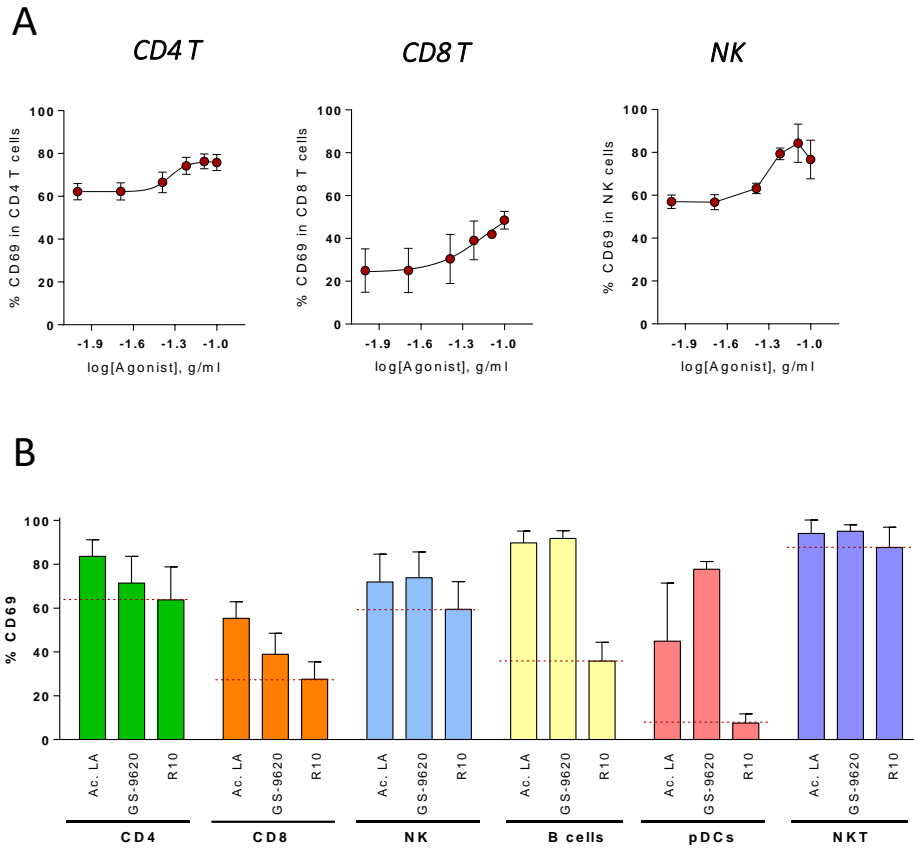


Figure 5

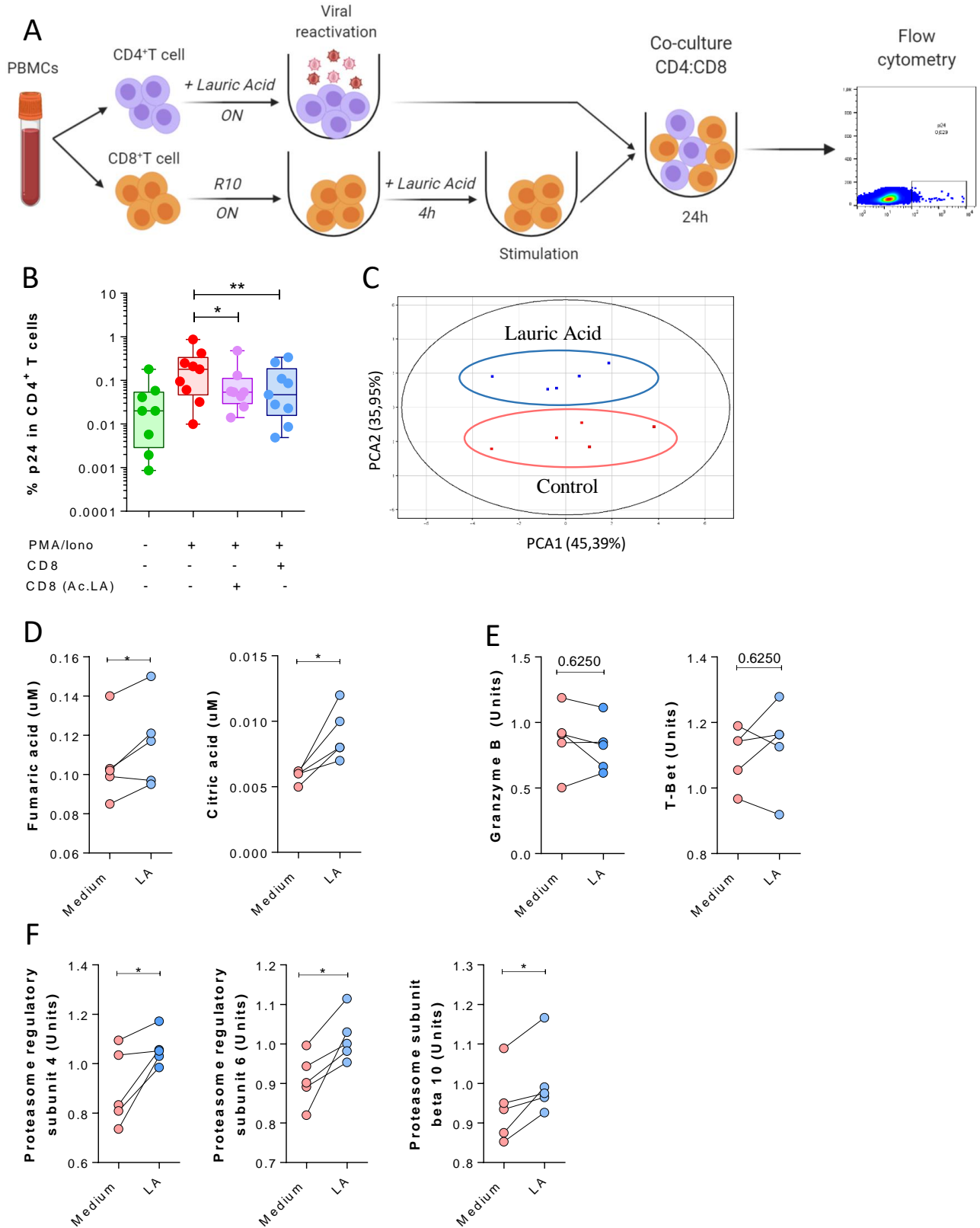


Figure S1

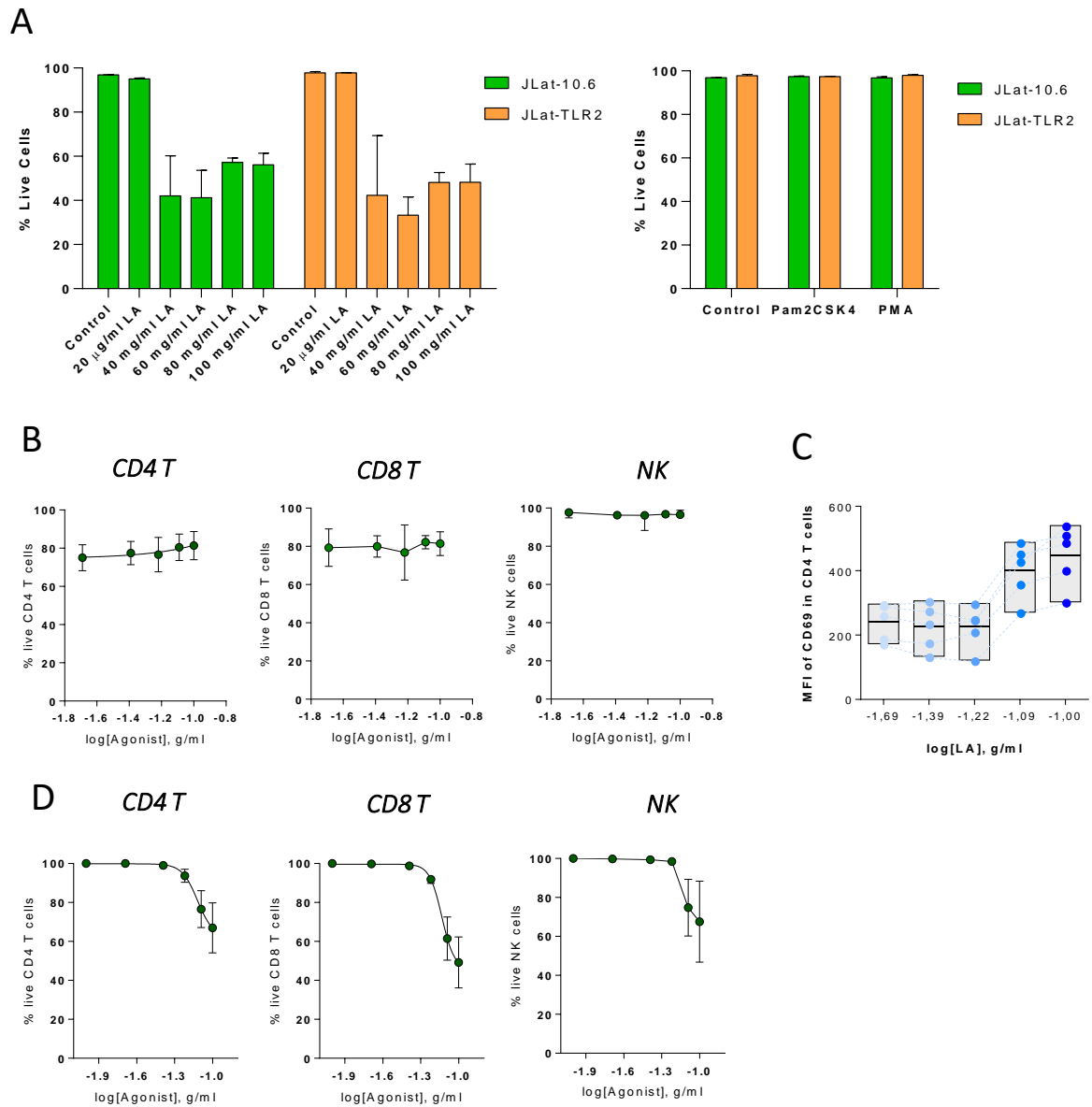


Figure S2

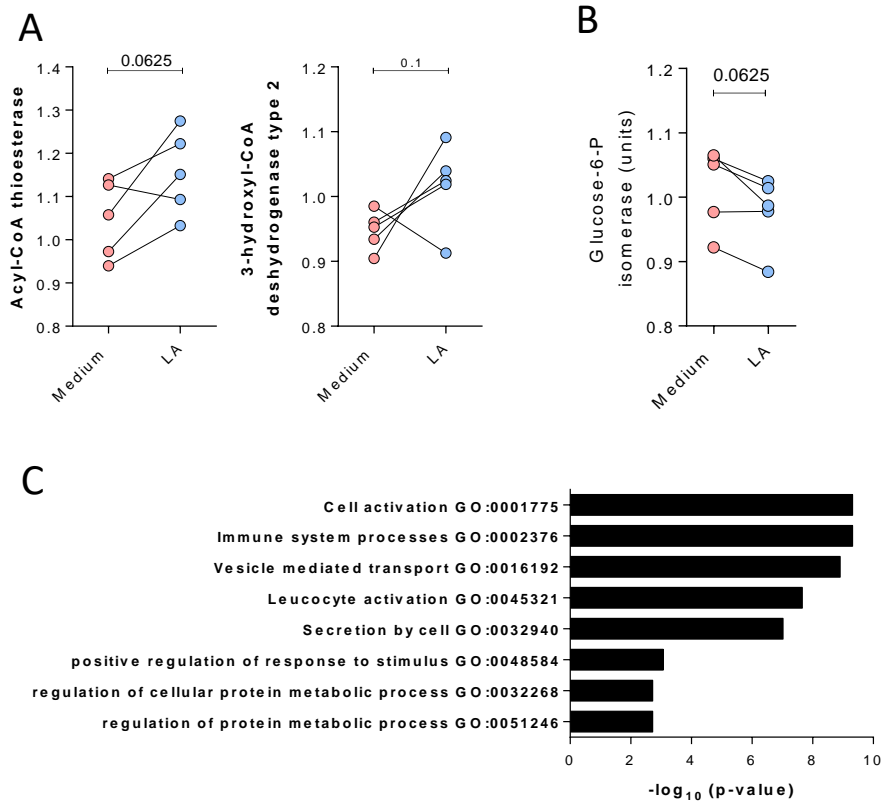


Figure Legend

Figure 1. HIV reactivation induced by Lauric acid in *in vitro* cell models. HIV reactivation was measured as expression of GFP (cell line model) or p24 (primary cell model) after 22h in presence of LA. **(A)** J-lat 10.6 cells were incubated with different concentrations of LA (20-100 $\mu\text{g/ml}$) for 22 hours, then GFP levels were quantified by flow cytometry. Background (considered as the GFP levels in the basal condition) was subtracted in each condition. **(B)** In a HIV latency model of primary cells, reactivation of HIV by LA was evaluated as the expression of the viral protein p24. Cells were reactivated with 100 $\mu\text{g/ml}$ of LA or PMA and Ionomycin, used as a positive control, for 22h and the frequency of p24⁺ cells was compared with the negative control (R10) using a Mann-Whitney test. **(C)** J-lat 10.6 standard clone (in green) and a J-lat 10.6 clone genetically engineered to express TLR-2 (in orange) were used to elucidate if TLR2 was implicated in the signalling pathway. Pam2CSK4, a specific TLR1/2 agonist and PMA/Ionomycin, were used as positive controls, and GFP was measured in both cell lines after stimulation with LA (20-100 $\mu\text{g/ml}$) for 22 hours. **(D)** J-lat 10.6 cells were stimulated with 60 $\mu\text{g/ml}$ of LA (blue bars) or not (black bars) in the presence of the NF- κB specific inhibitor Bay 11-7082 (1 μM or 10 μM) for 22h. Comparisons in B between R10 and reactivated conditions in terms of HIV-RNA were performed using a Wilcoxon test. Comparisons in D between treated and untreated conditions with the inhibitor were compared using a Mann-Whitney test. * $P < 0,05$, ** $P < 0,001$ and **** $P < 0,0001$; ns no significant.

Figure 2. Lauric acid induces HIV reactivation in samples from HIV-suppressed individuals. CD4⁺ T cells were obtained by negative selection from blood samples of HIV-infected patients, and HIV-RNA and p24 protein was evaluated after incubation with 100 $\mu\text{g/ml}$ of Lauric acid. **(A)** Cell activation induced by different concentrations of LA (20-100 $\mu\text{g/ml}$) was measured as expression of CD69 marker in CD4⁺ T cells, CD8⁺ T cells and NK cells. **(B)** The half maximal effective concentration (EC_{50}) of LA was calculated in CD4⁺ T cells from 3 suppressed HIV- infected patients by extraction of HIV-RNA induced by 4 serial dilutions of the LA (from 100 $\mu\text{g/ml}$ to 12.5 $\mu\text{g/ml}$). **(C)** HIV-RNA was quantified after viral reactivation with 100 $\mu\text{g/ml}$ of LA (n=15), the positive control PMA (81nM) and Ionomycin (1 μM) (n=10) and the basal negative control (R10) (left) and fold-change between basal condition and reactivated by LA was calculated (right). **(D)** RNA/FISH flow protocol was performed in CD4⁺ T cells from 5 patients and the percentage of HIV-RNA expressing cells in different CD4⁺ T cell subpopulations (T_{CM} , $T_{\text{EM/TM}}$, T_{NA} , T_{SCM} and T_{TD}) was calculated. **(E)** Intracellular detection of p24 viral protein was analysed by flow cytometry. Representative gating for each condition is shown (left panel). **(F)** HIV-DNA in CD4⁺ T cells was

quantified after viral reactivation with LA (100µg/ml). *P<0,05 **P<0,01 and ***P=0,001. Open circles corresponded to values under the limit of detection. Comparisons between R10 and viral reactivated conditions in terms of HIV-RNA were performed using a Wilcoxon test. Comparison in D and E was performed using a one-side Wilcoxon test. For all experiment cells were incubated with Q-VD-OPh for 2 hours before the addition of the fatty acid.

Figure 3. Lipidomic analysis of CD4⁺ T cells from ART-treated suppressed HIV-infected patients treated with Lauric acid. (A) Principal Component Analysis (PCA) showing the differential expression of lipidic profile between the studied groups; treated with LA at 60µg/ml (blue, n=5) and DMSO control (red, n=5). Box-plot graphs showing the levels of a representative phosphatidylcholines (PC, 28:0) (B) and representative Triglycerols (TG, 58:8), Diacylglycerols (DG, 36:4), cholesteryl esters (CE, 20:4) and Lysophosphatidylcholines (LPC, 20:0) (C) in CD4⁺ T cells treated or not with 60µg/ml of LA.

Figure 4. Lauric acid promotes the activation of several immune cells present in lymphoid tissue. Cells from paediatric tonsils were obtained through the mechanical digestion of small pieces of tonsillar tissue. Isolated cells were then incubated with LA. (A) Cells obtained from tonsils of 3 donors were incubated with different concentrations of LA (20-100 µg/ml) for 24 hours, and the expression of CD69 marker was then evaluated in CD4⁺ T cells, CD8⁺ T cells and NK cells. The half maximal effective concentration (EC₅₀) for each population is also shown. (B) After digestion of fragment from 5 tonsils, cells were treated with Q-VD-OPh for at least 2 hours and then incubated with 100µg/ml of LA or 3uM of the GS-9620 (positive control). After 22h, cells were stained for the evaluation of the CD69 marker by flow cytometry.

Figure 5. Lauric acid does not impair the cytotoxic activity of CD8⁺ T cells. Co-cultures of reactivated CD4⁺ T cells and CD8⁺ T cells were performed to evaluate the impact of LA on the killing of reactivated cells mediated by CD8⁺ T cells. (A) Scheme of the experimental setting. PBMCs from ART-treated patients were obtained by Ficoll-Hypaque gradient. CD4⁺ and CD8⁺ T cells were isolated by negative selection and incubated with 10uM QVD-OPh for at least 2h. CD4⁺ T cells were incubated over-night with 100µg/ml of LA and CD8⁺ T were left in the incubator. Next day, CD4⁺ T were washed to eliminate LA of the supernatant and CD8⁺ T were incubated with 100µg/ml of LA during 4h and then co-cultured with CD4⁺ T cells at a ratio 2:1 (CD4:CD8). After 22h cells were intracellularly stained for the viral p24 protein. (B) The quantification of p24 was performed as an indirect measure of the killing of reactivated cells mediated by CD8⁺ T cells. (C) Principal Component Analysis (PCA) showing the differential expression of the analyzed metabolites between the studied groups; treated with LA at 60µg/ml (blue, n=5) and control

(red, n=5). Box-plot graphs showing the levels of fumaric and citric acid (D), granzyme B and T-bet (E) and Proteasome subunits (F) in CD8⁺ T cells treated with 60µg/ml of LA. Comparisons between conditions were performed using the non-parametric Wilcoxon test. *P<0,05 and **P<0,01; and one-tailed non-parametric Wilcoxon test.

Figure S1. Impact of lauric acid in the viability of different cell types. Toxicity of serial diluted concentrations of LA (from 20µg/ml to 100µg/ml) was evaluated in cell lines Jlat 10.6 and Jlat 10.6-TRL2 (A), in primary cells obtained from blood of suppressed ART-treated HIV-infected individuals (B) and in cells obtained from tonsils of healthy donors (D). Both in panels B and C, CD4⁺ T, CD8⁺ T and NK cells were evaluated. (C). Levels of mean fluorescence intensity (MFI) of CD69 marker in CD4⁺ T cell population through different concentrations of LA (from 20µg/ml to 100µg/ml).

Figure S2. Metabolomic analysis of CD8⁺ T cells from ART-treated suppressed patients treated with Lauric acid. Box-plot graphs showing the levels of acetyl-CoA thioesterase and hydrocyl Co-A deshydrogenase (A), glucose-6-P (B) in CD8⁺ T cells treated with 60µg/ml of LA. (C) Gene Ontology Biological Processes of differentially expressed gene sets are shown in order of significance as $-\log_{10}(P \text{ value})$. Comparisons between conditions were performed using one-tailed non-parametric Wilcoxon.

SUPPLEMENTARY TABLES

Supplementary table 1. Differentially cellular lipid levels comparing CD4⁺ T cells treated or no with LA acid. Box-plot graphs showing the levels of a representative Phosphatidylcholines (PC) (A) and representative Triglycerols (TG), Diacylglycerols (DG), cholesteryl esters (CE) and Lysophosphatidylcholines (LPC) (B) in CD4⁺ T cells treated or not with 60ug/ml of LA.

Compound	p	FC (abs)	Regulation
CE 20:4	1,51E-02	2,22	up
CE 22:6	4,94E-02	1,75	up
DG 36:4	4,73E-03	2,39	up
LPC 16:0	4,11E-02	2,41	up
LPC 16:0 e	1,50E-02	1,83	up
LPC 16:1 e	1,34E-02	1,67	up
LPC 18:0	5,23E-04	2,61	up
LPC 20:0	3,63E-03	3,60	up
PC 24:0	0,00E+00	16,00	up
PC 26:0	0,00E+00	16,00	up
PC 28:0	0,00E+00	16,00	up
PC 30:0	1,75E-04	2,96	up
PC 32:2	6,85E-05	2,34	up
PC 32:3	2,37E-03	2,43	up
PC 34:2	1,05E-02	1,17	up
PC 34:3	2,96E-02	2,11	up
PC 34:4	8,21E-05	5,32	up
PC 34:5	1,51E-02	1,67	up
PC 35:1	4,38E-02	1,26	down
PC 35:3	6,20E-03	1,82	up
PC 35:4	4,75E-03	1,36	up
PC 36:3	1,18E-03	1,16	up
PC 36:5	1,99E-02	1,28	up
PC 36:6	1,54E-03	7,97	up
PC 38:6	7,29E-04	1,70	up
SM 43:2	1,37E-03	1,65	down
TG 42:0	1,91E-02	1,41	up
TG 44:0	2,22E-03	1,53	up
TG 44:1	1,09E-02	1,41	up
TG 46:1	1,12E-03	1,68	up
TG 46:2	1,40E-02	1,45	up
TG 48:1	5,60E-03	1,27	up
TG 48:2	3,28E-03	1,42	up
TG 48:3	2,99E-03	2,48	up
TG 50:1	3,91E-02	1,24	up
TG 50:2	1,84E-02	1,28	up
TG 50:3	1,36E-02	1,69	up
TG 50:4	4,65E-03	9,13	up
TG 52:3	3,31E-02	1,34	up
TG 52:4	1,02E-03	2,78	up

TG 52:5	5,53E-04	7,38	up
TG 52:6	1,81E-02	7,23	up
TG 54:4	2,67E-02	1,79	up
TG 54:5	1,24E-02	2,29	up
TG 54:6	2,83E-03	7,29	up
TG 56:5	1,03E-03	5,74	up
TG 56:6	5,02E-04	7,57	up
TG 56:7	2,64E-04	8,13	up
TG 58:4	4,65E-02	1,46	up
TG 58:8	5,46E-05	11,19	up
TG 60:4	2,39E-02	1,31	up

Supplementary table 2. Differentially cellular metabolite levels comparing CD8⁺T cells treated or no with LA.

Compound	p	FC (abs)	Regulation
Glycine (μM)	1,23E-02	2,380	up
Fumaric acid (μM)	4,52E-02	1,098	up
Glutamine (μM)	1,07E-02	1,809	down
Aspartic acid (μM)	2,36E-02	1,923	down
Hypotaurine (ISTD)	3,49E-02	1,260	up
Citric acid (μM)	2,09E-02	1,475	up
myo-Inositol (ISTD)	7,15E-04	1,390	down
d-Sucrose (ISTD)	3,51E-02	1,577	down
Sum ADP, AMP, ATP (ISTD)	2,82E-02	1,255	down

Supplementary table 3. Differentially cellular protein levels comparing CD8⁺T cells treated or no with LA.

Compound	Swiss-Prot ID	p	FC (abs)	Regulation
Voltage-dependent anion-selective channel protein 1	P21796	3,00E-02	1,0354	up
Tropomyosin alpha-3 chain	A0A087WWU8	3,33E-02	1,0649	up
Rho GDP-dissociation inhibitor 1	P52565	8,28E-03	1,0744	down
ATP synthase subunit d, mitochondrial	O75947	1,88E-02	1,0785	up
Tubulin alpha-1A chain	Q71U36	2,93E-02	1,0943	down
Myosin-9 OS=Homo sapiens	P35579	2,49E-02	1,0559	down
Calpain small subunit 1	P04632	7,57E-04	1,0913	down
X-ray repair cross-complementing protein 5	P13010	4,84E-02	1,0502	down
Actin-related protein 3	P61158	2,24E-02	1,0531	down
Talin-1	Q9Y490	1,26E-02	1,0899	down
Protein disulfide-isomerase A3	P30101	1,48E-02	1,0517	up
Fermitin family homolog 3	Q86UX7	2,02E-04	1,1301	down
X-ray repair cross-complementing protein 6	P12956	2,28E-02	1,0452	down
Moesin	P26038	4,30E-02	1,0787	down
Nucleosome assembly protein 1-like 4	Q99733	1,36E-02	1,0510	down
Ras-related protein Rab-1A	P62820	4,23E-02	1,0578	down
Deoxynucleoside triphosphate triphosphohydrolase SAMHD1	Q9Y3Z3	4,00E-02	1,0277	down
Neuroblast differentiation-associated protein AHNAK	Q09666	1,43E-02	1,0522	down
Endoplasmic reticulum chaperone BiP	P11021	1,90E-03	1,0721	up
Na(+)/H(+) exchange regulatory cofactor NHE-RF1	O14745	4,68E-02	1,0583	down
Transforming protein RhoA	P61586	3,30E-02	1,2410	down
T-cell surface glycoprotein CD3 epsilon chain	E9PSH8	3,88E-02	1,0522	down
60S acidic ribosomal protein P2	P05387	2,69E-02	1,1289	up
Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 6	P29350	3,98E-02	1,0214	down
SUN domain-containing protein 2	Q9UH99	1,64E-03	1,1278	down
Testin	Q9UGI8	6,26E-03	1,0662	down
F-actin-capping protein subunit alpha-2	P47755	3,47E-02	1,0854	up
40S ribosomal protein S5 (Fragment)	M0R0F0	4,90E-02	1,0438	up
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 5	A0A087X1G1	5,67E-03	1,1116	up
Platelet basic protein	P02775	6,00E-03	1,2066	down
ATP5MF-PTCD1 readthrough	C9JIT5	1,13E-02	1,1428	down
Tyrosine-protein kinase ZAP-70	P43403	5,00E-02	1,0568	down
Actin-related protein 2	P61160	4,44E-03	1,0733	down
Proteasome subunit beta type-10	P40306	2,05E-02	1,0690	up
High mobility group protein B2	P26583	3,26E-02	1,1073	down
60S ribosomal protein L14	E7EPB3	3,54E-02	1,0913	down

Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial	P31930	3,31E-02	1,0407	up
HLA class I histocompatibility antigen, A alpha chain (Fragment)	A0A140T933	2,64E-02	1,2172	up
26S proteasome regulatory subunit 6B	P43686	2,34E-02	1,1165	up
40S ribosomal protein S13	P62277	7,14E-03	1,0463	down
Calpain-1 catalytic subunit	P07384	1,96E-02	1,0725	down
Vinculin	P18206	4,58E-02	1,0555	down
Small nuclear ribonucleoprotein Sm D3	P62318	3,73E-02	1,0473	down
Elongation factor 1-alpha 1	P68104	1,60E-03	1,0524	down
Delta(3,5)-Delta(2,4)-dienoyl-CoA isomerase, mitochondrial (Fragment)	M0R248	3,38E-03	1,4104	down
Actin-related protein 2/3 complex subunit 5-like protein	Q9BPX5	4,21E-02	1,1088	up
Prelamin-A/C	P02545	2,11E-02	1,0270	up
Tyrosine-protein kinase Lck	P06239	1,27E-02	1,1392	down
Elongation factor 1-beta	P24534	4,74E-02	1,0555	up
Platelet factor 4	P02776	2,06E-03	1,2518	down
Ferritin light chain	P02792	7,07E-03	1,2455	down
Protein phosphatase 1 regulatory subunit 7 (Fragment)	C9J177	2,96E-02	1,1240	down
T-cell surface glycoprotein CD3 gamma chain	P09693	6,96E-03	1,1810	down
Rab GDP dissociation inhibitor alpha	P31150	2,74E-02	1,0597	down
Nuclear transport factor 2	P61970	1,76E-02	1,0909	down
Unconventional myosin-Ig	B0I1T2	2,70E-02	1,0648	down
40S ribosomal protein S29	P62273	4,50E-02	1,1306	up
Coatomer subunit epsilon	O14579	4,06E-02	1,0980	up
Syntaxin-binding protein 2	M0R0M7	7,23E-03	1,1296	down
40S ribosomal protein S18	P62269	2,77E-03	1,2707	down
Erythrocyte band 7 integral membrane protein	P27105	7,87E-03	1,1948	down
Integrin alpha-IIb	P08514	4,94E-04	1,1217	down
Caspase 1, apoptosis-related cysteine peptidase (Interleukin 1, beta, convertase), isoform CRA_c	G3V169	3,72E-03	1,1464	down
Perforin-1	P14222	3,38E-03	1,1999	down
Clathrin heavy chain 1	Q00610	2,64E-02	1,0443	down
Golgi-associated plant pathogenesis-related protein 1]	Q9H4G4	4,93E-02	1,1105	down
Protein CDV3 homolog (Fragment)	H0Y8K3	4,97E-02	1,0395	down
CD44 antigen	H0YD13	2,89E-02	1,1333	down
Crk-like protein	P46109	4,87E-02	1,1034	down
Integrin beta-3	P05106	2,73E-03	1,1876	down
Biogenesis of lysosome-related organelles complex 1 subunit 2	Q6QNY1	2,36E-02	1,2661	down
ATP synthase-coupling factor 6, mitochondrial	P18859	3,55E-02	1,0659	up
GIMAP1-GIMAP5 readthrough	A0A087WTJ2	1,09E-02	1,1488	down

C-C motif chemokine 5	P13501	4,05E-04	1,4533	down
Transcription factor A, mitochondrial	Q00059	9,34E-03	1,0643	up
Tetraspanin	A0A2R8Y478	1,23E-02	1,1233	down
Cytochrome b-c1 complex subunit 2, mitochondrial	H3BRG4	9,37E-03	1,0466	down
Replication protein A 70 kDa DNA-binding subunit	P27694	4,06E-03	1,0651	down
Protein RCC2	Q9P258	1,19E-02	1,0568	down
Phostensin	Q6NYC8	4,53E-02	1,0685	down
Tropomodulin-3	Q9NYL9	2,69E-02	1,0473	up
ATPase inhibitor, mitochondrial	Q9UII2	4,62E-02	1,0611	up
Fibrinogen gamma chain	C9JEU5	3,68E-02	1,1616	down
Translation machinery-associated protein 7	Q9Y2S6	8,37E-03	1,0763	down
Haloacid dehalogenase-like hydrolase domain-containing protein 2	Q9HOR4	4,03E-02	1,0981	up
Acetyl-CoA acetyltransferase, mitochondrial	P24752	1,04E-02	1,0423	up
PC4 and SFRS1-interacting protein	O75475	4,62E-02	1,0557	down
5'(3')-deoxyribonucleotidase, cytosolic type	J3KRC4	1,17E-02	1,2491	up
PEST proteolytic signal-containing nuclear protein	Q8WW12	3,96E-04	1,0732	up
CD48 antigen	P09326	2,87E-02	1,0817	down
Electron transfer flavoprotein subunit beta	P38117	2,40E-03	1,0519	up
Protein FAM98B	Q52LJ0	3,18E-02	1,0710	up
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like protein 1 (Fragment)	M0R3F1	7,74E-03	1,0652	down
Fibrinogen beta chain	P02675	9,85E-03	1,2135	down
Prefoldin subunit 4	Q9NQP4	2,47E-02	1,1719	up
ATP-dependent RNA helicase DDX3X	A0A2R8Y5G6	2,91E-02	1,1071	up
Protein arginine N-methyltransferase 1	E9PKG1	4,98E-02	1,1003	down
Casein kinase II subunit beta	P67870	3,73E-02	1,0955	down
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase G (Fragment)	C9JT64	1,77E-02	1,2852	up
Thrombospondin-1	P07996	4,44E-02	1,2083	down
Proliferating cell nuclear antigen	P12004	2,39E-02	1,1175	down
Amyloid beta A4 precursor protein-binding family B member 1-interacting protein	Q7Z5R6	5,17E-03	1,0470	up
Dr1-associated corepressor	E9PQX9	1,15E-02	1,1046	up
Rho guanine nucleotide exchange factor 1	Q92888	4,38E-02	1,0283	down
Integrin-linked protein kinase	Q13418	4,92E-02	1,1523	down
Beta-parvin	A0A087WZB5	1,35E-02	1,1482	down
Ubiquitin-like domain-containing CTD phosphatase 1	Q8WVY7	2,92E-02	1,1155	up
Zinc finger Ran-binding domain-containing protein 2	O95218	3,85E-02	1,0350	up
Ubiquitin-like-conjugating enzyme ATG3	F8WDI0	3,22E-02	1,1945	up
Splicing factor U2AF 65 kDa subunit	P26368	3,95E-02	1,0731	up
Ran GTPase-activating protein 1	P46060	1,04E-02	1,0639	down

Phosphoribosyl pyrophosphate synthase-associated protein 2 (Fragment)	E7EPA1	4,26E-02	1,5737	down
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit E	P60228	6,50E-03	1,0551	up
Eukaryotic translation initiation factor 4E type 2 (Fragment)	C9JEL3	2,02E-02	1,1792	down
Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial	P31040	1,22E-02	1,0625	up
Nucleolysin TIAR	Q01085	2,94E-02	1,0613	down
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex assembly factor 2	Q8N183	1,57E-02	1,2791	up
Antigen peptide transporter 2	X5CMH5	6,74E-03	1,1517	down
RNA-binding protein FUS	P35637	4,57E-02	1,1139	down
Thioredoxin domain-containing protein 12	O95881	1,21E-02	1,1014	up
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 4	P55036	4,20E-02	1,1864	up
Heat shock protein beta-1	P04792	1,83E-02	1,2079	down
Integrin beta-1	P05556	1,83E-03	1,1280	down
Hypoxia up-regulated protein 1	A0A087X054	1,56E-02	1,1165	up
Muscleblind-like protein 1 (Fragment)	H7C4T5	7,48E-04	1,0593	up
Cytosolic purine 5'-nucleotidase (Fragment)	Q5JUV6	1,78E-02	1,1169	up
Exportin-1	O14980	2,71E-02	1,0650	up
Echinoderm microtubule-associated protein-like 4	Q9HC35	4,26E-02	1,0658	down
Succinate--CoA ligase [ADP-forming] subunit beta, mitochondrial	A0A2R8YDQ9	1,73E-02	1,0712	up
Gamma-glutamyl hydrolase	Q92820	4,15E-02	1,1175	up
Calcium-regulated heat-stable protein 1 (Fragment)	H3BTK3	3,41E-02	1,1121	up
Intercellular adhesion molecule 3	P32942	2,16E-02	1,1099	down
Aminopeptidase	E9PLK3	4,15E-02	1,0535	down
F-BAR and double SH3 domains protein 1	E5RGB1	4,28E-03	1,3047	down
Ribonuclease T2	D6REQ6	3,21E-02	1,0793	up
Fibrinogen alpha chain	P02671	4,14E-02	1,2284	down
NADH-cytochrome b5 reductase 3	P00387	1,30E-02	1,0864	down
RNA-binding protein EWS	A0A0D9SFL3	2,41E-02	1,0168	down
Cullin-3	Q13618	4,36E-02	1,0709	down
Dermcidin	P81605	3,13E-02	1,2231	up
Platelet glycoprotein 4 OS=Homo sapiens	E9PLT1	1,98E-03	1,1218	down
Dehydrogenase/reductase SDR family member 7	Q9Y394	1,25E-02	1,1317	up
TIP41-like protein	O75663	4,10E-02	1,0418	up
Clathrin interactor 1	Q14677	4,18E-02	1,0497	down
Platelet endothelial cell adhesion molecule	P16284	2,31E-02	1,0733	down
Protein 4.1	A0A2R8Y6D0	3,65E-02	1,0955	down
Serine/threonine-protein kinase 38	Q15208	2,94E-03	1,1527	down
Platelet glycoprotein VI (Fragment)	K7EIW7	1,05E-02	1,1802	down

Glutathione S-transferase Mu 2	E9PHN7	3,77E-02	1,1006	down
Vacuolar protein sorting-associated protein VTA1 homolog	Q5TGM0	3,27E-02	1,1630	up
Drebrin (Fragment)	D6R9W4	5,26E-03	1,1344	down
Ras GTPase-activating protein 3	Q14644	1,12E-02	1,1082	down
Src substrate cortactin	Q14247	1,36E-03	1,1228	down
Signal transducer and activator of transcription 4	A0A2R8Y693	1,39E-02	1,1440	up
Leucine-rich repeat-containing protein 59 OS=Homo sapiens	Q96AG4	3,26E-02	1,0817	up
Glycoprotein Ib (Platelet), alpha polypeptide	A0A0C4DGZ8	4,10E-03	1,2297	down
Golgi apparatus protein 1	H3BM42	2,52E-04	1,3999	down
1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase epsilon	Q9NUQ2	4,66E-03	1,1389	down
E3 ubiquitin-protein ligase RNF213	A0A0A0MTR7	1,78E-03	1,1259	down
Vesicle-associated membrane protein-associated protein A	Q9P0L0	3,64E-02	1,0870	up
Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 7	P35236	1,99E-02	1,0935	down
T cell receptor alpha constant	P01848	4,12E-03	1,0817	down
Transcriptional repressor CTCF	A0A2R8Y595	4,28E-02	1,0762	down
Regulator of nonsense transcripts 1	Q92900	3,04E-02	1,1087	down
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 8, mitochondrial	O95169	2,88E-02	1,0846	up
Src kinase-associated phosphoprotein 2	O75563	3,77E-02	1,0660	up
Reticulocalbin-1	Q15293	1,49E-02	1,1692	up
Protein NipSnap homolog 3A	Q9UFN0	3,34E-02	1,2149	down
Deoxyribonuclease-2-alpha	O00115	3,63E-03	1,1174	up
DNA repair protein XRCC1 (Fragment)	M0QZ96	1,23E-02	1,1016	down
4F2 cell-surface antigen heavy chain	F5GZS6	6,13E-03	1,1394	up
MOB kinase activator 1B	Q7L9L4	1,77E-02	1,1078	down
Glucocorticoid modulatory element-binding protein 1	Q9Y692	2,24E-02	1,1849	down
Enolase-phosphatase E1	Q9UHY7	2,68E-02	1,2254	up
Opioid growth factor receptor OS=Homo sapiens	A0A0A0MRN5	1,83E-02	1,0774	up
Wilms tumor protein (Fragment)	H0YED9	2,97E-04	1,0758	up
RalA-binding protein 1	Q15311	1,63E-02	1,4733	down
Leukocyte surface antigen CD53	P19397	6,46E-03	1,1423	down
Interferon-induced GTP-binding protein Mx2	P20592	2,75E-02	1,0563	down
Unconventional myosin-IXb (Fragment)	M0R300	2,86E-02	1,2581	down
Anaphase-promoting complex subunit 7	Q9UJX3	3,72E-02	1,3975	up
Tripeptidyl-peptidase 2	A0A494C1B8	4,61E-02	1,0590	down
RNA 3'-terminal phosphate cyclase	O00442	2,15E-02	1,1022	up
Zinc finger protein 76 (Fragment)	E7EX64	9,29E-03	1,0942	up
PH and SEC7 domain-containing protein 4	Q8NDX1	3,94E-02	1,2212	up

Pre-B-cell leukemia transcription factor-interacting protein 1	Q96AQ6	3,61E-02	1,2280	up
HMG box transcription factor BBX	C9JA69	1,43E-02	1,2777	down
Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10	O14672	4,96E-03	1,1903	down
Serine/threonine-protein kinase D2	Q9BZL6	3,93E-02	1,3745	down
Dedicator of cytokinesis protein 10	Q96BY6	1,96E-02	1,1970	down
Vacuolar protein sorting-associated protein 16 homolog	Q9H269	7,47E-03	1,1139	up
Myotubularin-related protein 5	O95248	4,27E-02	1,2478	down
A-kinase anchor protein 13 (Fragment)	A0A087WY36	9,71E-03	1,5144	down
Platelet-derived growth factor receptor beta	P09619	3,06E-02	1,0953	up
Microtubule-actin cross-linking factor 1, isoforms 1/2/3/5	Q9UPN3	4,96E-02	1,3563	up
Myosin light chain kinase, smooth muscle	Q15746	2,16E-02	1,2436	down
Utrophin	P46939	4,73E-02	1,5335	down

Supplementary table 4. Clinical data of patients included in the study.

Patient ID	Time since HIV diagnosis (months)	CD4 Cell Count (cells/ μ l)	%CD4	Viral Load (copies/ml)	Time on HAART (<50) (months)	HAART regimen
1	94	1940	41,24	49	65	3TC,ABV, EFV
2	107	200	13	49	31	ATV, RTV, 3TC,ABV
3	123	890	32,8	49	37	BIC,FTC,TAF
4	109	920	30,1	49	89	3TC,ABV,DTG
5	348	370	22,1	49	87	COB,DRV
6	126	510	24,8	49	66	3TC,ABV,DTG
7	389	880	30,1	68	77	COB,DRV
8	109	580	39,2	49	94	ATV,COB,FTC,TDF
9	118	720	25	20	11	EFV,FTC,TDF
10	348	960	27,8	20	73	EFV,FTC,TDF
11	40	1,16	45,8	49	36	EFV,FTC,TDF
12	275	520	29,5	49	78	ETV,FTC,TAF
13	114	705	28,5	49	88	FTC,RPV,TDF
14	402	200	13,9	49	85	3TC,ABV,DTG
15	126	510	-	49	40	3TC,ABV,DTG
16	45	780	33,6	49	27	3TC,COB,DRV
17	37	1,12	52	50	33	FTC,RPV,TDF
18	38	840	35,7	49	34	COB,EGV,FTC,TDF
19	49	830	27,3	50	42	FTC,RPV,TDF
20	31	810	34,7	<20	22	ABC/3TC+DTG
21	42	1150	37,05	<20	37	ABC/3TC+RPV
23	55	970	-	<20	45	ABC/3TC+DTG
24	168	540	-	<20	54	TDF/FTC+EVG/c
25	152	770	24	49	55	COB,FTC,TAF,EVG
26	154	1180	40,9	49	76	FTC,RPV,TDF
27	91	770	30	49	88	3TC,ABV, RPV
28	94	1940	41,24	49	65	3TC,ABV, EFV
29	351	420	15,2	49	64	MRV, COB,DRV
30	294	250	20	49	45	MRV,DRV,RTV,DTG
31	67	650	28	49	58	RPV,FTC,TDF
32	331	930	29,7	<20	71	TDF/FTC/EFV
33	61	1300	38,4	49	37	TDF+FTC+EVG/c
34	36	750	41,9	20	29	3TC,ABV,DTG
35	70	1100	43,5	49	47	FTC,TDF, COB,DRV
36	82	1070	36,61	49	63	3TC,ABV, EFV
37	50	800	30	49	43	TDF+FTC+EVG/c
38	73	590	25	49	64	RPV,FTC,TDF
39	116	850	35,5	49	65	BIC,FTC,TAF
40	339	740	28,3	49	79	TDF/FTC/EFV
41	55	1310	39	49	53	RTG, FTC,TAF
42	75	-	-	49	65	RPV,FTC,TAF
43	139	940	27	49	130	RPV,FTC,TDF
44	137	500	24	49	119	TDF/FTC/EFV
45	276	1030	38,3	49	61	COB,DRV,DTG
46	49	1200	41	49	47	3TC,ABV,RPV

References

1. Spivak, A.M. and V. Planelles, *Novel Latency Reversal Agents for HIV-1 Cure*. *Annu Rev Med*, 2018. **69**: p. 421-436.
2. Sadowski, I. and F.B. Hashemi, *Strategies to eradicate HIV from infected patients: elimination of latent provirus reservoirs*. *Cell Mol Life Sci*, 2019. **76**(18): p. 3583-3600.
3. Dash, P.K., et al., *Pathways towards human immunodeficiency virus elimination*. *EBioMedicine*, 2020. **53**: p. 102667.
4. Mothe, B., et al., *HIVconsV Vaccines and Romidepsin in Early-Treated HIV-1-Infected Individuals: Safety, Immunogenicity and Effect on the Viral Reservoir (Study BCN02)*. *Front Immunol*, 2020. **11**: p. 823.
5. Boateng, L., et al., *Coconut oil and palm oil's role in nutrition, health and national development: A review*. *Ghana Med J*, 2016. **50**(3): p. 189-196.
6. Lima, R.d.S. and J.M. Block, *Coconut oil: what do we really know about it so far?* *Food Quality and Safety*, 2019. **3**(2): p. 61-72.
7. Khaw, K.T., et al., *Randomised trial of coconut oil, olive oil or butter on blood lipids and other cardiovascular risk factors in healthy men and women*. *BMJ Open*, 2018. **8**(3): p. e020167.
8. Schonfeld, P. and L. Wojtczak, *Short- and medium-chain fatty acids in energy metabolism: the cellular perspective*. *J Lipid Res*, 2016. **57**(6): p. 943-54.
9. Alicja Mortensen, F.A., Riccardo Crebelli, Alessandro Di Domenico,, et al., *Re-evaluation of fatty acids (E 570) as a food additive*. *EFSA Journal*, 2017. **15**(5): p. 4785.
10. Dayrit, F.M., *The Properties of Lauric Acid and Their Significance in Coconut Oil*. *J Am Oil Chem Soc*, 2015. **92**: p. 1-15.
11. Matsue, M., et al., *Measuring the Antimicrobial Activity of Lauric Acid against Various Bacteria in Human Gut Microbiota Using a New Method*. *Cell Transplant*, 2019. **28**(12): p. 1528-1541.
12. Dayrit, F.M., *The Properties of Lauric Acid and Their Significance in Coconut Oil*. *J Am Oil Chem Soc*, 2014.
13. Lieberman, S., M. Enig, and H. Preuss, *A Review of Monolaurin and Lauric Acid: Natural Virucidal and Bactericidal Agents*. *Alternative and Complementary Therapies*, 2006. **12**: p. 310-314.
14. Lindeberg, S. and B. Lundh, *Apparent absence of stroke and ischaemic heart disease in a traditional Melanesian island: a clinical study in Kitava*. *J Intern Med*, 1993. **233**(3): p. 269-75.
15. Lipoeto, N.I., et al., *Dietary intake and the risk of coronary heart disease among the coconut-consuming Minangkabau in West Sumatra, Indonesia*. *Asia Pac J Clin Nutr*, 2004. **13**(4): p. 377-84.
16. Kumar, P.D., *The role of coconut and coconut oil in coronary heart disease in Kerala, south India*. *Trop Doct*, 1997. **27**(4): p. 215-7.
17. Clegg, M.E., *They say coconut oil can aid weight loss, but can it really?* *European Journal of Clinical Nutrition*, 2017. **71**(10): p. 1139-1143.
18. Turner, N., et al., *Enhancement of muscle mitochondrial oxidative capacity and alterations in insulin action are lipid species dependent: potent tissue-specific effects of medium-chain fatty acids*. *Diabetes*, 2009. **58**(11): p. 2547-54.
19. Newport, M.T., et al., *A new way to produce hyperketonemia: use of ketone ester in a case of Alzheimer's disease*. *Alzheimers Dement*, 2015. **11**(1): p. 99-103.
20. Pan, Y., et al., *Dietary supplementation with medium-chain TAG has long-lasting cognition-enhancing effects in aged dogs*. *Br J Nutr*, 2010. **103**(12): p. 1746-54.

21. Temme, E.H., R.P. Mensink, and G. Hornstra, *Comparison of the effects of diets enriched in lauric, palmitic, or oleic acids on serum lipids and lipoproteins in healthy women and men*. *Am J Clin Nutr*, 1996. **63**(6): p. 897-903.
22. McCarty, M.F. and J.J. DiNicolantonio, *Lauric acid-rich medium-chain triglycerides can substitute for other oils in cooking applications and may have limited pathogenicity*. *Open Heart*, 2016. **3**(2): p. e000467.
23. Dayrit, F.M., *Lauric acid is a medium-chain fatty acid, coconut oil is a medium-chain triglyceride*. 2014. **143**: p. 157-166.
24. Weatherill, A.R., et al., *Saturated and polyunsaturated fatty acids reciprocally modulate dendritic cell functions mediated through TLR4*. *J Immunol*, 2005. **174**(9): p. 5390-7.
25. Gupta, S., et al., *Saturated long-chain fatty acids activate inflammatory signaling in astrocytes*. *J Neurochem*, 2012. **120**(6): p. 1060-71.
26. Radzikowska, U., et al., *The Influence of Dietary Fatty Acids on Immune Responses*. *Nutrients*, 2019. **11**(12).
27. Angela, M., et al., *Fatty acid metabolic reprogramming via mTOR-mediated inductions of PPARgamma directs early activation of T cells*. *Nat Commun*, 2016. **7**: p. 13683.
28. Kulkarni, M.M., et al., *Cellular fatty acid synthase is required for late stages of HIV-1 replication*. *Retrovirology*, 2017. **14**(1): p. 45.
29. Lee, J.Y., et al., *Saturated fatty acid activates but polyunsaturated fatty acid inhibits Toll-like receptor 2 dimerized with Toll-like receptor 6 or 1*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(17): p. 16971-9.
30. Huang, S., et al., *Saturated fatty acids activate TLR-mediated proinflammatory signaling pathways*. *J Lipid Res*, 2012. **53**(9): p. 2002-13.
31. Larson, E.C., et al., *Mycobacterium tuberculosis reactivates latent HIV-1 in T cells in vitro*. *PLoS One*, 2017. **12**(9): p. e0185162.
32. Spivak, A.M., et al., *Synthetic Ingenols Maximize Protein Kinase C-Induced HIV-1 Latency Reversal*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2018. **62**(11).
33. Grau-Exposito, J., et al., *A Novel Single-Cell FISH-Flow Assay Identifies Effector Memory CD4(+) T cells as a Major Niche for HIV-1 Transcription in HIV-Infected Patients*. *mBio*, 2017. **8**(4).
34. Grau-Exposito, J., et al., *Latency reversal agents affect differently the latent reservoir present in distinct CD4+ T subpopulations*. *PLoS Pathog*, 2019. **15**(8): p. e1007991.
35. Chomont, N., et al., *HIV reservoir size and persistence are driven by T cell survival and homeostatic proliferation*. *Nat Med*, 2009. **15**(8): p. 893-900.
36. Arenzana-Seisdedos, F., et al., *Phosphatidylcholine hydrolysis activates NF-kappa B and increases human immunodeficiency virus replication in human monocytes and T lymphocytes*. *J Virol*, 1993. **67**(11): p. 6596-604.
37. Wilson, C.H., et al., *Steatosis inhibits liver cell store-operated Ca(2)(+) entry and reduces ER Ca(2)(+) through a protein kinase C-dependent mechanism*. *Biochem J*, 2015. **466**(2): p. 379-90.
38. Shmueli, E., K.G. Alberti, and C.O. Record, *Diacylglycerol/protein kinase C signalling: a mechanism for insulin resistance?* *J Intern Med*, 1993. **234**(4): p. 397-400.
39. Kolczynska, K., et al., *Diacylglycerol-evoked activation of PKC and PKD isoforms in regulation of glucose and lipid metabolism: a review*. *Lipids Health Dis*, 2020. **19**(1): p. 113.
40. Kwaa, A.K., et al., *The effect of Ingenol-B on the suppressive capacity of elite suppressor HIV-specific CD8+ T cells*. *PLoS One*, 2017. **12**(5): p. e0174516.
41. Clutton, G.T. and R.B. Jones, *Diverse Impacts of HIV Latency-Reversing Agents on CD8+ T-Cell Function: Implications for HIV Cure*. *Front Immunol*, 2018. **9**: p. 1452.

42. Angin, M., et al., *Metabolic plasticity of HIV-specific CD8(+) T cells is associated with enhanced antiviral potential and natural control of HIV-1 infection*. *Nat Metab*, 2019. **1**(7): p. 704-716.
43. Walker-Sperling, V.E., et al., *The Effect of Latency Reversal Agents on Primary CD8+ T Cells: Implications for Shock and Kill Strategies for Human Immunodeficiency Virus Eradication*. *EBioMedicine*, 2016. **8**: p. 217-229.
44. Widjaja, C.E., et al., *Proteasome activity regulates CD8+ T lymphocyte metabolism and fate specification*. *J Clin Invest*, 2017. **127**(10): p. 3609-3623.
45. Li, M., et al., *Human immunodeficiency virus type 1 env clones from acute and early subtype B infections for standardized assessments of vaccine-elicited neutralizing antibodies*. *J Virol*, 2005. **79**(16): p. 10108-25.
46. Janas, A.M. and L. Wu, *HIV-1 interactions with cells: from viral binding to cell-cell transmission*. *Curr Protoc Cell Biol*, 2009. **Chapter 26**: p. Unit 26 5.
47. Davenport, M.P., et al., *Functional cure of HIV: the scale of the challenge*. *Nat Rev Immunol*, 2019. **19**(1): p. 45-54.
48. Ho, Y.C., et al., *Replication-competent noninduced proviruses in the latent reservoir increase barrier to HIV-1 cure*. *Cell*, 2013. **155**(3): p. 540-51.
49. Garrido, C., et al., *HIV Latency-Reversing Agents Have Diverse Effects on Natural Killer Cell Function*. *Front Immunol*, 2016. **7**: p. 356.
50. Leth, S., et al., *Combined effect of Vacc-4x, recombinant human granulocyte macrophage colony-stimulating factor vaccination, and romidepsin on the HIV-1 reservoir (REDUC): a single-arm, phase 1B/2A trial*. *Lancet HIV*, 2016. **3**(10): p. e463-72.
51. Banga, R., et al., *In Vitro Reactivation of Replication-Competent and Infectious HIV-1 by Histone Deacetylase Inhibitors*. *J Virol*, 2016. **90**(4): p. 1858-71.
52. Pardons, M., et al., *Latency-Reversing Agents Induce Differential Responses in Distinct Memory CD4 T Cell Subsets in Individuals on Antiretroviral Therapy*. *Cell Rep*, 2019. **29**(9): p. 2783-2795 e5.
53. Yukl, S.A., et al., *HIV latency in isolated patient CD4(+) T cells may be due to blocks in HIV transcriptional elongation, completion, and splicing*. *Sci Transl Med*, 2018. **10**(430).
54. Lee, J.Y., et al., *Reciprocal modulation of Toll-like receptor-4 signaling pathways involving MyD88 and phosphatidylinositol 3-kinase/AKT by saturated and polyunsaturated fatty acids*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(39): p. 37041-51.
55. Lee, J.Y., et al., *Saturated fatty acids, but not unsaturated fatty acids, induce the expression of cyclooxygenase-2 mediated through Toll-like receptor 4*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(20): p. 16683-9.
56. Hwang, D.H., J.A. Kim, and J.Y. Lee, *Mechanisms for the activation of Toll-like receptor 2/4 by saturated fatty acids and inhibition by docosahexaenoic acid*. *Eur J Pharmacol*, 2016. **785**: p. 24-35.
57. Komai-Koma, M., et al., *TLR2 is expressed on activated T cells as a costimulatory receptor*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(9): p. 3029-34.
58. Diaz, L., et al., *Bryostatin activates HIV-1 latent expression in human astrocytes through a PKC and NF- κ B-dependent mechanism*. *Sci Rep*, 2015. **5**: p. 12442.
59. Fauci, A.S., *Resistance to HIV-1 infection: it's in the genes*. *Nat Med*, 1996. **2**(9): p. 966-7.
60. Ao, Z., et al., *Activation of HIV-1 expression in latently infected CD4+ T cells by the small molecule PKC412*. *Virol J*, 2016. **13**(1): p. 177.
61. Jiang, G. and S. Dandekar, *Targeting NF- κ B signaling with protein kinase C agonists as an emerging strategy for combating HIV latency*. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 2015. **31**(1): p. 4-12.

62. Mbonye, U. and J. Karn, *Transcriptional control of HIV latency: cellular signaling pathways, epigenetics, happenstance and the hope for a cure*. *Virology*, 2014. **454-455**: p. 328-39.
63. Marsden, M.D., et al., *In vivo activation of latent HIV with a synthetic bryostatin analog effects both latent cell "kick" and "kill" in strategy for virus eradication*. *PLoS Pathog*, 2017. **13**(9): p. e1006575.
64. Marsden, M.D., et al., *Characterization of designed, synthetically accessible bryostatin analog HIV latency reversing agents*. *Virology*, 2018. **520**: p. 83-93.
65. Garcia-Vidal, E., et al., *Evaluation of the Innate Immune Modulator Acitretin as a Strategy To Clear the HIV Reservoir*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2017. **61**(11).
66. Li, P., et al., *Stimulating the RIG-I pathway to kill cells in the latent HIV reservoir following viral reactivation*. *Nat Med*, 2016. **22**(7): p. 807-11.
67. Passaes, C.P.B., et al., *Ultrasensitive HIV-1 p24 Assay Detects Single Infected Cells and Differences in Reservoir Induction by Latency Reversal Agents*. *J Virol*, 2017. **91**(6).
68. Saez-Cirion, A. and I. Sereti, *Immunometabolism and HIV-1 pathogenesis: food for thought*. *Nat Rev Immunol*, 2020.
69. Warren, J.A., G. Clutton, and N. Goonetilleke, *Harnessing CD8(+) T Cells Under HIV Antiretroviral Therapy*. *Front Immunol*, 2019. **10**: p. 291.
70. Freeman, G.J., et al., *Reinvigorating exhausted HIV-specific T cells via PD-1-PD-1 ligand blockade*. *J Exp Med*, 2006. **203**(10): p. 2223-7.
71. Cao, W., et al., *Elevation and persistence of CD8 T-cells in HIV infection: the Achilles heel in the ART era*. *J Int AIDS Soc*, 2016. **19**(1): p. 20697.
72. Tarancon-Diez, L., et al., *Immunometabolism is a key factor for the persistent spontaneous elite control of HIV-1 infection*. *EBioMedicine*, 2019. **42**: p. 86-96.
73. Routy, J.P., S. Isnard, and R. Ramendra, *Following the elite: Targeting immunometabolism to limit HIV pathogenesis*. *EBioMedicine*, 2019. **42**: p. 8-9.
74. Palmer, C.S., et al., *Emerging Role and Characterization of Immunometabolism: Relevance to HIV Pathogenesis, Serious Non-AIDS Events, and a Cure*. *J Immunol*, 2016. **196**(11): p. 4437-44.
75. Lochner, M., L. Berod, and T. Sparwasser, *Fatty acid metabolism in the regulation of T cell function*. *Trends Immunol*, 2015. **36**(2): p. 81-91.

IV. DISCUSSIÓ

Discussió

La ineficàcia de les teràpies antiretrovirals actuals per eliminar el VIH de l'organisme posa de manifest la necessitat de desenvolupar noves estratègies terapèutiques amb l'objectiu d'eliminar els reservoris virals. El desenvolupament de tals estratègies requereix d'una major comprensió dels mecanismes de persistència viral, tant en els reservoris anatòmics com cel·lulars, així com conèixer quin és el fenotip d'aquelles cèl·lules en les que el virus pot romandre tot i la presència de teràpia antiretroviral. La posada a punt de la tècnica del RNA/FISH flow ha facilitat, per una banda, l'estudi del fenotip d'aquelles cèl·lules que constitueixen el reservori transcripcionalment actiu i, per l'altra, ha permès analitzar amb profunditat quin efecte tenen diversos LRA en les diferents cèl·lules que constitueixen el reservori del VIH.

La limitada capacitat dels LRAs que actualment han estat testats en assajos clínics posa de relleu la urgent necessitat de crear noves molècules o trobar nous compostos que tinguin una menor toxicitat cel·lular associada i que promoguin una disminució del reservori viral. En aquest punt es discutirà l'ús de l'àcid làuric com a candidat a agent reversor de la latència.

1. RNA/FISH flow: una eina per a la identificació del reservori transcripcionalment actiu en pacients VIH⁺.

La presència de reservoris virals és la principal causa de que, a dia d'avui, encara no existeix cap cura per a la infecció del VIH. Per aquest motiu, l'estudi i caracterització del reservori del VIH té una importància vital doncs discernir quines cèl·lules actuen com a reservori i quines són les seves característiques diferencials permetrà dissenyar estratègies més dirigides a eliminar aquests reservoris.

Fins al moment diverses tècniques han tingut com a objectiu final establir una mesura del reservori viral, ja sigui del reservori latent o transcripcionalment actiu. Pel que fa al primer cas, la proporció de cèl·lules latentment infectades capaces de produir virus competents és molt baixa. La tècnica de referència que permet la mesura d'aquest tipus de reservori, el qVOA, estima que la fracció de cèl·lules latentment infectades és d'una cèl·lula per cada milió de cèl·lules T CD4⁺ en repòs ("resting") en individus que es troben en teràpia antiretroviral [326]. Val a dir que l'estudi d'aquest reservori latent és d'una dificultat molt elevada degut a la baixa freqüència de cèl·lules que el constitueixen i que la tècnica del qVOA és un mètode car i laboriós i que requereix d'un gran nombre de cèl·lules. Una aproximació alternativa per a la mesura del reservori viral és la detecció dels àcids nucleics per mitjà de mètodes basats en la PCR. La quantificació de l'ADN viral s'usa actualment en els assajos clínics com a marcador per determinar l'eficàcia de la teràpia[327-329]. La quantificació de l'ADN total correlaciona positivament amb la quantificació per qVOA i la quantificació de l'ADN integrat[330, 331]. Aquest tipus de

quantificació s'ha usat per estudiar quines cèl·lules constitueixen el reservori viral, entre les que s'ha identificat les *central memory*, *transitional memory*, *effector memory*, *stem cell memory*, i les cèl·lules T CD4⁺ fol·liculars com els subsets que suporten la persistència viral[89, 94, 99, 134]. Aquest mètode de quantificació de l'ADN basat en la PCR com a eina per l'estudi de la composició del reservori presenta certes limitacions doncs requereix de l'aïllament previ de les cèl·lules d'interès el que dificulta la identificació de subpoblacions cel·lulars que tinguin una freqüència molt baixa en el total de cèl·lules infectades; i presenta la desavantatge de que gran part de l'ADN viral que es detecta és defectiu de manera que mai arribarà a generar partícules virals replicatives, proporcionant una mesura poc acurada de la mida del reservori competent.

Per fer front a les limitacions que presenten les tècniques que s'han usat fins al moment per mesurar i, sobretot, caracteritzar el reservori actiu, en la present tesi s'ha validat una nova tècnica anomenada RNA/FISH flow que permet la detecció intracel·lular de molècules d'ARN del VIH per citometria de flux gràcies a la combinació de la hibridació *in situ* per fluorescència (FISH) i la tinció amb anticossos marcats amb diferents fluorocroms. Un dels grans avantatges d'aquesta tècnica, respecte la quantificació basada en la PCR i el qVOA, és que permet analitzar cada cèl·lula a nivell individual, podent determinar la presència de molècules d'ARN en cèl·lules amb diferents fenotips de forma simultània.

Utilitzant aquesta nova tècnica (*Treball 1*) que permet la mesura del reservori transcripcionalment competent, es va caracteritzar les cèl·lules que expressen ARN del VIH en un context d'infecció *ex vivo* en cèl·lules mononuclears de sang perifèrica (PBMCs), en cèl·lules primàries de pacients infectats per VIH, tant tractats amb TAR com no tractats, i en un context de reactivació viral *ex vivo* en cèl·lules T CD4⁺. Es va determinar com les cèl·lules infectades *ex vivo* presentaven un augment en l'expressió tant d'ARN viral com de proteïna p24 sobretot en les subpoblacions de memòria (T_{CM} i T_{EM}) que es correlacionava amb la downregulació de la molècula de superfície CD4. A més, també es va avaluar amb aquesta tècnica l'expressió de la molècula CD32, definida per primer cop per Descours et al. com a marcador de cèl·lules latentment infectades[332]. El nostre treball va determinar, per primera vegada, que l'augment de l'expressió de CD32 estava associat amb l'augment de la infecció productiva i es produïa coetàniament a l'augment d'expressió de la molècula d'activació HLA-DR. Es va observar que aquelles cèl·lules que expressaven tant ARN viral com la proteïna viral p24, tenien nivells més elevats de CD32 que no pas aquelles que només expressaven ARN, posant de manifest que probablement aquest marcador estava associat més aviat al reservori transcripcionalment actiu que al latent. Treballs posteriors, amb resultats en consonància amb els obtinguts en el treball 1, han demostrat que CD32 no és un biomarcador vàlid per a la identificació de la població de cèl·lules T CD4⁺ latentment infectades[74, 333, 334].

Paral·lelament es va estudiar l'expressió d'ARN en cèl·lules primàries obtingudes de pacients infectats pel VIH. En aquest cas l'estudi s'iniciava amb una mostra d'uns 15 milions PBMCs de cada un dels pacients, on es combinava el marcatge de l'ARN intracel·lular amb un marcatge de superfície que permetés identificar les diferents subpoblacions. En el nostre estudi només vam ser capaços de detectar transcrits d'ARN en la fracció CD4⁺. Per una banda, aquest resultat està en consonància amb un treball publicat per Yukl et al, [134], en que es determina que la major proporció d'ARN viral en pacients tractats es troba en aquesta fracció de cèl·lules CD4⁺, i amb el fet de que la major acumulació d'ARN *unspliced* es localitza en les cèl·lules que no downregulen CD4, i la sonda utilitzada en el present treball està dissenyada per reconèixer la seqüència Gag-Pol del genoma consens HXB2. Per altra banda, la downregulació de la molècula CD4 està més associada a la producció de proteïna viral i, en conseqüència, a més mort per efecte citopàtic que en combinació amb el protocol de la tècnica que comporta molts processos de rentat i dos dies d'experimental, podria explicar la limitació de detectar transcrits virals en aquesta fracció CD4⁺.

En el Treball 1 es va identificar quines eren les subpoblacions de cèl·lules T CD4⁺ que suportaven la replicació viral en pacients VIH⁺. Tant en pacients amb càrrega viral detectable, com en aquells que estaven amb virèmia suprimida per la TAR, es va observar que la major part de la replicació tant activa (virèmics) com residual (avirèmics) estava suportada per les cèl·lules de memòria amb un fenotip efector (T_{EM}). En consonància amb aquests resultats, altres estudis han determinat que les T_{EM} són les que suporten la transcripció viral tant en sang perifèrica com en mostres de ili i recte en pacients tractats amb TAR[134]. En un treball publicat per Baxter et al.[335], on feien servir la mateixa tècnica però per mesurar el reservori competent per a la traducció, és a dir, que quantificaven només aquelles cèl·lules que expressaven simultàniament ARN i p24, van identificar que en pacients virèmics la major part de la replicació era suportada per cèl·lules amb un fenotip T_{CM}/T_{TM}. Aquesta discrepància amb el nostre estudi es podria explicar per l'ús diferencial de marcadors de superfície en la identificació de les subpoblacions de cèl·lules T CD4⁺. En el nostre cas es van fer servir els marcadors CD45RO i CCR7 per separar les subpoblacions (T_{NA}, CCR7⁺ CD45RO⁻; T_{CM}, CCR7⁺ CD45RO⁺; T_{EM}, CCR7⁻ CD45RO⁺; T_{TD}, CCR7⁻ CD45RO⁻); mentre que l'altre estudi va usar els marcadors CD27 i CD45RA (T_{NA}, CD45RA⁺CD27⁺; T_{EM}, CD45RA⁻CD27⁻; T_{CM}/T_{TM}, CD45RA⁻CD27⁺; T_{TD}, CD45RA⁺CD27⁻). En el nostre estudi les cèl·lules amb un fenotip T_{TM} quedaven incloses en la subpoblació anomenada T_{EM}, mentre que en el seu treball quedava agrupada amb les T_{CM}. Aquesta diferència en la identificació de les subpoblacions i on queden agrupades les T_{TM}, una població que s'ha descrit que està enriquida en ADN viral[336], pot explicar la discrepància entre ambdós estudis. Una altra diferència és que en el seu estudi no poden avaluar únicament la fracció del reservori transcripcionalment actiu, doncs el nivell elevat de *background* detectat en aquell canal els impedeix la seva quantificació[335, 337]. En el nostre treball, per tal de realitzar una

quantificació el més acurada possible, vam incloure en cada un dels *batch* experimentals una mostra d'un donant sa. Aquesta mostra marcava quin era el *background* en la detecció d'ARN viral, que directament se sostreïa de la senyal obtinguda en aquell mateix canal en les mostres dels pacients. D'aquesta manera, obteníem un valor d'ARN que es trobava per sobre del *background* (al que vam anomenar *Normalized HIV-RNA*) i que podíem considerar real i, per tant vàlid.

La mesura de la transcripció d'ARN viral és una eina molt útil per avaluar l'efecte dels LRA en noves aproximacions terapèutiques. S'ha vist en diversos assajos clínics que els LRAs no tenen cap efecte o aquest és molt modest en la reducció del reservori viral el que podria fer pensar que els LRAs no tenen un impacte igualitari en totes les subpoblacions. Aquest fet es discutirà amb més profunditat en el següent apartat doncs està intrínsecament lligat als resultats obtinguts en el Treball 2. En aquest primer treball es va voler avaluar si amb la tècnica del RNA/FISH flow es podia detectar la reactivació del virus es cèl·lules T CD4⁺ front a una estímul exogen, en aquest cas Romidepsin i PMA en combinació amb Ionomicina. Es va determinar que la mediana del reservori induïble, definit com cèl·lules capaces d'expressar ARN i proteïna p24 en resposta a un estímul activador (PMA i Ionomicina), era de 6 cèl·lules per cada milió de cells T CD4⁺. Aquests valors estan en consonància amb els descrit per Baxter et al. on determinen una reactivació de 3.56 cèl·lules per cada milió de cells T CD4⁺ [335]. Cal destacar que aquests valors estan per sobre de la freqüència detectada per la tècnica del qVOA però això és degut, probablement, a que no estem detectant exclusivament el reservori competent. En el cas de Romidepsina es va detectar reactivació i augment de transcrits virals en tots els pacients però només producció de proteïna p24 en un dels 5 pacients testats, posant de manifest la variabilitat de resposta entre individus i la limitació de certs compostos per induir la producció de partícules virals.

Al comparar els valors quantitius de reservori obtinguts per mètodes convencionals d'àcids nucleics virals (qPCR), tant ADN com ARN, i el percentatge de cèl·lules positives mesurades mitjançant la tècnica del RNA/FISH flow, es va observar una correlació positiva i significativa entre els dos mètodes; tanmateix, el nou mètode va quantificar valors unes 3 vegades, en el cas de l'ARN, i unes 2 vegades, en el cas de l'ADN, més baixos que els nivells de molècules d'àcids nucleics per milió de cèl·lules T CD4⁺ quantificades per qPCR. Aquestes diferències podrien explicar-se perquè cada tècnica quantifica quelcom lleugerament diferent: el RNA/FISH flow permet la quantificació de cèl·lules que expressen un nombre no quantificable de molècules d'ARN viral, mentre que els mètodes convencionals quantifiquen molècules d'ARN totals i no permeten conèixer quantes cèl·lules són les que alberguen aquestes molècules d'àcid nucleic. Aquest fet fa que la comparació sigui esbiaixada, ja que la detecció d'esdeveniments positius mitjançant la tècnica del RNA/FISH flow requereix, molt probablement, de la presència de diverses molècules d'ARN viral, tal i com s'ha observat a través de la

microscòpia. En aquest sentit, alguns estudis anteriors han demostrat que les cèl·lules infectades productivament pel VIH contenen al voltant de 300 còpies d'ARN viral per cèl·lula[338, 339]. Una altra fet que podria explicar la diferència entre ambdós tècniques és la menor sensibilitat del mètode del RNA/FISH flow en comparació amb els mètodes basats en la quantificació per PCR.

Una de les limitacions de la tècnica es que no permet la mesura del reservori viral replicatiu competent, doncs el RNA/FISH flow només permet quantificar la freqüència de cèl·lules que expressen transcrits virals i, en el context de reactivació, aquelles cèl·lules que poden transcriure l'ARN viral i generar proteïnes virals en front a un estímul exogen. Recentment, s'han descrit noves tècniques basades en PCR, el IPDA[199] i el Q4PCR[201], que permeten la discriminació entre els virus defectius i aquells que són intactes i, per tant, susceptibles a produir virus competents. Aquestes tècniques, tot i que donen una informació de gran importància a l'hora d'avaluar les característiques del reservori, al basar-se en el principi de la PCR, no permeten la identificació fenotípica de quines cèl·lules contenen els virus intactes. L'única tècnica que a dia d'avui permet la quantificació del reservori competent és el qVOA i els seus derivats. Tant el qVOA com el RNA/FISH flow tenen la limitació que no poden detectar tots els provirus intactes, a causa de la naturalesa estocàstica de la reactivació i dels estímuls utilitzats. A més, mentre que el qVOA detecta virus competents en la replicació (definites per la capacitat del virus produït per establir una infecció que es propaga *in vitro*), el RNA/FISH flow detecta cèl·lules que contenen virus capaços de produir ARN del VIH i proteïna viral p24 (virus competents en transcripció i traducció viral). El fet de que no totes les cèl·lules que transcriuen el virus i produeixen proteïnes virals generaran noves partícules virals infeccioses, fa que la mida del reservori competent quedi lleugerament sobreestimada. En canvi, el qVOA tendeix a subestimar el reservori competent ja que el virus pot ser alliberat, però pot no establir una infecció *in vitro* i seguir sent indetectable. Aquestes diferències poden explicar la falta de correlació observada entre aquests dos assajos i la mida més gran del reservori induïble quan es quantificada mitjançant la tècnica del RNA/FISH flow en comparació amb el qVOA, resultats que en sintonia amb els obtinguts per Baxter et al[335]. A més el qVOA requereix d'un elevat nombre de cèl·lules de partida i és un assaig molt costós i laboriós. En aquesta tessitura doncs, l'assaig del RNA/FISH flow es postula com una tècnica complementària a les comentades en les línies superiors per a la caracterització del reservori actiu doncs és un mètode ràpid (2 dies), estàndard (kit comercial) i requereix d'un número relativament baix de cèl·lules ($5-15 \times 10^6$ cèl·lules); així com una tècnica vàlida a per al *screening* i avaluació de LRA en les diferents poblacions cel·lulars.

En resum, la validació d'aquesta tècnica per a la detecció de molècules d'ARN de VIH permet la caracterització de subpoblacions cel·lulars específiques que suporten la transcripció viral en individus infectats per VIH-1 i ha identificat les T_{EM} com el nínxol

principal de transcripció *in vivo*. A més, la identificació del conegut com a reservori transcripcionalment actiu proporciona informació molt valuosa sobre quins són els compartiments cel·lulars i anatòmics específics responsables de la virèmia residual i sobre els mecanismes de patogènesis viral, la persistència del VIH i la reactivació viral. A la vegada, aquest nou mètode es postula com una nova eina per a la avaluació de l'eficàcia dels LRA en les diferents subpoblacions de cèl·lules T CD4+.

2. RNA/FISH flow: una eina per avaluar la capacitat dels agents reversors de la latència (LRA) per reactivar el VIH.

Un dels principals reptes per aconseguir erradicar el VIH del cos és l'eliminació del reservori latentment infectat. L'estratègia de *Shock and Kill* té com a objectiu primer reactivar el virus amb l'acció dels anomenats agents reversors de latència (LRAs) per, en última instància, fer que aquestes cèl·lules que han reactivat el virus esdevinguin susceptibles a la resposta immune o bé a la mort cel·lular per efecte citopàtic[293, 325, 340]. Diverses molècules s'han postulat com a LRAs [307] i algunes han estat testades en assajos clínics, on s'ha demostrat que produïen un augment de l'activitat transcripcional del virus però que en cap cas han demostrat tenir un clar impacte en la mida del reservori viral[296, 300, 301, 341, 342]. Això pot suggerir que els LRAs individualment potser no són suficient potents per reactivar totes les cèl·lules latentment infectades o per induir nivells suficientment alts d'antígens virals per promoure la mort d'aquestes cèl·lules. Diversos estudis han mostrat com les combinacions solen ser més eficients a l'hora de reactivar el virus que els LRAs individualment, tant en línies cel·lulars com en cultius *ex vivo* de cèl·lules de pacients amb virèmia suprimida per la teràpia antiretroviral[304, 305, 343]. Per tal d'entendre i conèixer quins són els efectes i les limitacions que presenten els LRAs, en el *Treball 2* s'ha avaluat, usant la tècnica del RNA/FISH flow, la capacitat que tenen 3 famílies de LRAs i les seves combinacions d'induir la reactivació viral *ex vivo* en mostres de pacients VIH⁺ per tal d'identificar possibles sinèrgies entre compostos i determinar la resposta de cada subpoblació de cèl·lules T CD4⁺ a aquests LRAs. S'han testat compostos de 3 famílies de reactivadors: agonistes de PKC (Ingenol i Bryostatín-1), HDACi (Romidepsin i Panobinostat) i un inhibidor del bromodomini (JQ-1). Tot i que la tècnica del RNA/FISH flow no permet la quantificació del reservori competent per la replicació, sí que permet la detecció de cèl·lules amb capacitat de produir *elongated* ARN i en algun casos de produir la proteïna p24, després de l'estimulació amb un LRA, podent detectar així el reservori competent per a la transcripció i la traducció.

El primer pas va ser testar cada un dels fàrmacs en una línia cel·lular latentment infectada (Jlat 10.6) en la que la reactivació es va mesurar com a nivells de GFP. Els resultats mostren que al incubar amb un sol compost, Romidepsin van induir la màxima reactivació, seguit de Ingenol i Panobinostat i que al combinar aquests HDACi amb

Ingenol els nivells de reactivació augmentaven tot i no que arribava a produir-se sinèrgia. En canvi la Bryostatin-1 no va resultar tenir cap efecte sobre la línia cel·lular testada tot i que en estudis anteriors s'havia determinat la seva capacitat per reactivar el virus. Aquest fet està en consonància amb un treball publicat per Spina et al., en que es mostrava com diferents models cel·lulars podien tenir respostes molt diverses front al mateix estímul[344].

Els resultats obtinguts en cèl·lules T CD4+ aïllades en fresc mostren que, a nivell individual, Ingenol i Romidepsin indueixen la major freqüència de cèl·lules HIV-RNA⁺ (de la mateixa manera que s'ha vist en la línia cel·lular) i que la combinació de Romidepsin i Ingenol és la més efectiva doncs es capaç de promoure la transcripció del VIH en totes les mostres testades en freqüències per sobre del control positiu, PMA i Ionomycin. Jiang et al. [345], mostra com Ingenol és capaç de reactivar el virus a nivells per sobre de Vorinostat i PMA; resultats molt similars als obtinguts per Pandelo et al. [346] i Pardons et al. [347]. Cal destacar que tots tres estudis s'han realitzat usant cèl·lules primàries de pacients i que els resultats obtinguts estan en consonància amb els nostres. En la mateixa línia, Wei et al. [299] i Mann et al. [348], demostren com Romidepsin indueix un augment de la transcripció del VIH per sobre de Vorinostat i Panobinostat, respectivament. Contràriament al treball publicat per Bullen et al. [349], on mostraven la major capacitat de Bryostatin-1 per induir la transcripció viral en comparació amb altres HDACi, en el nostre cas Bryostatin-1 va promoure una modesta reactivació. Cal destacar però, que en aquest estudi els autors quantificaven la reactivació per qPCR i aquest fet podria justificar les discrepàncies obtingudes, doncs podria ser que el Bryostatin-1 promogués una reactivació que tingués impacte en un nombre limitat de cèl·lules, que seria el que nosaltres estaríem detectant amb el RNA/FISH flow. El mateix estudi de Jiang et al., comentat en línies superiors, també descriu un efecte sinèrgic al combinar l'inhibidor del bromodomini JQ1 i Ingenol, en canvi en el nostre estudi hem observat un efecte inhibitori en el 56% del casos. A més mostra uns nivells de reactivació similar al estudiar Ingenol i JQ1, mentre que en el nostre estudi JQ1 només va promoure la transcripció viral en poc més del 50% dels pacients analitzats mentre Ingenol ho va fer en tots els casos. Aquestes discrepàncies entre els estudi podrien explicar-se per la utilització de diferents molècules d'Ingenol en els assajos de reactivació, els diferents mètodes o tecnologies usats per quantificar la reactivació viral i, finalment, les discrepàncies observades quan s'avalua la reactivació en línies cel·lulars o en models de cèl·lules primàries.

A continuació, es va calcular la proporció del reservori que era reactivable, és a dir, quina proporció de les cèl·lules que contenien ADN viral eren capaces de produir transcrits viral en resposta al LRAs més potent per a cada cas. Es va veure que, expressat com a mitjana, que el 16.28% de les cèl·lules infectades es reactiven en resposta al estímul. Es va observar que la resposta als LRAs és diferent en cada pacient doncs la proporció de

reactivació era variable i comprenia un rang d'entre el 3 i el 31%. Tot això es va identificar la combinació de Romidepsin i Ingenol com la responsable de promoure major reactivació en la majoria de pacients. Aquest resultat concorda amb el treball presentat per Battivelli et al.[350], en el que conclouen que els LRAs reactiven un 5% de totes les cèl·lules latentment infectades; de la mateixa manera, Cillo et al.[351], i Banga et al.[352] confirmen aquests resultats. L'estudi de Banga et al. determina que només una petita fracció de les cèl·lules que es reactiven (al voltant del 2,6%), són capaces de produir virions; mentre que Cillo et al. descriuen que un 7,5% de les cèl·lules produeixen ARN *unspliced* però només un 1,5% d'aquestes produeix noves partícules virals. Aquest percentatge de reactivació tant baix podria explicar-se per l'elevada quantitat de virus defectius que alberguen les cèl·lules infectades i que en canvi no són detectats pels mètodes de quantificació per PCR convencional (a excepció del IPDA i el Q4PCR). Així doncs, els individus tractats en fase crònica presenten al voltant d'un 90-98% de virus defectius, deixant només un percentatge molt baix de virus que seran susceptibles a produir transcrits d'ARN sencers[162, 210, 336]. A més, el fet de que entre el 60-80% dels virus presentin deleccions en la regió gag-pol[199], fa que la nostra tècnica no els pugui detectar, doncs la sonda està dissenyada per hibridar en aquesta regió. Recentment, alguns estudis han descrit que alguns provirus defectius, tot i no generar partícules virals infeccioses, també tenen la capacitat de expressar ARN viral i produir proteïnes virals que poden ser detectats pel assajos de quantificació habituals[350, 353, 354]. A més s'especula que aquests virus defectius podrien generar algunes formes *virus-like particles (VLP)* que podrien promoure respostes immunitàries i proporcionar un mecanisme de activació immunitària persistent, presenten així un obstacle més per a l'erradicació del VIH.

A continuació vam avaluar l'efecte dels diferents LRAs en cada una de les subpoblacions de cèl·lules T CD4+. Es considera necessari posar de relleu la importància d'aquest estudi ja que sobrepassa la limitació del nombre de cèl·lules a l'hora de determinar el reservori transcripcionalment actiu que presentaven els treballs realitzats fins al moment[355]. D'aquesta manera la tècnica del RNA/FISH flow permet la simultània detecció de transcrits virals i proteïna viral p24 sense la necessitat d'aïllar prèviament les poblacions d'interès. A trets generals, s'ha observat com els LRAs tenen un impacte diferent en funció de la subpoblació d'estudi. Així doncs, es va veure com Romidepsin reactivava totes les subpoblacions de memòria (T_{CM} , T_{TM} i T_{EM}), mentre que Panobinostat era capaç de reactivar amb èxit les T_{CM} . S'ha demostrat que aquests dos compostos difereixen en la seva capacitat d'inhibir l'activitat cel·lular del les HDAC, de manera que les diferències en la proporció HDAC de classe I o II així com en els nivells d'acetilació de les histones induït pels LRA entre subpoblacions podria estar relacionada amb la capacitat de reactivació associada a cada compost[299, 347]. Paral·lelament, es va observar un reactivació molt baixa i limitada a algunes subpoblacions per part JQ1 i Bryostatín; mentre que Ingenol va resultar ser molt eficient reactivant T_{NA} , T_{SCM} , T_{CM} i T_{TM} però no

tant T_{EM} on només va detectar reactivació en el 45% dels pacients. En relació a aquests resultats, un parell d'estudis recents del grup del Dr. Nicolas Chomont han descrit que la major part de cèl·lules que inicien la transcripció en resposta a Ingenol tenen un fenotip T_{CM} , T_{TM} i T_{EM} [335, 347]. Pel que fa a les cèl·lules amb un fenotip naïve (T_{NA}), aquestes no se solen tenir molt en compte, en gran part dels estudis de reservori realitzats fins al moment, doncs contribueixen mínimament al pool de cèl·lules infectades i presenten una activitat transcripcional més baixa que les subpoblacions de memòria[356]. No obstant, en el nostre treball hem observat com aquestes cèl·lules tenen la capacitat de respondre a una gran varietat d'estímuls tot i que els nivells de reactivació induït sigui baix en comparació amb altres subpoblacions. En concordança amb aquest resultat, Zerbato et al. [357] i Venanzi et al.[358], han descrit a la T_{NA} com a reservori important de virus competents tant per la transcripció com per a la replicació. Un altra subpoblació d'interès per la seva llarga vida i la seva implicació com a reservori viral es la constituïda per les T_{SCM} . Aquestes cèl·lules han demostrat ser molt reticents a la reactivació per part de la majoria de LRAs testats, només la combinació de Panobinostat i Bryostatín-1 i, en menor mesura, Ingenol han demostrat promoure un augment de la transcripció viral en aquesta població.

Pel que fa a les combinacions de LRAs es va veure que la Romidepsin i Ingenol era la més potent, sent capaç de induir una freqüència de cèl·lules positives per a la transcripció viral per sobre del control positiu, PMA i Ionomicina, i els nivells de proteïna viral p24 més elevats, en el cas de cèl·lules T_{CD4+} . Aquesta combinació ha estat plantejada per primer cop en aquest treball i, posteriorment ratificada per Pardons et al.[347]. Aquest efecte sinèrgic entre ambdós compostos podria explicar-se per mecanismes d'actuació diferents doncs s'ha vist que la combinació d'aquests LRAs no promou un augment en el nombre de molècules d'ARN, doncs la MFI (de l'anglès *Mean Fluoresce Intensity*) no augmenta, sinó que té impacte sobre un nombre de cèl·lules més elevat que són capaces de transcriure ARN viral. Complementàriament, la combinació de Romidepsin i Ingenol va demostrar tenir un efecte sinèrgic a nivell de T_{CM} , T_{EM} i T_{TM} , en termes de transcripció viral, i la capacitat d'induir un augment en la producció de proteïna en les T_{CM} que no va ser observat en la resta de subpoblacions.

Pel que fa a l'avaluació de les sinèrgies entre compostos es va observar un clar efecte antagonista quan es combinava Panobinostat amb Ingenol (efecte observat en el 89% del pacients en la població de cèl·lules T_{CD4+}). Aquest efecte també es va observar en un estudi presentat per Larragoite et al.[359], on demostraven que la combinació d'aquests dos compostos, en un model *ex vivo* de cèl·lules *resting* T_{CD4+} de pacients avirèmics, inhibia la reactivació del VIH. Els autors suggereixen que Panobinostat promou la inhibició de la *chaperone heat shock protein 90* (Hsp90), que està directament implicada en la reactivació induïda per Ingenol, i que pot reduir l'activació de la via de NF- κ B induïda per l'agonista de PKC. Aquesta interacció podria explicar l'efecte

antagònic observat al combinar aquests dos compostos. Contràriament, altres estudis han demostrat que aquesta combinació tenia un efecte sumatori al combinar-los, tant en línies cel·lulars com en cèl·lules primàries [347]. Aquests resultats contradictoris podrien ser resultats de diferències en la cinètica d'exposició dels LRAs, diferències en les concentracions usades en els diferents estudis, així com diferències en els pacients dels que s'ha obtingut la mostra.

També es va avaluar la expressió de dos marcadors de cèl·lules transcripcionalment actives, com són la molècula CD32 [74, 219] i el, recentment caracteritzat pel nostre grup, CD20 (*data not shown*)[75]. Es va veure que les cèl·lules que expressaven transcrits virals (VIH-ARN⁺) tenien nivells més elevats d'aquest dos marcadors, comparat amb la fracció de cèl·lules VIH-ARN⁻.

Cal destacar que una de les limitacions del present estudi és la incapacitat de detectar cèl·lules positives per a l'expressió de p24 en la gran majoria de subpoblacions. Tot i que en la població total de cèl·lules T CD4⁺ sí que ha estat possible l'estudi i els resultats estan en la mateixa línia que els obtinguts per Baxter et al.[335], i Pardons, et al.[347], a nivell de subpoblacions només ha estat possible analitzar la producció de p24 en la subpoblació de cèl·lules T_{CM}. Aquest resultat es podria explicar pel baix recompte absolut de cèl·lules VIH-ARN⁺ observat en subpoblacions amb freqüències més baixes.

En els últims temps, l'avaluació dels provirus que contenen genomes competents per la replicació ha generat un gran interès. Un estudi publicat al 2017 per Hiener et al.[336], va determinar que els virus intactes es distribueixen de forma desigual en les diferents subpoblacions de cèl·lules T CD4⁺, sent les T_{EM} i les T_{TM} les que contindrien els nivells més elevats, seguides de les T_{NA} i les T_{CM}. Alternativament, la tècnica del QVOA suggereix que són les T_{CM} les que alberguen la major fracció dels virus competents per la replicació[360]. Aquest fet explicaria en part la diferent resposta als LRAs en cada un de les subpoblacions estudiades en el nostre treball i concordaria amb el fet de que les cèl·lules que més virus intactes tenen, major freqüència de cèl·lules que estan transcrivint el virus podem detectar. Contràriament, en un estudi publicat recentment pel grup del Dr. Robert Siliciano, impulsors de la tècnica del IPDA, han determinat que les diferents subpoblacions de memòria presenten una inducibilitat dels provirus similar. Determinen que la proporció de genomes intactes es similar entre les 3 poblacions de memòria (T_{CM}, T_{TM} i T_{EM}) i que no varia després de diverses rondes d'estimulació. Val a dir que aquest estudi només té en compte les cèl·lules *resting* que han estat prèviament sortejades, excloent específicament del anàlisi les cèl·lules activades *in vivo* i aquelles que expressen el marcador CD25, sent aquestes cèl·lules les constitueixen el reservori transcripcionalment actiu, focus del nostre estudi.

La diversitat en la resposta en les diferents subpoblacions als diferents LRAs podria explicar-se, en part, per la expressió diferencial de certes molècules o factors que estan

implicats en la latència i la reactivació com pot ser l'acetilació de les histones H3/H4, els nivells de pNF- κ B i pCDK9 o l'expressió de certs miARNs com miR125b i miR155[347]. Un altre fet a tenir en compte és que els compartiments cel·lulars que actuen com a reservori del VIH presenten diferent capacitat proliferativa, *homing potential*, i perfils de producció de citoquines[356, 361, 362]. Un estudi preliminar publicat recentment per Kazmierrski et al.[363], en el que s'avaluen els canvis produïts en resposta a dos LRAs a nivell de transcriptòmica i de modulació de la expressió de gens cel·lulars implicats en la immunitat innata de cada cèl·lula, mostra que gran part d'aquest canvis són dependents de subpoblació. Paral·lelament, també s'ha vist que les subpoblacions de memòria més diferenciades T_{TM} i T_{EM} presenten menys restricció transcripcional i una major resposta proliferativa davant de certs estímuls[364]. També es important tenir en compte la inducibilitat relativa, és a dir, la capacitat dels gens virals d'un provirus intacte per transcriure's en resposta a un estímul donant lloc a virions replicatius, i la distribució dels provirus intactes en cada subpoblació. Així doncs, els gens implicats en l'activació de cèl·lules T, migració i regulació de l'activitat transcripcional es troben més expressats en les cèl·lules T CD4⁺ de memòria que no pas en la naïve[364].

En conclusió, la manca de compostos que promoguin una reactivació àmplia i que tingui efecte sobre totes les subpoblacions, especialment les que són de vida llarga, qüestiona indirectament l'efecte que aquests LRAs poden tenir *in vivo* a llarg termini. Així, els resultats obtinguts en aquest treball poden ajudar a entendre el fracàs dels LRAs, que actualment estan en el mercat per al tractament d'altres malalties, i posa de manifest la importància de considerar el reservori del VIH com a grups heterogenis de cèl·lules latentment infectades que responen de manera diferent als LRA. A més, es proporciona una nova eina que pot ajudar en la identificació i validació de nous compostos reactivadors i es proposa l'ús de combinacions de LRAs amb diferents mecanisme d'acció que tinguin un impacte més ampli i potent en les diferents subpoblacions que constitueixen el reservori viral. Superar totes aquestes limitacions i aprofundir en la caracterització del reservori ens apropa una mica més a assolir l'objectiu d'eliminar la persistència viral.

3. Àcid làuric, un àcid gras natural, com a nou agent reversor de la latència.

Com ja s'ha comentat en l'apartat anterior, una de les limitacions que presenta l'estratègia de *Shock and Kill* és que els compostos que actualment s'han testat, *tant in vitro* com *in vivo*, presenten una toxicitat cel·lular associada elevada, una afectació negativa de l'activitat de les cèl·lules citotòxiques, tals com CD8⁺ i NK, i una limitada capacitat per reactivar el virus i disminuir el reservori viral. Tot aquest fets denoten la importància de trobar nous compostos que superin totes aquestes limitacions. En la present tesi doctoral s'ha proposat, per primera vegada, l'ús de l'àcid làuric com a agent reversor de la latència del VIH i immunomodulador de la resposta citotòxica. L'àcid làuric

és un àcid gras constituït per una cadena de 12 àtoms de carbonis que es pot trobar de forma natural en diversos productes tals com l'oli d'origen animal i vegetal així com la llet materna[365-367]. A més, se li han atribuït importants capacitats antibacterianes, front a bacteries gram positives, i antivirals, front el virus del herpes simplex o el de l'estomatitis vesicular, entre d'altres, fet que marca un precedent per ser avaluat com compost amb capacitat de potenciar la resposta immunitària front el virus del VIH[368, 369]. Cal destacar també que l'àcid làuric presenta certs beneficis en termes de salut, relacionats amb el sistema cardiovascular[370-372], la pèrdua de pes[373], la diabetis[374] i la malaltia de l'Alzheimer[375, 376]. Probablement aquest efecte beneficiós de l'àcid làuric està vinculat amb la seva capacitat de reduir el teixit adipós i promoure un perfil de lípids més favorable definit per un increment de les lipoproteïnes d'alta densitat (HDL) [377, 378]. A més, un altre tret distintiu de l'àcid làuric és que el seu ús està aprovat per les autoritats europees com a suplement alimentari i que s'ha vist que *in vivo* no presenta toxicitat a nivells equivalents a 9,000 mg per kg de pes[379].

En aquest tercer treball, s'ha avaluat la capacitat de l'àcid làuric reactivar el VIH mitjançant l'ús de diverses tecnologies (detecció d'ARN per qPCR, la tècnica del RNA/FISH flow, anàlisis metabolòmic) i models (línies cel·lulars, models de latència i cèl·lules primàries). En el context de models de latència, tant en les línies cel·lulars (J-lat) com el model amb cèl·lules primàries, es va observar un increment de la reactivació al tractar les cèl·lules amb àcid làuric. A més, en el model de latència de cèl·lules primàries, l'àcid gras va ser capaç de promoure una producció de proteïna viral p24 a nivells comparables als del control positiu, PMA i Ionomicina. Hi ha altres compostos, com l'Ingenol o el Givinostat que han demostrat promoure un nivell de producció de proteïna similar o més alt que el control positiu[347, 352]. Aquest fet podria suggerir que l'àcid làuric estaria promovent la transcripció de formes de l'ARN *multispliced* que es consideren més properes a la formació de proteïna, que no pas les formes *unspliced*.

Per tal d'elucidar quin mecanisme podria estar implicat en la reactivació viral induïda per l'àcid làuric, es va estudiar, primer de tot, si es produïa per acció dels anomenats Toll-like Receptors (TLR). Es va usar la una línia cel·lular (J-lat) modificada per a expressar el receptor TLR-2 ja que en la literatura s'ha descrit que l'àcid làuric és capaç d'induir l'activació d'alguns factors de transcripció, com NF- κ B, a través del TLR-2 i TLR-4[380-382] i a més les cèl·lules T CD4⁺ de memòria l'expressen de manera constitutiva[383]. No obstant, en la nostra línia cel·lular modificada, tot i que es va observar un augment de la reactivació, aquesta va ser més modesta que l'observada en la línia cel·lular *wild type*, suggerint una limitada capacitat de reactivació per via TLR-2. Paral·lelament, altres resultats obtinguts en la línia cel·lular van demostrar que la reactivació del VIH depenia parcialment de l'activació del factor NF- κ B, doncs la seva inhibició disminuïa de forma clara la reactivació viral. En els anàlisis de lipidòmica realitzats en cèl·lules T CD4⁺ de pacients infectats pel VIH es va observar un augment significatiu en la producció de

fosfatidilcolines i diacilglicerols (producte de la hidròlisi de les fosfatidilcolines) en resposta al tractament d'àcid làuric. Aquests resultats podrien indicar, per una banda, que aquesta hidròlisi de la fosfatidilcolina estaria induint l'activació de la transcripció viral via NF- κ B [384] i, per altra banda, l'augment de diacilglicerols ha estat relacionat amb l'activació dels enzims PKC (de l'anglès, *protein Kinase C*), el que podria suggerir una reactivació per una via similar a la d'Ingenol, un conegut agonista de PKC i també agent reversor de la latència. En aquesta línia també s'ha especulat que la reactivació viral per l'àcid làuric podria estar relacionada amb la senyalització a través de MAVS (de l'anglès, *mitochondrial antiviral signaling protein*) en la que la generació d'espècies reactives d'oxigen (ROS) serien les responsables de promoure la transcripció viral via MAVS, tal i com succeeix amb altres compostos com Ingenol i Acitrecin[385, 386].

A més, l'augment de la transcripció viral es va observar que era, majoritàriament, suportat per les cèl·lules T CD4⁺ amb un fenotip efector. Aquesta troballa està en consonància amb els resultats obtinguts en els treballs 1 i 2 de la present tesi, doncs es defineix que les cèl·lules amb fenotip més efector són les que suporten en major mesura la transcripció residual i són les que presenten major susceptibilitat a la reactivació exògena [219, 355]. Aquesta caracterització de les cèl·lules que suporten la transcripció viral va ser possible gràcies a l'ús de la tècnica del RNA/FISH flow, analitzada en profunditat al treball 1. També es va observar que l'àcid làuric no només era capaç de produir transcrits virals sinó que també era capaç d'induir l'expressió de proteïna p24 en mostres de pacients infectats i amb la càrrega viral suprimida gràcies al tractament. Molts dels LRAs descrits fins al moment són capaços de promoure un augment en la transcripció viral, però només una petita part d'aquests és capaç de produir proteïnes virals[355, 387]. Així doncs, aquestes trets característics de l'àcid làuric fan que es postuli com un potent agent reversor de la latència ja que no només indueix al transcripció viral, sinó que també promou la formació de proteïna sense comprometre la viabilitat cel·lular.

Com s'ha comentat al llarg del treball, una de les limitacions que presenten els LRAs és que solen afectar a la capacitat citotòxica de les cèl·lules del sistema immunitari i afecten negativament a la viabilitat cel·lular *in vitro*[311]. En aquest sentit, ens vam centrar en avaluar quin era l'efecte que tenia l'àcid làuric sobre la població de cèl·lules T CD8⁺. A través d'experiments funcionals i de citometria de flux es va determinar que l'àcid làuric no promovia una activació global de les cèl·lules T CD8⁺, sinó que només ho feia sobre la població de cèl·lules diana, les CD4⁺; i, a més, no tenia cap efecte sobre la seva capacitat citotòxica. Aquest fet denota una gran importància doncs se sap que els pacients VIH⁺, tot i estar virològicament suprimits i a excepció dels controladors d'elit, presenten un perfil funcional de cèl·lules T CD8⁺ alterat. L'ambient inflamatori, la continua estimulació antigènica i la persistent activació d'aquestes cèl·lules fa que acabin desenvolupant processos d'esgotament cel·lular i immunosenescència[388, 389].

En relació amb el metabolisme, s'ha descrit que els àcids grassos juguen un paper important en la infecció per VIH. En un estudi presentat per Kulkarni et al., es va demostrar que un enzim implicat en la síntesi d'àcids grassos (FASN) era necessari en les etapes finals de la replicació viral[390], suggerint que la regulació del metabolisme d'àcids grassos pot ser clau per al desenvolupament de noves estratègies antivirals. En una línia similar, un estudi presentat per Angela et al., determina que la regulació en la síntesi d'àcids grassos i el consum cel·lular és crucial per a l'activació de les cèl·lules T CD4+, indispensable per a que es produeixi la reactivació viral[391]. Una exemple molt representatiu de la implicació del metabolisme en l'activitat citotòxica de les cèl·lules T CD8⁺ s'observa en els controladors d'elit. Diversos estudis han demostrat que aquests pacients presenten perfils metabòlics diferents, associats al control o progressió del VIH, als dels pacients que estan en tractament[392, 393]. En un estudi de Tarancon-Diez et al.[392], es determina com la pèrdua del control de la infecció està relacionada amb un preferent metabolisme de la glucosa per a l'obtenció d'energia, una desregulació de l'activitat mitocondrial i un augment de l'activació immunològica. Sáez-Cirió, en una línia similar[393], descriu com les cèl·lules T CD8⁺ dels controladors d'elit presenten un major consum d'àcids grassos i fan ús tant del metabolisme de la glucosa com d'àcids grassos per a l'obtenció d'energia; mentre que els CD8⁺ dels pacients en tractament antiretroviral són estrictament dependents del metabolisme de la glucosa. En el nostre estudi s'ha observat que l'àcid làuric és capaç de reprogramar el metabolisme de les cèl·lules T CD8⁺ per obtenir energia a través del procés de la β -oxidació. A més, en relació a l'anàlisi proteòmic, es va observar com l'àcid làuric va promoure un augment en la activitat del protosoma. S'ha descrit que l'augment de l'activitat protosòmica resulta en l'adquisició d'un fenotip de memòria mentre que la disminució ho està amb l'obtenció d'atributs típics de cèl·lules més efectores[394]. Aquest fet posa de manifest que el metabolisme cel·lular podria ser regulat farmacològicament per tal de promoure una millora en la immunitat i permet especular que l'administració *in vivo* de l'àcid làuric podria induir la generació de cèl·lules T CD8⁺ de memòria, a la vegada que reactiva els virus en cèl·lules T CD4+, fet que podria ajudar a millorar el control de la persistència viral.

A mode de conclusió, aquest treball posa de manifest l'habilitat de l'àcid làuric de reactivar el VIH del reservori cel·lular sense afectar la capacitat citotòxica de les cèl·lules T CD8⁺, postulant-se com un nou agent reversor de la latència d'origen natural. La disponibilitat i aprovació de l'àcid làuric com a additiu alimentari, la reduïda toxicitat *in vitro* i *in vivo*, el baix cost i la seva eficàcia per reactivar el VIH fan que l'àcid làuric sigui un molt bon candidat per ser testat en futurs assajos clínics amb l'objectiu d'eliminar els reservori viral.

V. CONCLUSIONS

Conclusions

1. La tècnica del RNA/FISH flow es determina com un **mètode vàlid per a la detecció de transcrits d'ARN del VIH** i de proteïna viral després de la reactivació *ex vivo* de PBMCs de pacients infectats gràcies a la utilització d'un conjunt de sondes d'alta sensibilitat dirigides a la regió gag-pol de la seqüència de l'ARN viral.
2. Aquest nou assaig permet la detecció de cèl·lules que **estan transcrivint el virus de manera activa** en mostres primàries de pacients infectats, tant els que presenten càrrega viral detectable com en aquells que es troben indetectables gràcies al tractament antiretroviral.
3. Existeix una forta **correlació** entre els nivells d'ARN del VIH detectats amb la tècnica del RNA/FISH flow i els diferents **marcadors de progressió de la malaltia** (càrrega viral plasmàtica, recompte absolut de cèl·lules T CD4⁺ i ratio CD4/CD8), així com amb els nivells d'ARN intracel·lular mesurats per les **tècniques de PCR convencionals** (qPCR).
4. Aquesta nova metodologia ha permès la caracterització de les diferents subpoblacions cel·lulars que suporten la transcripció viral en mostres de pacients VIH⁺ i hem descrit les **cèl·lules T CD4⁺ efectores de memòria** com el principal nínxol de transcripció activa, tant en la infecció tractada com sense tractar.
5. La tècnica del RNA/FISH es postula com una **nova eina per a l'avaluació** de l'eficàcia dels **agents reversors de la latència** (LRAs) per revertir l'estat latent del VIH en les diferents subpoblacions cel·lulars.
6. Els agents reversors de la latència (LRAs) indueixen una **resposta heterogènia** en les diferents subpoblacions de cèl·lules T CD4⁺ de pacients infectats pel VIH.
7. Entre un **3-30%** del **reservori viral total** pot ser **reactivat** per LRAs i transcriure HIV-RNA, però només un 5-10% d'aquestes cèl·lules poden produir p24.
8. La combinació sinèrgica **Romidepsina i Ingenol** indueix una **elevada freqüència de cèl·lules VIH-ARN⁺** en totes les subpoblacions de cèl·lules T CD4⁺. A més, indueix un clar augment en la proporció de cèl·lules que produeixen

la **proteïna viral p24** tant en CD4 totals com en la subpoblació de cèl·lules centrals de memòria (T_{CM}).

9. La combinació de **Panobinostat i Ingenol** té un efecte **antagònic** a nivell de transcripció viral en el 89% de les mostres testades.
10. L'**àcid làuric**, un àcid gras natural, és capaç de **reactivar el virus del VIH** i induir la producció d'ARN viral i proteïna tant en models de latència com en cèl·lules primàries de pacients VIH+ sense comprometre la viabilitat cel·lular.
11. La **funcionalitat** de les cèl·lules **T CD8⁺** **no es veu afectada** per la presència d'àcid làuric.
12. L'àcid làuric promou una **reprogramació del metabolisme cel·lular**, doncs indueix un augment de la producció de diacilglicerols en cèl·lules T CD4⁺ que podrien facilitar la producció de proteïna viral en el context de la reactivació, i fomenta l'ús de la β -oxidació per a l'obtenció d'energia cel·lular en el cas de les cèl·lules T CD8⁺.
13. Els resultats obtinguts *in vitro* postulen **l'àcid làuric** com un prometedor compostos per a ser testat en **assajos clínics** que tinguin com a objectiu l'eliminació dels reservoris virals del VIH.

VI. LÍNIAS DE FUTUR

Línies de futur

En base als resultats obtinguts en els treballs que componen la present tesi doctoral, s'ha determinat que la tècnica del RNA/FISH flow és una eina vàlida per a la valuació de compostos reversors de la latència i que l'àcid làuric es postula com un candidat prometedor per ésser testat en assajos clínics.

Seguint aquesta línia, el laboratori ha aconseguit finançament públic gràcies a la concessió d'un projecte FIS atorgat pel Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) aquest mateix any per dur a terme un assaig clínic pilot amb l'àcid làuric. La proposta té com a objectiu principal avaluar l'efecte de la suplementació dietètica de l'àcid làuric en la reactivació del VIH en cèl·lules T CD4⁺ en pacients infectats per VIH i que estiguin en tractament antiretroviral. Els objectiu plantejats són determinar la tolerància i seguretat de l'àcid làuric en pacients VIH⁺ (tot i que no s'esperen efectes adversos); determinar la concentració plasmàtica del compost per determinar-ne la biodisponibilitat; avaluar l'efecte de l'àcid làuric en la mida de reservori tant a nivell cel·lular com tissular, en aquest cas es quantificarà el reservori tant en CD4⁺ obtinguts de sang com en mostres d'intestí i caracteritzar la resposta immunològica induïda per la ingesta de l'àcid làuric.

Així doncs, l'assaig clínic es planteja com un estudi pilot, aleatoritzat i control amb placebo i serà realitzat al departament de Malalties Infeccioses de l'Hospital Vall d'Hebron. S'inclouran 45 pacients adults i amb infecció per VIH que presenten una càrrega viral indetectable (com a mínim durant 3 anys prèviament a l'inici de l'estudi) que seran aleatoritzats 1:1:1 per rebre el suplement dietètic amb 4g d'àcid làuric (grup experimental 1), 20g d'àcid làuric (grup experimental 2) o bé placebo (grup control), durant 24 setmanes. Es farà un seguiment posterior a la interrupció de la suplementació alimentària durant 24 setmanes més i en cap cas es durà a terme la interrupció del tractament antiretroviral.

Visit number	1	2	3	4	5	6	7
Week	0	1 (day)	1	8	24	36	48
Treatment phase							
Follow-up phase							
Inclusion/exclusion criteria	X						
Informed consent	X						
Routine Biochemistry	X			X	X		X
Unspliced HIV-RNA	X	X	X	X	X	X	X
Proviral HIV-DNA and intact provirus	X			X	X		X
Immunological assays	X	X	X		X		X
Plasma HIV-RNA	X	X		X	X		X
CD4 T cell counts	X			X	X		X
Intestinal biopsies					X		X
Lauric acid concentrations				X	X		X
Side effects		X	X	X	X		
Compliance		X	X	X	X		

Taula 4. Esquema general del monitoratge del tractament i del seguiment.

VII. BIBLIOGRAFIA

Referències

1. Centers for Disease, C., *Kaposi's sarcoma and Pneumocystis pneumonia among homosexual men--New York City and California*. MMWR Morb Mortal Wkly Rep, 1981. **30**(25): p. 305-8.
2. Hymes, K.B., et al., *Kaposi's sarcoma in homosexual men-a report of eight cases*. Lancet, 1981. **2**(8247): p. 598-600.
3. De Cock, K.M., et al., *Experience with human immunodeficiency virus infection in patients with hepatitis B virus and hepatitis delta virus infections in Los Angeles, 1977-1985*. Am J Epidemiol, 1988. **127**(6): p. 1250-60.
4. De Cock, K.M., H.W. Jaffe, and J.W. Curran, *Reflections on 30 years of AIDS*. Emerg Infect Dis, 2011. **17**(6): p. 1044-8.
5. Greene, W.C., *A history of AIDS: looking back to see ahead*. Eur J Immunol, 2007. **37** Suppl 1: p. S94-102.
6. Barre-Sinoussi, F., et al., *Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS)*. Science, 1983. **220**(4599): p. 868-71.
7. Montagnier, L., et al., *A new human T-lymphotropic retrovirus: characterization and possible role in lymphadenopathy and acquired immune deficiency syndromes*. 1984.
8. Gallo, R.C., et al., *Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS*. Science, 1984. **224**(4648): p. 500-3.
9. Popovic, M., et al., *Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS*. Science, 1984. **224**(4648): p. 497-500.
10. Schupbach, J., et al., *Serological analysis of a subgroup of human T-lymphotropic retroviruses (HTLV-III) associated with AIDS*. Science, 1984. **224**(4648): p. 503-5.
11. Levy, J.A., et al., *Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San Francisco patients with AIDS*. Science, 1984. **225**(4664): p. 840-2.
12. Brook, I., *Approval of zidovudine (AZT) for acquired immunodeficiency syndrome. A challenge to the medical and pharmaceutical communities*. JAMA, 1987. **258**(11): p. 1517.
13. Fanales-Belasio, E., et al., *HIV virology and pathogenetic mechanisms of infection: a brief overview*. Ann Ist Super Sanita, 2010. **46**(1): p. 5-14.
14. Gilbert, P.B., et al., *Comparison of HIV-1 and HIV-2 infectivity from a prospective cohort study in Senegal*. Stat Med, 2003. **22**(4): p. 573-93.
15. Sharp, P.M. and B.H. Hahn, *Origins of HIV and the AIDS pandemic*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2011. **1**(1): p. a006841.
16. Campbell-Yesufu, O.T. and R.T. Gandhi, *Update on human immunodeficiency virus (HIV)-2 infection*. Clin Infect Dis, 2011. **52**(6): p. 780-7.
17. Reeves, J.D. and R.W. Doms, *Human immunodeficiency virus type 2*. J Gen Virol, 2002. **83**(Pt 6): p. 1253-65.
18. Hahn, B.H., et al., *AIDS as a zoonosis: scientific and public health implications*. Science, 2000. **287**(5453): p. 607-14.
19. Sharp, P.M., G.M. Shaw, and B.H. Hahn, *Simian immunodeficiency virus infection of chimpanzees*. J Virol, 2005. **79**(7): p. 3891-902.
20. Lemey, P., et al., *Tracing the origin and history of the HIV-2 epidemic*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(11): p. 6588-92.
21. Sierra, S., B. Kupfer, and R. Kaiser, *Basics of the virology of HIV-1 and its replication*. J Clin Virol, 2005. **34**(4): p. 233-44.
22. Turner, B.G. and M.F. Summers, *Structural biology of HIV*. J Mol Biol, 1999. **285**(1): p. 1-32.

23. Arthur, L.O., et al., *Cellular proteins bound to immunodeficiency viruses: implications for pathogenesis and vaccines*. Science, 1992. **258**(5090): p. 1935-8.
24. Vaishnav, Y.N. and F. Wong-Staal, *The biochemistry of AIDS*. Annu Rev Biochem, 1991. **60**: p. 577-630.
25. Levy, J.A., *Pathogenesis of human immunodeficiency virus infection*. Microbiol Rev, 1993. **57**(1): p. 183-289.
26. Feinberg, M.B. and W.C. Greene, *Molecular insights into human immunodeficiency virus type 1 pathogenesis*. Curr Opin Immunol, 1992. **4**(4): p. 466-74.
27. Sanyaolu, A., et al. *The Mechanism of HIV-1 Latency and Therapeutic Implication*. 2019.
28. Watts, J.M., et al., *Architecture and secondary structure of an entire HIV-1 RNA genome*. Nature, 2009. **460**(7256): p. 711-6.
29. Fujita, M., et al., *Multifaceted activity of HIV Vpr/Vpx proteins: the current view of their virological functions*. Rev Med Virol, 2010. **20**(2): p. 68-76.
30. Kwong, P.D., et al., *Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody*. Nature, 1998. **393**(6686): p. 648-59.
31. Chen, B., *Molecular Mechanism of HIV-1 Entry*. Trends Microbiol, 2019. **27**(10): p. 878-891.
32. Simmons, G., et al., *Primary, syncytium-inducing human immunodeficiency virus type 1 isolates are dual-tropic and most can use either Lestr or CCR5 as coreceptors for virus entry*. J Virol, 1996. **70**(12): p. 8355-60.
33. Wilen, C.B., J.C. Tilton, and R.W. Doms, *Molecular mechanisms of HIV entry*. Adv Exp Med Biol, 2012. **726**: p. 223-42.
34. Wilen, C.B., J.C. Tilton, and R.W. Doms, *HIV: cell binding and entry*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2012. **2**(8).
35. De Rijck, J., et al., *Lentiviral nuclear import: a complex interplay between virus and host*. Bioessays, 2007. **29**(5): p. 441-51.
36. Ferguson, M.R., et al., *HIV-1 replication cycle*. Clin Lab Med, 2002. **22**(3): p. 611-35.
37. Arhel, N., *Revisiting HIV-1 uncoating*. Retrovirology, 2010. **7**: p. 96.
38. Marini, B., et al., *Nuclear architecture dictates HIV-1 integration site selection*. Nature, 2015. **521**(7551): p. 227-31.
39. Schroder, A.R., et al., *HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots*. Cell, 2002. **110**(4): p. 521-9.
40. Sloan, R.D. and M.A. Wainberg, *The role of unintegrated DNA in HIV infection*. Retrovirology, 2011. **8**: p. 52.
41. Martinez-Picado, J., et al., *Episomal HIV-1 DNA and its relationship to other markers of HIV-1 persistence*. Retrovirology, 2018. **15**(1): p. 15.
42. Richetta, C., et al., *Two-long terminal repeat (LTR) DNA circles are a substrate for HIV-1 integrase*. J Biol Chem, 2019. **294**(20): p. 8286-8295.
43. Engelman, A. and P. Cherepanov, *The structural biology of HIV-1: mechanistic and therapeutic insights*. Nat Rev Microbiol, 2012. **10**(4): p. 279-90.
44. Peterlin, B.M. and D.H. Price, *Controlling the elongation phase of transcription with P-TEFb*. Mol Cell, 2006. **23**(3): p. 297-305.
45. Jolly, C. and Q.J. Sattentau, *Human immunodeficiency virus type 1 assembly, budding, and cell-cell spread in T cells take place in tetraspanin-enriched plasma membrane domains*. J Virol, 2007. **81**(15): p. 7873-84.
46. Sundquist, W.I. and H.G. Krausslich, *HIV-1 assembly, budding, and maturation*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2012. **2**(7): p. a006924.
47. Das, S.R. and S. Jameel, *Biology of the HIV Nef protein*. Indian J Med Res, 2005. **121**(4): p. 315-32.

48. Hill, M., G. Tachedjian, and J. Mak, *The packaging and maturation of the HIV-1 Pol proteins*. *Curr HIV Res*, 2005. **3**(1): p. 73-85.
49. Pantaleo, G., C. Graziosi, and A.S. Fauci, *The immunopathogenesis of human immunodeficiency virus infection*. *N Engl J Med*, 1993. **328**(5): p. 327-35.
50. Wu, L. and V.N. KewalRamani, *Dendritic-cell interactions with HIV: infection and viral dissemination*. *Nat Rev Immunol*, 2006. **6**(11): p. 859-68.
51. Turville, S.G., et al., *Diversity of receptors binding HIV on dendritic cell subsets*. *Nat Immunol*, 2002. **3**(10): p. 975-83.
52. Mehandru, S., et al., *Primary HIV-1 infection is associated with preferential depletion of CD4+ T lymphocytes from effector sites in the gastrointestinal tract*. *J Exp Med*, 2004. **200**(6): p. 761-70.
53. Guadalupe, M., et al., *Severe CD4+ T-cell depletion in gut lymphoid tissue during primary human immunodeficiency virus type 1 infection and substantial delay in restoration following highly active antiretroviral therapy*. *J Virol*, 2003. **77**(21): p. 11708-17.
54. Cohen, M.S., et al., *Acute HIV-1 Infection*. *N Engl J Med*, 2011. **364**(20): p. 1943-54.
55. Kahn, J.O. and B.D. Walker, *Acute human immunodeficiency virus type 1 infection*. *N Engl J Med*, 1998. **339**(1): p. 33-9.
56. Koup, R.A., et al., *Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome*. *J Virol*, 1994. **68**(7): p. 4650-5.
57. Letvin, N.L. and B.D. Walker, *Immunopathogenesis and immunotherapy in AIDS virus infections*. *Nat Med*, 2003. **9**(7): p. 861-6.
58. Coffin, J. and R. Swanstrom, *HIV pathogenesis: dynamics and genetics of viral populations and infected cells*. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2013. **3**(1): p. a012526.
59. Broder, S., *The development of antiretroviral therapy and its impact on the HIV-1/AIDS pandemic*. *Antiviral Res*, 2010. **85**(1): p. 1-18.
60. Palella, F.J., Jr., et al., *Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators*. *N Engl J Med*, 1998. **338**(13): p. 853-60.
61. Margolis, A.M., et al., *A review of the toxicity of HIV medications*. *J Med Toxicol*, 2014. **10**(1): p. 26-39.
62. Deeks, S.G., et al., *HIV infection*. *Nat Rev Dis Primers*, 2015. **1**: p. 15035.
63. Tang, M.W. and R.W. Shafer, *HIV-1 antiretroviral resistance: scientific principles and clinical applications*. *Drugs*, 2012. **72**(9): p. e1-25.
64. Deeks, S.G., et al., *International AIDS Society global scientific strategy: towards an HIV cure 2016*. *Nat Med*, 2016. **22**(8): p. 839-50.
65. Wong, J.K., et al., *Recovery of replication-competent HIV despite prolonged suppression of plasma viremia*. *Science*, 1997. **278**(5341): p. 1291-5.
66. Finzi, D., et al., *Identification of a reservoir for HIV-1 in patients on highly active antiretroviral therapy*. *Science*, 1997. **278**(5341): p. 1295-300.
67. Chun, T.W., et al., *Presence of an inducible HIV-1 latent reservoir during highly active antiretroviral therapy*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. **94**(24): p. 13193-7.
68. Alexaki, A., Y. Liu, and B. Wigdahl, *Cellular reservoirs of HIV-1 and their role in viral persistence*. *Curr HIV Res*, 2008. **6**(5): p. 388-400.
69. Kulpa, D.A. and N. Chomont, *HIV persistence in the setting of antiretroviral therapy: when, where and how does HIV hide?* *J Virus Erad*, 2015. **1**(2): p. 59-66.
70. Eisele, E. and R.F. Siliciano, *Redefining the viral reservoirs that prevent HIV-1 eradication*. *Immunity*, 2012. **37**(3): p. 377-88.
71. Vanhamel, J., A. Bruggemans, and Z. Debyser, *Establishment of latent HIV-1 reservoirs: what do we really know?* *J Virus Erad*, 2019. **5**(1): p. 3-9.

72. Pasternak, A.O., V.V. Lukashov, and B. Berkhout, *Cell-associated HIV RNA: a dynamic biomarker of viral persistence*. *Retrovirology*, 2013. **10**: p. 41.
73. Yukl, S.A., et al., *HIV latency in isolated patient CD4(+) T cells may be due to blocks in HIV transcriptional elongation, completion, and splicing*. *Sci Transl Med*, 2018. **10**(430).
74. Abdel-Mohsen, M., et al., *CD32 is expressed on cells with transcriptionally active HIV but does not enrich for HIV DNA in resting T cells*. *Sci Transl Med*, 2018. **10**(437).
75. Serra-Peinado, C., et al., *Expression of CD20 after viral reactivation renders HIV-reservoir cells susceptible to Rituximab*. *Nat Commun*, 2019. **10**(1): p. 3705.
76. Darcis, G., B. Berkhout, and A.O. Pasternak, *The Quest for Cellular Markers of HIV Reservoirs: Any Color You Like*. *Front Immunol*, 2019. **10**: p. 2251.
77. Finzi, D., et al., *Latent infection of CD4+ T cells provides a mechanism for lifelong persistence of HIV-1, even in patients on effective combination therapy*. *Nat Med*, 1999. **5**(5): p. 512-7.
78. Chun, T.W., et al., *In vivo fate of HIV-1-infected T cells: quantitative analysis of the transition to stable latency*. *Nat Med*, 1995. **1**(12): p. 1284-90.
79. Chun, T.W., et al., *Quantification of latent tissue reservoirs and total body viral load in HIV-1 infection*. *Nature*, 1997. **387**(6629): p. 183-8.
80. Richman, D.D., et al., *Replication competence of virions induced from CD4+ lymphocytes latently infected with HIV*. *Retrovirology*, 2019. **16**(1): p. 4.
81. Zhou, Y., et al., *Kinetics of human immunodeficiency virus type 1 decay following entry into resting CD4+ T cells*. *J Virol*, 2005. **79**(4): p. 2199-210.
82. Baldauf, H.M., et al., *SAMHD1 restricts HIV-1 infection in resting CD4(+) T cells*. *Nat Med*, 2012. **18**(11): p. 1682-7.
83. Persaud, D., et al., *Latency in human immunodeficiency virus type 1 infection: no easy answers*. *J Virol*, 2003. **77**(3): p. 1659-65.
84. Swiggard, W.J., et al., *Human immunodeficiency virus type 1 can establish latent infection in resting CD4+ T cells in the absence of activating stimuli*. *J Virol*, 2005. **79**(22): p. 14179-88.
85. Saleh, S., et al., *CCR7 ligands CCL19 and CCL21 increase permissiveness of resting memory CD4+ T cells to HIV-1 infection: a novel model of HIV-1 latency*. *Blood*, 2007. **110**(13): p. 4161-4.
86. Unutmaz, D., et al., *Cytokine signals are sufficient for HIV-1 infection of resting human T lymphocytes*. *J Exp Med*, 1999. **189**(11): p. 1735-46.
87. Gattinoni, L., et al., *A human memory T cell subset with stem cell-like properties*. *Nat Med*, 2011. **17**(10): p. 1290-7.
88. Jaafoura, S., et al., *Progressive contraction of the latent HIV reservoir around a core of less-differentiated CD4(+) memory T Cells*. *Nat Commun*, 2014. **5**: p. 5407.
89. Buzon, M.J., et al., *HIV-1 persistence in CD4+ T cells with stem cell-like properties*. *Nat Med*, 2014. **20**(2): p. 139-42.
90. Barton, K., A. Winckelmann, and S. Palmer, *HIV-1 Reservoirs During Suppressive Therapy*. *Trends Microbiol*, 2016. **24**(5): p. 345-355.
91. Lanzavecchia, A. and F. Sallusto, *Understanding the generation and function of memory T cell subsets*. *Curr Opin Immunol*, 2005. **17**(3): p. 326-32.
92. Mahnke, Y.D., et al., *The who's who of T-cell differentiation: human memory T-cell subsets*. *Eur J Immunol*, 2013. **43**(11): p. 2797-809.
93. Chun, T.W., et al., *Differential susceptibility of naive and memory CD4+ T cells to the cytopathic effects of infection with human immunodeficiency virus type 1 strain LAI*. *J Virol*, 1997. **71**(6): p. 4436-44.
94. Chomont, N., et al., *HIV reservoir size and persistence are driven by T cell survival and homeostatic proliferation*. *Nat Med*, 2009. **15**(8): p. 893-900.

95. Lee, G.Q., et al., *Clonal expansion of genome-intact HIV-1 in functionally polarized Th1 CD4+ T cells*. J Clin Invest, 2017. **127**(7): p. 2689-2696.
96. Sun, H., et al., *Th1/17 Polarization of CD4 T Cells Supports HIV-1 Persistence during Antiretroviral Therapy*. J Virol, 2015. **89**(22): p. 11284-93.
97. Wacleche, V.S., et al., *New insights into the heterogeneity of Th17 subsets contributing to HIV-1 persistence during antiretroviral therapy*. Retrovirology, 2016. **13**(1): p. 59.
98. Tran, T.A., et al., *Resting regulatory CD4 T cells: a site of HIV persistence in patients on long-term effective antiretroviral therapy*. PLoS One, 2008. **3**(10): p. e3305.
99. Perreau, M., et al., *Follicular helper T cells serve as the major CD4 T cell compartment for HIV-1 infection, replication, and production*. J Exp Med, 2013. **210**(1): p. 143-56.
100. Banga, R., et al., *PD-1(+) and follicular helper T cells are responsible for persistent HIV-1 transcription in treated aviremic individuals*. Nat Med, 2016. **22**(7): p. 754-61.
101. Pallikkuth, S., et al., *Peripheral T Follicular Helper Cells Are the Major HIV Reservoir within Central Memory CD4 T Cells in Peripheral Blood from Chronically HIV-Infected Individuals on Combination Antiretroviral Therapy*. J Virol, 2015. **90**(6): p. 2718-28.
102. Pierson, T., J. McArthur, and R.F. Siliciano, *Reservoirs for HIV-1: mechanisms for viral persistence in the presence of antiviral immune responses and antiretroviral therapy*. Annu Rev Immunol, 2000. **18**: p. 665-708.
103. Siliciano, J.D., et al., *Long-term follow-up studies confirm the stability of the latent reservoir for HIV-1 in resting CD4+ T cells*. Nat Med, 2003. **9**(6): p. 727-8.
104. Churchill, M.J., et al., *HIV reservoirs: what, where and how to target them*. Nat Rev Microbiol, 2016. **14**(1): p. 55-60.
105. Kandathil, A.J., S. Sugawara, and A. Balagopal, *Are T cells the only HIV-1 reservoir?* Retrovirology, 2016. **13**(1): p. 86.
106. Kumar, A., W. Abbas, and G. Herbein, *HIV-1 latency in monocytes/macrophages*. Viruses, 2014. **6**(4): p. 1837-60.
107. Coleman, C.M. and L. Wu, *HIV interactions with monocytes and dendritic cells: viral latency and reservoirs*. Retrovirology, 2009. **6**: p. 51.
108. Soriano-Sarabia, N., et al., *Peripheral Vgamma9Vdelta2 T Cells Are a Novel Reservoir of Latent HIV Infection*. PLoS Pathog, 2015. **11**(10): p. e1005201.
109. Cantero-Perez, J., et al., *Resident memory T cells are a cellular reservoir for HIV in the cervical mucosa*. Nat Commun, 2019. **10**(1): p. 4739.
110. Wong, J.K. and S.A. Yukl, *Tissue reservoirs of HIV*. Curr Opin HIV AIDS, 2016. **11**(4): p. 362-70.
111. Westermann, J. and R. Pabst, *Distribution of lymphocyte subsets and natural killer cells in the human body*. Clin Investig, 1992. **70**(7): p. 539-44.
112. Chaillon, A., et al., *HIV persists throughout deep tissues with repopulation from multiple anatomical sources*. J Clin Invest, 2020. **130**(4): p. 1699-1712.
113. Schragar, L.K. and M.P. D'Souza, *Cellular and anatomical reservoirs of HIV-1 in patients receiving potent antiretroviral combination therapy*. JAMA, 1998. **280**(1): p. 67-71.
114. Pantaleo, G., C. Graziosi, and A.S. Fauci, *The role of lymphoid organs in the immunopathogenesis of HIV infection*. AIDS, 1993. **7 Suppl 1**: p. S19-23.
115. Pantaleo, G., et al., *HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinically latent stage of disease*. Nature, 1993. **362**(6418): p. 355-8.
116. Pantaleo, G., et al., *Lymphoid organs function as major reservoirs for human immunodeficiency virus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(21): p. 9838-42.
117. Kohler, S.L., et al., *Germinal Center T Follicular Helper Cells Are Highly Permissive to HIV-1 and Alter Their Phenotype during Virus Replication*. J Immunol, 2016. **196**(6): p. 2711-22.

118. Deleage, C., et al., *Defining HIV and SIV Reservoirs in Lymphoid Tissues*. *Pathog Immun*, 2016. **1**(1): p. 68-106.
119. Estes, J.D., et al., *Defining total-body AIDS-virus burden with implications for curative strategies*. *Nat Med*, 2017. **23**(11): p. 1271-1276.
120. Fletcher, C.V., et al., *Persistent HIV-1 replication is associated with lower antiretroviral drug concentrations in lymphatic tissues*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014. **111**(6): p. 2307-12.
121. Connick, E., et al., *CTL fail to accumulate at sites of HIV-1 replication in lymphoid tissue*. *J Immunol*, 2007. **178**(11): p. 6975-83.
122. Connick, E., et al., *Compartmentalization of simian immunodeficiency virus replication within secondary lymphoid tissues of rhesus macaques is linked to disease stage and inversely related to localization of virus-specific CTL*. *J Immunol*, 2014. **193**(11): p. 5613-25.
123. Dave, R.S., P. Jain, and S.N. Byrareddy, *Follicular Dendritic Cells of Lymph Nodes as Human Immunodeficiency Virus/Simian Immunodeficiency Virus Reservoirs and Insights on Cervical Lymph Node*. *Front Immunol*, 2018. **9**: p. 805.
124. Smith, B.A., et al., *Persistence of infectious HIV on follicular dendritic cells*. *J Immunol*, 2001. **166**(1): p. 690-6.
125. Langford, D., et al., *Relationship of antiretroviral treatment to postmortem brain tissue viral load in human immunodeficiency virus-infected patients*. *J Neurovirol*, 2006. **12**(2): p. 100-7.
126. Kumar, A.M., et al., *Human immunodeficiency virus type 1 RNA Levels in different regions of human brain: quantification using real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction*. *J Neurovirol*, 2007. **13**(3): p. 210-24.
127. Letendre, S., et al., *Validation of the CNS Penetration-Effectiveness rank for quantifying antiretroviral penetration into the central nervous system*. *Arch Neurol*, 2008. **65**(1): p. 65-70.
128. Enting, R.H., et al., *Antiretroviral drugs and the central nervous system*. *AIDS*, 1998. **12**(15): p. 1941-55.
129. Decloedt, E.H., et al., *Central nervous system penetration of antiretroviral drugs: pharmacokinetic, pharmacodynamic and pharmacogenomic considerations*. *Clin Pharmacokinet*, 2015. **54**(6): p. 581-98.
130. Rueda, C.M., et al., *HIV-induced T-cell activation/exhaustion in rectal mucosa is controlled only partially by antiretroviral treatment*. *PLoS One*, 2012. **7**(1): p. e30307.
131. Klatt, N.R., N.T. Funderburg, and J.M. Brenchley, *Microbial translocation, immune activation, and HIV disease*. *Trends Microbiol*, 2013. **21**(1): p. 6-13.
132. Mehandru, S., et al., *Lack of mucosal immune reconstitution during prolonged treatment of acute and early HIV-1 infection*. *PLoS Med*, 2006. **3**(12): p. e484.
133. Chun, T.W., et al., *Persistence of HIV in gut-associated lymphoid tissue despite long-term antiretroviral therapy*. *J Infect Dis*, 2008. **197**(5): p. 714-20.
134. Yukl, S.A., et al., *The distribution of HIV DNA and RNA in cell subsets differs in gut and blood of HIV-positive patients on ART: implications for viral persistence*. *J Infect Dis*, 2013. **208**(8): p. 1212-20.
135. Belmonte, L., et al., *The intestinal mucosa as a reservoir of HIV-1 infection after successful HAART*. *AIDS*, 2007. **21**(15): p. 2106-8.
136. Palmer, S., et al., *Low-level viremia persists for at least 7 years in patients on suppressive antiretroviral therapy*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. **105**(10): p. 3879-84.
137. Palmer, S., et al., *New real-time reverse transcriptase-initiated PCR assay with single-copy sensitivity for human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma*. *J Clin Microbiol*, 2003. **41**(10): p. 4531-6.

138. Maldarelli, F., et al., *ART suppresses plasma HIV-1 RNA to a stable set point predicted by pretherapy viremia*. PLoS Pathog, 2007. **3**(4): p. e46.
139. Chun, T.W., et al., *HIV-infected individuals receiving effective antiviral therapy for extended periods of time continually replenish their viral reservoir*. J Clin Invest, 2005. **115**(11): p. 3250-5.
140. Kulpa, D.A., et al., *The immunological synapse: the gateway to the HIV reservoir*. Immunol Rev, 2013. **254**(1): p. 305-25.
141. Taylor, S. and A. Pereira, *Penetration of HIV-1 protease inhibitors into CSF and semen*. HIV Med, 2000. **1 Suppl 2**: p. 18-22.
142. Bronnimann, M.P., P.J. Skinner, and E. Connick, *The B-Cell Follicle in HIV Infection: Barrier to a Cure*. Front Immunol, 2018. **9**: p. 20.
143. Hatano, H., et al., *Increase in 2-long terminal repeat circles and decrease in D-dimer after raltegravir intensification in patients with treated HIV infection: a randomized, placebo-controlled trial*. J Infect Dis, 2013. **208**(9): p. 1436-42.
144. Buzon, M.J., et al., *HIV-1 replication and immune dynamics are affected by raltegravir intensification of HAART-suppressed subjects*. Nat Med, 2010. **16**(4): p. 460-5.
145. Raymond, S., et al., *Evolution of HIV-1 quasispecies and coreceptor use in cell reservoirs of patients on suppressive antiretroviral therapy*. J Antimicrob Chemother, 2014. **69**(9): p. 2527-30.
146. Lorenzo-Redondo, R., et al., *Persistent HIV-1 replication maintains the tissue reservoir during therapy*. Nature, 2016. **530**(7588): p. 51-56.
147. Chun, T.W., et al., *Early establishment of a pool of latently infected, resting CD4(+) T cells during primary HIV-1 infection*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(15): p. 8869-73.
148. Whitney, J.B., et al., *Rapid seeding of the viral reservoir prior to SIV viraemia in rhesus monkeys*. Nature, 2014. **512**(7512): p. 74-7.
149. Okoye, A.A., et al., *Early antiretroviral therapy limits SIV reservoir establishment to delay or prevent post-treatment viral rebound*. Nat Med, 2018. **24**(9): p. 1430-1440.
150. Wang, Z., et al., *Expanded cellular clones carrying replication-competent HIV-1 persist, wax, and wane*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2018. **115**(11): p. E2575-E2584.
151. Hosmane, N.N., et al., *Proliferation of latently infected CD4(+) T cells carrying replication-competent HIV-1: Potential role in latent reservoir dynamics*. J Exp Med, 2017. **214**(4): p. 959-972.
152. Vandergeeten, C., et al., *Interleukin-7 promotes HIV persistence during antiretroviral therapy*. Blood, 2013. **121**(21): p. 4321-9.
153. Bosque, A., et al., *Homeostatic proliferation fails to efficiently reactivate HIV-1 latently infected central memory CD4+ T cells*. PLoS Pathog, 2011. **7**(10): p. e1002288.
154. Christensen-Quick, A., et al., *Cytomegalovirus and HIV Persistence: Pouring Gas on the Fire*. AIDS Res Hum Retroviruses, 2017. **33**(S1): p. S23-S30.
155. Murray, A.J., et al., *The Latent Reservoir for HIV-1: How Immunologic Memory and Clonal Expansion Contribute to HIV-1 Persistence*. J Immunol, 2016. **197**(2): p. 407-17.
156. von Stockenstrom, S., et al., *Longitudinal Genetic Characterization Reveals That Cell Proliferation Maintains a Persistent HIV Type 1 DNA Pool During Effective HIV Therapy*. J Infect Dis, 2015. **212**(4): p. 596-607.
157. Anderson, E.M. and F. Maldarelli, *The role of integration and clonal expansion in HIV infection: live long and prosper*. Retrovirology, 2018. **15**(1): p. 71.
158. Maldarelli, F., et al., *HIV latency. Specific HIV integration sites are linked to clonal expansion and persistence of infected cells*. Science, 2014. **345**(6193): p. 179-83.
159. Wagner, T.A., et al., *HIV latency. Proliferation of cells with HIV integrated into cancer genes contributes to persistent infection*. Science, 2014. **345**(6196): p. 570-3.

160. Cohn, L.B., et al., *HIV-1 integration landscape during latent and active infection*. Cell, 2015. **160**(3): p. 420-32.
161. Imamichi, H., et al., *Lifespan of effector memory CD4+ T cells determined by replication-incompetent integrated HIV-1 provirus*. AIDS, 2014. **28**(8): p. 1091-9.
162. Bruner, K.M., et al., *Defective proviruses rapidly accumulate during acute HIV-1 infection*. Nat Med, 2016. **22**(9): p. 1043-9.
163. Bui, J.K., et al., *Provirus with identical sequences comprise a large fraction of the replication-competent HIV reservoir*. PLoS Pathog, 2017. **13**(3): p. e1006283.
164. Lorenzi, J.C., et al., *Paired quantitative and qualitative assessment of the replication-competent HIV-1 reservoir and comparison with integrated proviral DNA*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2016. **113**(49): p. E7908-E7916.
165. Siliciano, R.F. and W.C. Greene, *HIV latency*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2011. **1**(1): p. a007096.
166. Blankson, J.N., D. Persaud, and R.F. Siliciano, *The challenge of viral reservoirs in HIV-1 infection*. Annu Rev Med, 2002. **53**: p. 557-93.
167. Dahl, V., L. Josefsson, and S. Palmer, *HIV reservoirs, latency, and reactivation: prospects for eradication*. Antiviral Res, 2010. **85**(1): p. 286-94.
168. Castro-Gonzalez, S., M. Colomer-Lluch, and R. Serra-Moreno, *Barriers for HIV Cure: The Latent Reservoir*. AIDS Res Hum Retroviruses, 2018. **34**(9): p. 739-759.
169. Colin, L. and C. Van Lint, *Molecular control of HIV-1 postintegration latency: implications for the development of new therapeutic strategies*. Retrovirology, 2009. **6**: p. 111.
170. Pierson, T.C., et al., *Molecular characterization of preintegration latency in human immunodeficiency virus type 1 infection*. J Virol, 2002. **76**(17): p. 8518-31.
171. Bukrinsky, M.I., et al., *Quiescent T lymphocytes as an inducible virus reservoir in HIV-1 infection*. Science, 1991. **254**(5030): p. 423-7.
172. Chun, T.W., et al., *Gene expression and viral production in latently infected, resting CD4+ T cells in viremic versus aviremic HIV-infected individuals*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(4): p. 1908-13.
173. Donahue, D.A. and M.A. Wainberg, *Cellular and molecular mechanisms involved in the establishment of HIV-1 latency*. Retrovirology, 2013. **10**: p. 11.
174. Han, Y., et al., *Resting CD4+ T cells from human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-infected individuals carry integrated HIV-1 genomes within actively transcribed host genes*. J Virol, 2004. **78**(12): p. 6122-33.
175. Shan, L., et al., *Influence of host gene transcription level and orientation on HIV-1 latency in a primary-cell model*. J Virol, 2011. **85**(11): p. 5384-93.
176. Patro, S.C., et al., *Combined HIV-1 sequence and integration site analysis informs viral dynamics and allows reconstruction of replicating viral ancestors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2019. **116**(51): p. 25891-25899.
177. Einkauf, K.B., et al., *Intact HIV-1 proviruses accumulate at distinct chromosomal positions during prolonged antiretroviral therapy*. J Clin Invest, 2019. **129**(3): p. 988-998.
178. Lenasi, T., X. Contreras, and B.M. Peterlin, *Transcriptional interference antagonizes proviral gene expression to promote HIV latency*. Cell Host Microbe, 2008. **4**(2): p. 123-33.
179. Cary, D.C., K. Fujinaga, and B.M. Peterlin, *Molecular mechanisms of HIV latency*. J Clin Invest, 2016. **126**(2): p. 448-54.
180. Battistini, A. and M. Sgarbanti, *HIV-1 latency: an update of molecular mechanisms and therapeutic strategies*. Viruses, 2014. **6**(4): p. 1715-58.
181. Turrini, F., et al., *HIV-1 transcriptional silencing caused by TRIM22 inhibition of Sp1 binding to the viral promoter*. Retrovirology, 2015. **12**: p. 104.

182. Richman, D.D., et al., *The challenge of finding a cure for HIV infection*. Science, 2009. **323**(5919): p. 1304-7.
183. Romani, B. and E. Allahbakhshi, *Underlying mechanisms of HIV-1 latency*. Virus Genes, 2017. **53**(3): p. 329-339.
184. Abbas, W. and G. Herbein, *Molecular Understanding of HIV-1 Latency*. Adv Virol, 2012. **2012**: p. 574967.
185. Coiras, M., et al., *Understanding HIV-1 latency provides clues for the eradication of long-term reservoirs*. Nat Rev Microbiol, 2009. **7**(11): p. 798-812.
186. Minoshima, M. and K. Kikuchi, *Chemical tools for probing histone deacetylase (HDAC) activity*. Anal Sci, 2015. **31**(4): p. 287-92.
187. Sharaf, R.R. and J.Z. Li, *The Alphabet Soup of HIV Reservoir Markers*. Curr HIV/AIDS Rep, 2017. **14**(2): p. 72-81.
188. Hindson, B.J., et al., *High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number*. Anal Chem, 2011. **83**(22): p. 8604-10.
189. Strain, M.C., et al., *Highly precise measurement of HIV DNA by droplet digital PCR*. PLoS One, 2013. **8**(4): p. e55943.
190. Bosman, K.J., et al., *Comparison of digital PCR platforms and semi-nested qPCR as a tool to determine the size of the HIV reservoir*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 13811.
191. Rouzioux, C. and D. Richman, *How to best measure HIV reservoirs?* Curr Opin HIV AIDS, 2013. **8**(3): p. 170-5.
192. Besson, G.J., et al., *HIV-1 DNA decay dynamics in blood during more than a decade of suppressive antiretroviral therapy*. Clin Infect Dis, 2014. **59**(9): p. 1312-21.
193. Koelsch, K.K., et al., *Dynamics of total, linear nonintegrated, and integrated HIV-1 DNA in vivo and in vitro*. J Infect Dis, 2008. **197**(3): p. 411-9.
194. Rozera, G., et al., *Comparison of real-time PCR methods for measurement of HIV-1 proviral DNA*. J Virol Methods, 2010. **164**(1-2): p. 135-8.
195. Williams, J.P., et al., *HIV-1 DNA predicts disease progression and post-treatment virological control*. Elife, 2014. **3**: p. e03821.
196. Yerly, S., et al., *Proviral HIV-DNA predicts viral rebound and viral setpoint after structured treatment interruptions*. AIDS, 2004. **18**(14): p. 1951-3.
197. Pace, M.J., E.H. Graf, and U. O'Doherty, *HIV 2-long terminal repeat circular DNA is stable in primary CD4+T Cells*. Virology, 2013. **441**(1): p. 18-21.
198. Sharkey, M., et al., *Episomal viral cDNAs identify a reservoir that fuels viral rebound after treatment interruption and that contributes to treatment failure*. PLoS Pathog, 2011. **7**(2): p. e1001303.
199. Bruner, K.M., et al., *A quantitative approach for measuring the reservoir of latent HIV-1 proviruses*. Nature, 2019. **566**(7742): p. 120-125.
200. Simonetti, F.R., et al., *Intact proviral DNA assay analysis of large cohorts of people with HIV provides a benchmark for the frequency and composition of persistent proviral DNA*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2020. **117**(31): p. 18692-18700.
201. Gaebler, C., et al., *Combination of quadruplex qPCR and next-generation sequencing for qualitative and quantitative analysis of the HIV-1 latent reservoir*. J Exp Med, 2019. **216**(10): p. 2253-2264.
202. Emery, A., et al., *Characterizing HIV-1 Splicing by Using Next-Generation Sequencing*. J Virol, 2017. **91**(6).
203. Pasternak, A.O., et al., *Highly sensitive methods based on seminested real-time reverse transcription-PCR for quantitation of human immunodeficiency virus type 1 unspliced and multiply spliced RNA and proviral DNA*. J Clin Microbiol, 2008. **46**(7): p. 2206-11.
204. Procopio, F.A., et al., *A Novel Assay to Measure the Magnitude of the Inducible Viral Reservoir in HIV-infected Individuals*. EBioMedicine, 2015. **2**(8): p. 874-83.

205. Chun, T.W., et al., *Relationship between residual plasma viremia and the size of HIV proviral DNA reservoirs in infected individuals receiving effective antiretroviral therapy*. J Infect Dis, 2011. **204**(1): p. 135-8.
206. Cillo, A.R., et al., *Improved single-copy assays for quantification of persistent HIV-1 viremia in patients on suppressive antiretroviral therapy*. J Clin Microbiol, 2014. **52**(11): p. 3944-51.
207. Tosiano, M.A., et al., *A Simpler and More Sensitive Single-Copy HIV-1 RNA Assay for Quantification of Persistent HIV-1 Viremia in Individuals on Suppressive Antiretroviral Therapy*. J Clin Microbiol, 2019. **57**(3).
208. Siliciano, J.D. and R.F. Siliciano, *Enhanced culture assay for detection and quantitation of latently infected, resting CD4+ T-cells carrying replication-competent virus in HIV-1-infected individuals*. Methods Mol Biol, 2005. **304**: p. 3-15.
209. Buzon, M.J., et al., *Long-term antiretroviral treatment initiated at primary HIV-1 infection affects the size, composition, and decay kinetics of the reservoir of HIV-1-infected CD4 T cells*. J Virol, 2014. **88**(17): p. 10056-65.
210. Ho, Y.C., et al., *Replication-competent noninduced proviruses in the latent reservoir increase barrier to HIV-1 cure*. Cell, 2013. **155**(3): p. 540-51.
211. Eriksson, S., et al., *Comparative analysis of measures of viral reservoirs in HIV-1 eradication studies*. PLoS Pathog, 2013. **9**(2): p. e1003174.
212. Rosenbloom, D.I.S., et al., *Assessing intra-lab precision and inter-lab repeatability of outgrowth assays of HIV-1 latent reservoir size*. PLoS Comput Biol, 2019. **15**(4): p. e1006849.
213. Pasternak, A.O. and B. Berkhout, *What do we measure when we measure cell-associated HIV RNA*. Retrovirology, 2018. **15**(1): p. 13.
214. Derdeyn, C.A., et al., *Evaluation of distinct blood lymphocyte populations in human immunodeficiency virus type 1-infected subjects in the absence or presence of effective therapy*. J Infect Dis, 1999. **180**(6): p. 1851-62.
215. Patterson, B.K., et al., *Detection of HIV-RNA-positive monocytes in peripheral blood of HIV-positive patients by simultaneous flow cytometric analysis of intracellular HIV RNA and cellular immunophenotype*. Cytometry, 1998. **31**(4): p. 265-74.
216. Martrus, G., et al., *Kinetics of HIV-1 Latency Reversal Quantified on the Single-Cell Level Using a Novel Flow-Based Technique*. J Virol, 2016. **90**(20): p. 9018-28.
217. Ko, A., et al., *Macrophages but not Astrocytes Harbor HIV DNA in the Brains of HIV-1-Infected Aviremic Individuals on Suppressive Antiretroviral Therapy*. J Neuroimmune Pharmacol, 2019. **14**(1): p. 110-119.
218. Deleage, C., et al., *Next-generation in situ hybridization approaches to define and quantify HIV and SIV reservoirs in tissue microenvironments*. Retrovirology, 2018. **15**(1): p. 4.
219. Grau-Exposito, J., et al., *A Novel Single-Cell FISH-Flow Assay Identifies Effector Memory CD4(+) T cells as a Major Niche for HIV-1 Transcription in HIV-Infected Patients*. mBio, 2017. **8**(4).
220. Cameron, P.U., et al., *Specificity of binding of HIV-1 anti-p24 antibodies to CD4+ lymphocytes from HIV-infected subjects*. Cytometry, 1998. **33**(1): p. 83-8.
221. Kux, A., et al., *Antibodies to p24 antigen do not specifically detect HIV-infected lymphocytes in AIDS patients*. J Immunol Methods, 1996. **191**(2): p. 179-86.
222. Pardons, M., et al., *Single-cell characterization and quantification of translation-competent viral reservoirs in treated and untreated HIV infection*. PLoS Pathog, 2019. **15**(2): p. e1007619.

223. Baxter, A.E., U. O'Doherty, and D.E. Kaufmann, *Beyond the replication-competent HIV reservoir: transcription and translation-competent reservoirs*. *Retrovirology*, 2018. **15**(1): p. 18.
224. Mogensen, T.H., et al., *Innate immune recognition and activation during HIV infection*. *Retrovirology*, 2010. **7**: p. 54.
225. Iwasaki, A., *Innate immune recognition of HIV-1*. *Immunity*, 2012. **37**(3): p. 389-98.
226. Pichlmair, A. and C. Reis e Sousa, *Innate recognition of viruses*. *Immunity*, 2007. **27**(3): p. 370-83.
227. Altfeld, M. and M. Gale, Jr., *Innate immunity against HIV-1 infection*. *Nat Immunol*, 2015. **16**(6): p. 554-62.
228. Kramer, H.B., et al., *Elevation of intact and proteolytic fragments of acute phase proteins constitutes the earliest systemic antiviral response in HIV-1 infection*. *PLoS Pathog*, 2010. **6**(5): p. e1000893.
229. Stacey, A.R., 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*. *J Virol*, 2009. **83**(8): p. 3719-33.
230. McMichael, A.J., et al., *The immune response during acute HIV-1 infection: clues for vaccine development*. *Nat Rev Immunol*, 2010. **10**(1): p. 11-23.
231. Schmitz, J.E., et al., *Effect of humoral immune responses on controlling viremia during primary infection of rhesus monkeys with simian immunodeficiency virus*. *J Virol*, 2003. **77**(3): p. 2165-73.
232. McMichael, A.J. and S.L. Rowland-Jones, *Cellular immune responses to HIV*. *Nature*, 2001. **410**(6831): p. 980-7.
233. Rosenberg, E.S., et al., *Immune control of HIV-1 after early treatment of acute infection*. *Nature*, 2000. **407**(6803): p. 523-6.
234. Walker, C.M., et al., *CD8+ lymphocytes can control HIV infection in vitro by suppressing virus replication*. *Science*, 1986. **234**(4783): p. 1563-6.
235. Miedema, F., *T cell dynamics and protective immunity in HIV infection: a brief history of ideas*. *Curr Opin HIV AIDS*, 2006. **1**(1): p. 1-2.
236. Saez-Cirion, A., et al., *HIV controllers exhibit potent CD8 T cell capacity to suppress HIV infection ex vivo and peculiar cytotoxic T lymphocyte activation phenotype*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. **104**(16): p. 6776-81.
237. Lichterfeld, M., et al., *HIV-1 Nef is preferentially recognized by CD8 T cells in primary HIV-1 infection despite a relatively high degree of genetic diversity*. *AIDS*, 2004. **18**(10): p. 1383-92.
238. Turnbull, E.L., et al., *Kinetics of expansion of epitope-specific T cell responses during primary HIV-1 infection*. *J Immunol*, 2009. **182**(11): p. 7131-45.
239. Cocchi, F., et al., *Identification of RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells*. *Science*, 1995. **270**(5243): p. 1811-5.
240. Brechley, J.M., et al., *CD4+ T cell depletion during all stages of HIV disease occurs predominantly in the gastrointestinal tract*. *J Exp Med*, 2004. **200**(6): p. 749-59.
241. Brechley, J.M. and D.C. Douek, *The mucosal barrier and immune activation in HIV pathogenesis*. *Curr Opin HIV AIDS*, 2008. **3**(3): p. 356-61.
242. Chakrabarti, L.A. and V. Simon, *Immune mechanisms of HIV control*. *Curr Opin Immunol*, 2010. **22**(4): p. 488-96.
243. Genovese, L., M. Nebuloni, and M. Alfano, *Cell-Mediated Immunity in Elite Controllers Naturally Controlling HIV Viral Load*. *Front Immunol*, 2013. **4**: p. 86.
244. Pereyra, F., et al., *Genetic and immunologic heterogeneity among persons who control HIV infection in the absence of therapy*. *J Infect Dis*, 2008. **197**(4): p. 563-71.

245. Deeks, S.G. and B.D. Walker, *Human immunodeficiency virus controllers: mechanisms of durable virus control in the absence of antiretroviral therapy*. *Immunity*, 2007. **27**(3): p. 406-16.
246. Migueles, S.A., et al., *HIV-specific CD8+ T cell proliferation is coupled to perforin expression and is maintained in nonprogressors*. *Nat Immunol*, 2002. **3**(11): p. 1061-8.
247. Wherry, E.J., et al., *Lineage relationship and protective immunity of memory CD8 T cell subsets*. *Nat Immunol*, 2003. **4**(3): p. 225-34.
248. Ferre, A.L., et al., *Mucosal immune responses to HIV-1 in elite controllers: a potential correlate of immune control*. *Blood*, 2009. **113**(17): p. 3978-89.
249. Jacobs, E.S., et al., *Cytokines Elevated in HIV Elite Controllers Reduce HIV Replication In Vitro and Modulate HIV Restriction Factor Expression*. *J Virol*, 2017. **91**(6).
250. Riveira-Munoz, E., et al., *Increased expression of SAMHD1 in a subset of HIV-1 elite controllers*. *J Antimicrob Chemother*, 2014. **69**(11): p. 3057-60.
251. Abdel-Mohsen, M., et al., *Expression profile of host restriction factors in HIV-1 elite controllers*. *Retrovirology*, 2013. **10**: p. 106.
252. International, H.I.V.C.S., et al., *The major genetic determinants of HIV-1 control affect HLA class I peptide presentation*. *Science*, 2010. **330**(6010): p. 1551-7.
253. Fellay, J., et al., *A whole-genome association study of major determinants for host control of HIV-1*. *Science*, 2007. **317**(5840): p. 944-7.
254. Altfeld, M., et al., *Influence of HLA-B57 on clinical presentation and viral control during acute HIV-1 infection*. *AIDS*, 2003. **17**(18): p. 2581-91.
255. Lecuroux, C., et al., *Both HLA-B*57 and plasma HIV RNA levels contribute to the HIV-specific CD8+ T cell response in HIV controllers*. *J Virol*, 2014. **88**(1): p. 176-87.
256. Hileman, C.O. and N.T. Funderburg, *Inflammation, Immune Activation, and Antiretroviral Therapy in HIV*. *Curr HIV/AIDS Rep*, 2017. **14**(3): p. 93-100.
257. Cillo, A.R. and J.W. Mellors, *Which therapeutic strategy will achieve a cure for HIV-1?* *Curr Opin Virol*, 2016. **18**: p. 14-9.
258. Allers, K., et al., *Evidence for the cure of HIV infection by CCR5Delta32/Delta32 stem cell transplantation*. *Blood*, 2011. **117**(10): p. 2791-9.
259. Hutter, G., et al., *Long-term control of HIV by CCR5 Delta32/Delta32 stem-cell transplantation*. *N Engl J Med*, 2009. **360**(7): p. 692-8.
260. Scarborough, R.J., R.P. Goguen, and A. Gatignol, *A second patient cured of HIV infection: hopes and limitations*. *Virologie (Montrouge)*, 2019. **23**(3): p. 1-4.
261. Salgado, M., et al., *Mechanisms That Contribute to a Profound Reduction of the HIV-1 Reservoir After Allogeneic Stem Cell Transplant*. *Ann Intern Med*, 2018. **169**(10): p. 674-683.
262. Gupta, R.K., et al., *Evidence for HIV-1 cure after CCR5Delta32/Delta32 allogeneic haemopoietic stem-cell transplantation 30 months post analytical treatment interruption: a case report*. *Lancet HIV*, 2020.
263. Pham, H.T. and T. Mesplede, *The latest evidence for possible HIV-1 curative strategies*. *Drugs Context*, 2018. **7**: p. 212522.
264. Hutter, G., *More on shift of HIV tropism in stem-cell transplantation with CCR5 delta32/delta32 mutation*. *N Engl J Med*, 2014. **371**(25): p. 2437-8.
265. Tebas, P., et al., *Gene editing of CCR5 in autologous CD4 T cells of persons infected with HIV*. *N Engl J Med*, 2014. **370**(10): p. 901-10.
266. Yu, S., et al., *Simultaneous Knockout of CXCR4 and CCR5 Genes in CD4+ T Cells via CRISPR/Cas9 Confers Resistance to Both X4- and R5-Tropic Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection*. *Hum Gene Ther*, 2018. **29**(1): p. 51-67.
267. Didigu, C.A., et al., *Simultaneous zinc-finger nuclease editing of the HIV coreceptors ccr5 and cxcr4 protects CD4+ T cells from HIV-1 infection*. *Blood*, 2014. **123**(1): p. 61-9.

268. Liao, H.K., et al., *Use of the CRISPR/Cas9 system as an intracellular defense against HIV-1 infection in human cells*. Nat Commun, 2015. **6**: p. 6413.
269. Kaminski, R., et al., *Elimination of HIV-1 Genomes from Human T-lymphoid Cells by CRISPR/Cas9 Gene Editing*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 22555.
270. Xu, W., et al., *Advancements in Developing Strategies for Sterilizing and Functional HIV Cures*. Biomed Res Int, 2017. **2017**: p. 6096134.
271. Persaud, D., et al., *Absence of detectable HIV-1 viremia after treatment cessation in an infant*. N Engl J Med, 2013. **369**(19): p. 1828-35.
272. Ananworanich, J. and M.L. Robb, *The transient HIV remission in the Mississippi baby: why is this good news?* J Int AIDS Soc, 2014. **17**: p. 19859.
273. Frange, P., et al., *HIV-1 virological remission lasting more than 12 years after interruption of early antiretroviral therapy in a perinatally infected teenager enrolled in the French ANRS EPF-CO10 paediatric cohort: a case report*. Lancet HIV, 2016. **3**(1): p. e49-54.
274. Violari, A., et al., *A child with perinatal HIV infection and long-term sustained virological control following antiretroviral treatment cessation*. Nat Commun, 2019. **10**(1): p. 412.
275. Hocqueloux, L., et al., *Long-term immunovirologic control following antiretroviral therapy interruption in patients treated at the time of primary HIV-1 infection*. AIDS, 2010. **24**(10): p. 1598-601.
276. Saez-Cirion, A., et al., *Post-treatment HIV-1 controllers with a long-term virological remission after the interruption of early initiated antiretroviral therapy ANRS VISCONTI Study*. PLoS Pathog, 2013. **9**(3): p. e1003211.
277. Cockerham, L.R., H. Hatano, and S.G. Deeks, *Post-Treatment Controllers: Role in HIV "Cure" Research*. Curr HIV/AIDS Rep, 2016. **13**(1): p. 1-9.
278. Salgado, M., et al., *Prolonged control of replication-competent dual- tropic human immunodeficiency virus-1 following cessation of highly active antiretroviral therapy*. Retrovirology, 2011. **8**: p. 97.
279. Lodi, S., et al., *Immunovirologic control 24 months after interruption of antiretroviral therapy initiated close to HIV seroconversion*. Arch Intern Med, 2012. **172**(16): p. 1252-5.
280. Stohr, W., et al., *Duration of HIV-1 viral suppression on cessation of antiretroviral therapy in primary infection correlates with time on therapy*. PLoS One, 2013. **8**(10): p. e78287.
281. Gandhi, R.T., et al., *The effect of raltegravir intensification on low-level residual viremia in HIV-infected patients on antiretroviral therapy: a randomized controlled trial*. PLoS Med, 2010. **7**(8).
282. Hatano, H., et al., *A randomized controlled trial assessing the effects of raltegravir intensification on endothelial function in treated HIV infection*. J Acquir Immune Defic Syndr, 2012. **61**(3): p. 317-25.
283. Gutierrez, C., et al., *Intensification of antiretroviral therapy with a CCR5 antagonist in patients with chronic HIV-1 infection: effect on T cells latently infected*. PLoS One, 2011. **6**(12): p. e27864.
284. Hunt, P.W., et al., *The immunologic effects of maraviroc intensification in treated HIV-infected individuals with incomplete CD4+ T-cell recovery: a randomized trial*. Blood, 2013. **121**(23): p. 4635-46.
285. Sayana, S., et al., *The use of darunavir/ritonavir as intensification in low viremic HIV-infected patients treated with boosted protease inhibitor-containing regimens*. J Int Assoc Physicians AIDS Care (Chic), 2009. **8**(1): p. 21-2.
286. Caskey, M., F. Klein, and M.C. Nussenzweig, *Broadly Neutralizing Antibodies for HIV-1 Prevention or Immunotherapy*. N Engl J Med, 2016. **375**(21): p. 2019-2021.

287. Gautam, R., et al., *A single injection of anti-HIV-1 antibodies protects against repeated SHIV challenges*. *Nature*, 2016. **533**(7601): p. 105-109.
288. Nishimura, Y., et al., *Early antibody therapy can induce long-lasting immunity to SHIV*. *Nature*, 2017. **543**(7646): p. 559-563.
289. Scheid, J.F., et al., *HIV-1 antibody 3BNC117 suppresses viral rebound in humans during treatment interruption*. *Nature*, 2016. **535**(7613): p. 556-60.
290. Mendoza, P., et al., *Combination therapy with anti-HIV-1 antibodies maintains viral suppression*. *Nature*, 2018. **561**(7724): p. 479-484.
291. Caskey, M., F. Klein, and M.C. Nussenzweig, *Broadly neutralizing anti-HIV-1 monoclonal antibodies in the clinic*. *Nat Med*, 2019. **25**(4): p. 547-553.
292. Haynes, B.F., D.R. Burton, and J.R. Mascola, *Multiple roles for HIV broadly neutralizing antibodies*. *Sci Transl Med*, 2019. **11**(516).
293. Deeks, S.G., *HIV: Shock and kill*. *Nature*, 2012. **487**(7408): p. 439-40.
294. Hill, A.L., et al., *Predicting the outcomes of treatment to eradicate the latent reservoir for HIV-1*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014. **111**(37): p. 13475-80.
295. Prins, J.M., et al., *Immuno-activation with anti-CD3 and recombinant human IL-2 in HIV-1-infected patients on potent antiretroviral therapy*. *AIDS*, 1999. **13**(17): p. 2405-10.
296. Archin, N.M., et al., *Administration of vorinostat disrupts HIV-1 latency in patients on antiretroviral therapy*. *Nature*, 2012. **487**(7408): p. 482-5.
297. Archin, N.M., et al., *Interval dosing with the HDAC inhibitor vorinostat effectively reverses HIV latency*. *J Clin Invest*, 2017. **127**(8): p. 3126-3135.
298. Elliott, J.H., et al., *Activation of HIV transcription with short-course vorinostat in HIV-infected patients on suppressive antiretroviral therapy*. *PLoS Pathog*, 2014. **10**(10): p. e1004473.
299. Wei, D.G., et al., *Histone deacetylase inhibitor romidepsin induces HIV expression in CD4 T cells from patients on suppressive antiretroviral therapy at concentrations achieved by clinical dosing*. *PLoS Pathog*, 2014. **10**(4): p. e1004071.
300. Sogaard, O.S., et al., *The Depsipeptide Romidepsin Reverses HIV-1 Latency In Vivo*. *PLoS Pathog*, 2015. **11**(9): p. e1005142.
301. Rasmussen, T.A., et al., *Panobinostat, a histone deacetylase inhibitor, for latent-virus reactivation in HIV-infected patients on suppressive antiretroviral therapy: a phase 1/2, single group, clinical trial*. *Lancet HIV*, 2014. **1**(1): p. e13-21.
302. Delagreverie, H.M., et al., *Ongoing Clinical Trials of Human Immunodeficiency Virus Latency-Reversing and Immunomodulatory Agents*. *Open Forum Infect Dis*, 2016. **3**(4): p. ofw189.
303. Sengupta, S. and R.F. Siliciano, *Targeting the Latent Reservoir for HIV-1*. *Immunity*, 2018. **48**(5): p. 872-895.
304. Laird, G.M., et al., *Ex vivo analysis identifies effective HIV-1 latency-reversing drug combinations*. *J Clin Invest*, 2015. **125**(5): p. 1901-12.
305. Darcis, G., et al., *An In-Depth Comparison of Latency-Reversing Agent Combinations in Various In Vitro and Ex Vivo HIV-1 Latency Models Identified Bryostatins-1+JQ1 and Ingenol-B+JQ1 to Potently Reactivate Viral Gene Expression*. *PLoS Pathog*, 2015. **11**(7): p. e1005063.
306. Jiang, G., et al., *Synergistic Reactivation of Latent HIV Expression by Ingenol-3-Angelate, PEP005, Targeted NF- κ B Signaling in Combination with JQ1 Induced p-TEFb Activation*. *PLoS Pathog*, 2015. **11**(7): p. e1005066.
307. Spivak, A.M. and V. Planelles, *Novel Latency Reversal Agents for HIV-1 Cure*. *Annu Rev Med*, 2018. **69**: p. 421-436.
308. Khaitan, A. and D. Unutmaz, *Revisiting immune exhaustion during HIV infection*. *Curr HIV/AIDS Rep*, 2011. **8**(1): p. 4-11.

309. Yamamoto, T., et al., *Surface expression patterns of negative regulatory molecules identify determinants of virus-specific CD8+ T-cell exhaustion in HIV infection*. *Blood*, 2011. **117**(18): p. 4805-15.
310. Ruiz, A., et al., *Antigen Production After Latency Reversal and Expression of Inhibitory Receptors in CD8+ T Cells Limit the Killing of HIV-1 Reactivated Cells*. *Front Immunol*, 2018. **9**: p. 3162.
311. Clutton, G.T. and R.B. Jones, *Diverse Impacts of HIV Latency-Reversing Agents on CD8+ T-Cell Function: Implications for HIV Cure*. *Front Immunol*, 2018. **9**: p. 1452.
312. Kwaa, A.K., et al., *The effect of Ingenol-B on the suppressive capacity of elite suppressor HIV-specific CD8+ T cells*. *PLoS One*, 2017. **12**(5): p. e0174516.
313. Garrido, C., et al., *HIV Latency-Reversing Agents Have Diverse Effects on Natural Killer Cell Function*. *Front Immunol*, 2016. **7**: p. 356.
314. Pace, M., et al., *Histone Deacetylase Inhibitors Enhance CD4 T Cell Susceptibility to NK Cell Killing but Reduce NK Cell Function*. *PLoS Pathog*, 2016. **12**(8): p. e1005782.
315. Walker-Sperling, V.E., et al., *The Effect of Latency Reversal Agents on Primary CD8+ T Cells: Implications for Shock and Kill Strategies for Human Immunodeficiency Virus Eradication*. *EBioMedicine*, 2016. **8**: p. 217-229.
316. Jones, R.B., et al., *Histone deacetylase inhibitors impair the elimination of HIV-infected cells by cytotoxic T-lymphocytes*. *PLoS Pathog*, 2014. **10**(8): p. e1004287.
317. Desimio, M.G., et al., *In Vitro Exposure to Prostratin but Not Bryostatins Improves Natural Killer Cell Functions Including Killing of CD4(+) T Cells Harboring Reactivated Human Immunodeficiency Virus*. *Front Immunol*, 2018. **9**: p. 1514.
318. Huang, S.H., et al., *Latent HIV reservoirs exhibit inherent resistance to elimination by CD8+ T cells*. *J Clin Invest*, 2018. **128**(2): p. 876-889.
319. Day, C.L., et al., *PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression*. *Nature*, 2006. **443**(7109): p. 350-4.
320. Porichis, F., et al., *Responsiveness of HIV-specific CD4 T cells to PD-1 blockade*. *Blood*, 2011. **118**(4): p. 965-74.
321. Trautmann, L., et al., *Upregulation of PD-1 expression on HIV-specific CD8+ T cells leads to reversible immune dysfunction*. *Nat Med*, 2006. **12**(10): p. 1198-202.
322. Fromentin, R., et al., *PD-1 blockade potentiates HIV latency reversal ex vivo in CD4(+) T cells from ART-suppressed individuals*. *Nat Commun*, 2019. **10**(1): p. 814.
323. Guihot, A., et al., *Drastic decrease of the HIV reservoir in a patient treated with nivolumab for lung cancer*. *Ann Oncol*, 2018. **29**(2): p. 517-518.
324. Scully, E.P., et al., *Inconsistent HIV reservoir dynamics and immune responses following anti-PD-1 therapy in cancer patients with HIV infection*. *Ann Oncol*, 2018. **29**(10): p. 2141-2142.
325. Kim, Y., J.L. Anderson, and S.R. Lewin, *Getting the "Kill" into "Shock and Kill": Strategies to Eliminate Latent HIV*. *Cell Host Microbe*, 2018. **23**(1): p. 14-26.
326. Bruner, K.M., N.N. Hosmane, and R.F. Siliciano, *Towards an HIV-1 cure: measuring the latent reservoir*. *Trends Microbiol*, 2015. **23**(4): p. 192-203.
327. Strongin, Z., et al., *Effect of Short-Term Antiretroviral Therapy Interruption on Levels of Integrated HIV DNA*. *J Virol*, 2018. **92**(12).
328. Rouzioux, C. and V. Avettand-Fenoel, *Total HIV DNA: a global marker of HIV persistence*. *Retrovirology*, 2018. **15**(1): p. 30.
329. Gupta, R.K., et al., *HIV-1 remission following CCR5Delta32/Delta32 haematopoietic stem-cell transplantation*. *Nature*, 2019. **568**(7751): p. 244-248.
330. Kiselinova, M., et al., *Integrated and Total HIV-1 DNA Predict Ex Vivo Viral Outgrowth*. *PLoS Pathog*, 2016. **12**(3): p. e1005472.

331. Avettand-Fenoel, V., et al., *Total HIV-1 DNA, a Marker of Viral Reservoir Dynamics with Clinical Implications*. Clin Microbiol Rev, 2016. **29**(4): p. 859-80.
332. Descours, B., et al., *CD32a is a marker of a CD4 T-cell HIV reservoir harbouring replication-competent proviruses*. Nature, 2017. **543**(7646): p. 564-567.
333. Bertagnolli, L.N., et al., *The role of CD32 during HIV-1 infection*. Nature, 2018. **561**(7723): p. E17-E19.
334. Badia, R., et al., *CD32 expression is associated to T-cell activation and is not a marker of the HIV-1 reservoir*. Nat Commun, 2018. **9**(1): p. 2739.
335. Baxter, A.E., et al., *Single-Cell Characterization of Viral Translation-Competent Reservoirs in HIV-Infected Individuals*. Cell Host Microbe, 2016. **20**(3): p. 368-380.
336. Hiener, B., et al., *Identification of Genetically Intact HIV-1 Proviruses in Specific CD4(+) T Cells from Effectively Treated Participants*. Cell Rep, 2017. **21**(3): p. 813-822.
337. Baxter, A.E., et al., *Multiparametric characterization of rare HIV-infected cells using an RNA-flow FISH technique*. Nat Protoc, 2017. **12**(10): p. 2029-2049.
338. Haase, A.T., et al., *Quantitative image analysis of HIV-1 infection in lymphoid tissue*. Science, 1996. **274**(5289): p. 985-9.
339. Fischer, M., et al., *Biphasic decay kinetics suggest progressive slowing in turnover of latently HIV-1 infected cells during antiretroviral therapy*. Retrovirology, 2008. **5**: p. 107.
340. Abner, E. and A. Jordan, *HIV "shock and kill" therapy: In need of revision*. Antiviral Res, 2019. **166**: p. 19-34.
341. Spivak, A.M., et al., *A pilot study assessing the safety and latency-reversing activity of disulfiram in HIV-1-infected adults on antiretroviral therapy*. Clin Infect Dis, 2014. **58**(6): p. 883-90.
342. Gutierrez, C., et al., *Bryostatatin-1 for latent virus reactivation in HIV-infected patients on antiretroviral therapy*. AIDS, 2016. **30**(9): p. 1385-92.
343. Martinez-Bonet, M., et al., *Synergistic Activation of Latent HIV-1 Expression by Novel Histone Deacetylase Inhibitors and Bryostatatin-1*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 16445.
344. Spina, C.A., et al., *An in-depth comparison of latent HIV-1 reactivation in multiple cell model systems and resting CD4+ T cells from aviremic patients*. PLoS Pathog, 2013. **9**(12): p. e1003834.
345. Jiang, G., et al., *Reactivation of HIV latency by a newly modified Ingenol derivative via protein kinase Cdelta-NF-kappaB signaling*. AIDS, 2014. **28**(11): p. 1555-66.
346. Pandelo Jose, D., et al., *Reactivation of latent HIV-1 by new semi-synthetic ingenol esters*. Virology, 2014. **462-463**: p. 328-39.
347. Pardons, M., et al., *Latency-Reversing Agents Induce Differential Responses in Distinct Memory CD4 T Cell Subsets in Individuals on Antiretroviral Therapy*. Cell Rep, 2019. **29**(9): p. 2783-2795 e5.
348. Mann, J.F.S., et al., *A targeted reactivation of latent HIV-1 using an activator vector in patient samples from acute infection*. EBioMedicine, 2020: p. 102853.
349. Bullen, C.K., et al., *New ex vivo approaches distinguish effective and ineffective single agents for reversing HIV-1 latency in vivo*. Nat Med, 2014. **20**(4): p. 425-9.
350. Battivelli, E., et al., *Distinct chromatin functional states correlate with HIV latency reactivation in infected primary CD4(+) T cells*. Elife, 2018. **7**.
351. Cillo, A.R., et al., *Quantification of HIV-1 latency reversal in resting CD4+ T cells from patients on suppressive antiretroviral therapy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(19): p. 7078-83.
352. Banga, R., et al., *In Vitro Reactivation of Replication-Competent and Infectious HIV-1 by Histone Deacetylase Inhibitors*. J Virol, 2016. **90**(4): p. 1858-71.
353. Imamichi, H., et al., *Defective HIV-1 proviruses produce viral proteins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2020. **117**(7): p. 3704-3710.

354. Pollack, R.A., et al., *Defective HIV-1 Proviruses Are Expressed and Can Be Recognized by Cytotoxic T Lymphocytes, which Shape the Proviral Landscape*. *Cell Host Microbe*, 2017. **21**(4): p. 494-506 e4.
355. Grau-Exposito, J., et al., *Latency reversal agents affect differently the latent reservoir present in distinct CD4+ T subpopulations*. *PLoS Pathog*, 2019. **15**(8): p. e1007991.
356. Durek, P., et al., *Epigenomic Profiling of Human CD4(+) T Cells Supports a Linear Differentiation Model and Highlights Molecular Regulators of Memory Development*. *Immunity*, 2016. **45**(5): p. 1148-1161.
357. Zerbato, J.M., et al., *Naive CD4+ T Cells Harbor a Large Inducible Reservoir of Latent, Replication-competent Human Immunodeficiency Virus Type 1*. *Clin Infect Dis*, 2019. **69**(11): p. 1919-1925.
358. Venanzi Rullo, E., et al., *Genetic Evidence That Naive T Cells Can Contribute Significantly to the Human Immunodeficiency Virus Intact Reservoir: Time to Re-evaluate Their Role*. *Clin Infect Dis*, 2019. **69**(12): p. 2236-2237.
359. Larragoite, E.T., et al., *Histone deacetylase inhibition reduces deleterious cytokine release induced by ingenol stimulation*. *bioRxiv*, 2017: p. 193946.
360. Soriano-Sarabia, N., et al., *Quantitation of replication-competent HIV-1 in populations of resting CD4+ T cells*. *J Virol*, 2014. **88**(24): p. 14070-7.
361. Barski, A., et al., *Rapid Recall Ability of Memory T cells is Encoded in their Epigenome*. *Sci Rep*, 2017. **7**: p. 39785.
362. Okada, R., et al., *Phenotypic classification of human CD4+ T cell subsets and their differentiation*. *Int Immunol*, 2008. **20**(9): p. 1189-99.
363. Kazmierski, J., et al., *Single Cell RNA-Sequencing-based Analysis of CD4⁺ T-Cell Subset-Specific Susceptibility to Transcriptional Modulation by HIV-1 Latency-Reversing Agents*. *bioRxiv*, 2020: p. 2020.05.04.075119.
364. Kwon, K.J., et al., *Different human resting memory CD4(+) T cell subsets show similar low inducibility of latent HIV-1 proviruses*. *Sci Transl Med*, 2020. **12**(528).
365. German, J.B. and C.J. Dillard, *Saturated fats: a perspective from lactation and milk composition*. *Lipids*, 2010. **45**(10): p. 915-23.
366. Lima, R.d.S. and J.M. Block, *Coconut oil: what do we really know about it so far?* *Food Quality and Safety*, 2019. **3**(2): p. 61-72.
367. Boateng, L., et al., *Coconut oil and palm oil's role in nutrition, health and national development: A review*. *Ghana Med J*, 2016. **50**(3): p. 189-196.
368. Lieberman, S., M. Enig, and H.G. Preuss, *A Review of Monolaurin and Lauric Acid: Natural Virucidal and Bactericidal Agents*. *Alternative and Complementary Therapies*, 2006. **12**: p. 310-314.
369. Matsue, M., et al., *Measuring the Antimicrobial Activity of Lauric Acid against Various Bacteria in Human Gut Microbiota Using a New Method*. *Cell Transplant*, 2019. **28**(12): p. 1528-1541.
370. Lindeberg, S. and B. Lundh, *Apparent absence of stroke and ischaemic heart disease in a traditional Melanesian island: a clinical study in Kitava*. *J Intern Med*, 1993. **233**(3): p. 269-75.
371. Lipoeto, N.I., et al., *Dietary intake and the risk of coronary heart disease among the coconut-consuming Minangkabau in West Sumatra, Indonesia*. *Asia Pac J Clin Nutr*, 2004. **13**(4): p. 377-84.
372. Kumar, P.D., *The role of coconut and coconut oil in coronary heart disease in Kerala, south India*. *Trop Doct*, 1997. **27**(4): p. 215-7.
373. Clegg, M.E., *They say coconut oil can aid weight loss, but can it really?* *European Journal of Clinical Nutrition*, 2017. **71**(10): p. 1139-1143.

374. Turner, N., et al., *Enhancement of muscle mitochondrial oxidative capacity and alterations in insulin action are lipid species dependent: potent tissue-specific effects of medium-chain fatty acids*. Diabetes, 2009. **58**(11): p. 2547-54.
375. Newport, M.T., et al., *A new way to produce hyperketonemia: use of ketone ester in a case of Alzheimer's disease*. Alzheimers Dement, 2015. **11**(1): p. 99-103.
376. Pan, Y., et al., *Dietary supplementation with medium-chain TAG has long-lasting cognition-enhancing effects in aged dogs*. Br J Nutr, 2010. **103**(12): p. 1746-54.
377. Temme, E.H., R.P. Mensink, and G. Hornstra, *Comparison of the effects of diets enriched in lauric, palmitic, or oleic acids on serum lipids and lipoproteins in healthy women and men*. Am J Clin Nutr, 1996. **63**(6): p. 897-903.
378. McCarty, M.F. and J.J. DiNicolantonio, *Lauric acid-rich medium-chain triglycerides can substitute for other oils in cooking applications and may have limited pathogenicity*. Open Heart, 2016. **3**(2): p. e000467.
379. Alicja Mortensen, F.A., Riccardo Crebelli, Alessandro Di Domenico,, et al., *Re-evaluation of fatty acids (E 570) as a food additive*. EFSA Journal, 2017. **15**(5): p. 4785.
380. Lee, J.Y., et al., *Reciprocal modulation of Toll-like receptor-4 signaling pathways involving MyD88 and phosphatidylinositol 3-kinase/AKT by saturated and polyunsaturated fatty acids*. J Biol Chem, 2003. **278**(39): p. 37041-51.
381. Lee, J.Y., et al., *Saturated fatty acids, but not unsaturated fatty acids, induce the expression of cyclooxygenase-2 mediated through Toll-like receptor 4*. J Biol Chem, 2001. **276**(20): p. 16683-9.
382. Hwang, D.H., J.A. Kim, and J.Y. Lee, *Mechanisms for the activation of Toll-like receptor 2/4 by saturated fatty acids and inhibition by docosahexaenoic acid*. Eur J Pharmacol, 2016. **785**: p. 24-35.
383. Komai-Koma, M., et al., *TLR2 is expressed on activated T cells as a costimulatory receptor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(9): p. 3029-34.
384. Arenzana-Seisdedos, F., et al., *Phosphatidylcholine hydrolysis activates NF-kappa B and increases human immunodeficiency virus replication in human monocytes and T lymphocytes*. J Virol, 1993. **67**(11): p. 6596-604.
385. Garcia-Vidal, E., et al., *Evaluation of the Innate Immune Modulator Acitretin as a Strategy To Clear the HIV Reservoir*. Antimicrob Agents Chemother, 2017. **61**(11).
386. Li, P., et al., *Stimulating the RIG-I pathway to kill cells in the latent HIV reservoir following viral reactivation*. Nat Med, 2016. **22**(7): p. 807-11.
387. Passaes, C.P.B., et al., *Ultrasensitive HIV-1 p24 Assay Detects Single Infected Cells and Differences in Reservoir Induction by Latency Reversal Agents*. J Virol, 2017. **91**(6).
388. Freeman, G.J., et al., *Reinvigorating exhausted HIV-specific T cells via PD-1-PD-1 ligand blockade*. J Exp Med, 2006. **203**(10): p. 2223-7.
389. Cao, W., et al., *Elevation and persistence of CD8 T-cells in HIV infection: the Achilles heel in the ART era*. J Int AIDS Soc, 2016. **19**(1): p. 20697.
390. Kulkarni, M.M., et al., *Cellular fatty acid synthase is required for late stages of HIV-1 replication*. Retrovirology, 2017. **14**(1): p. 45.
391. Angela, M., et al., *Fatty acid metabolic reprogramming via mTOR-mediated inductions of PPARgamma directs early activation of T cells*. Nat Commun, 2016. **7**: p. 13683.
392. Tarancon-Diez, L., et al., *Immunometabolism is a key factor for the persistent spontaneous elite control of HIV-1 infection*. EBioMedicine, 2019. **42**: p. 86-96.
393. Saez-Cirion, A. and I. Sereti, *Immunometabolism and HIV-1 pathogenesis: food for thought*. Nat Rev Immunol, 2020.
394. Widjaja, C.E., et al., *Proteasome activity regulates CD8+ T lymphocyte metabolism and fate specification*. J Clin Invest, 2017. **127**(10): p. 3609-3623.

VIII. ANNEX

Assaig	Què detecta	Mètode de detecció	Avantatges	Desavantatges
ADN proviral total	ADN proviral total. Inclou virus competents per la replicació, defectius i formes no integrades.	qPCR o ddPCR	Tècnica ràpida, fàcil, sensible i econòmica. Aplicable a diferents tipus cel·lulars.	Gran sobreestimació de la mida del reservori latent. Manca de mesura del reservori competent per la transcripció, traducció i replicació.
Formes circulars d'ADN	Formes d'ADN circulars (2-LTR)	qPCR o ddPCR	Usada per mesurar producció recent de nous virus infecciosos.	No detecta formes integrades del virus que són les úniques que poden contribuir a la latència.
ADN proviral integrat (Alu-PCR)	ADN proviral integrat	PCR + qPCR	Mesura més apropiada per quantificar el reservori en aquells pacients sense TAR, en la que la quantificació de l'ADN total no és fiable doncs hi ha un elevat nombre de formes no integrades que són detectades.	No detecta i amplifica correctament aquells provirus integrats en regions molt llunyanes a la seqüència Alu. Detecta virus defectius i, per tant, no mesura el reservori competent per la replicació.
Intact proviral DNA assay (IPDA)	Freqüència de cèl·lules que contenen provirus intactes i defectius	ddPCR	Elimina el 97% dels provirus defectius; sobreestima la mida del reservori latent només 1,5 vegades; més senzill, ràpid i amb menor cost que el QVOA tradicional.	Amplificació impedita pels polimorfismes en alguns pacients; requeriment de primers o sondes alternatives; incapacitat per mesurar la inductibilitat dels provirus.
Quadruplex qPCR and next-generation sequencing (Q4PCR)	Freqüència de cèl·lules que contenen provirus intactes i defectius, confirmat per seqüenciació	qPCR	Permet estimar els nivells de virus competents per la replicació; resultats verificats per seqüenciació; sensibilitat	Menys rendiment i més laboriós i costós que el IPDA. No permet quantificació absoluta ni mesura de la inductibilitat dels provirus.
Tat/rev Induced Limiting Dilution Assay (TILDA)	Cèl·lules que contenen l'ARN <i>multi-pliced</i> Tat/Rev i que poden ser induïts amb una ronda d'estimulació	RT-qPCR o ddPCR	Major simplicitat i rapidesa que el QVOA; requereix de menys cèl·lules que el QVOA; útil en la mesura de la resposta als LRAs <i>ex vivo</i> . Mesura del reservori competent per la transcripció.	Tècnica laboriosa a excepció que estigui automatitzat (2-7 dies de cultiu); no distingeix entre virus defectius i competents per la replicació.

Taula 3. Resum de les tècniques de quantificació de reservori. S'inclou el nom de l'assaig, el mètode de detecció i els avantatges i desavantatges.

<i>Cell-associated RNA (CA-RNA)</i>	ARN <i>unspliced</i> or <i>multi-spliced</i>	<i>Seminested</i> qPCR o ddPCR	Fàcil, ràpida i econòmica. Permet mesurar diferents transcrits virals per determinar l'activitat transcripcional; mesura usada per predir el temps de rebot al aturar el tractament.	Sobreestimació de la mida del reservori (detecció d'ARN truncats o defectius que mai es traduiran a proteïna). No detecta virus competents per la replicació.
<i>Single Copy Assay (SCA)</i>	ARN residual en plasma	RT-PCR	Mesura de la producció de partícules virals alliberades en un context amb TAR.	Requeriment d'elevats volums de plasma o fluids corporals; no és una mesura directa del reservori; relació poc clara entre el reservori viral i la baixa virèmia durant la TAR.
<i>Quantitative viral outgrowth assay (QVOA)</i>	Cèl·lules que contenen virus del VIH competents per la replicació	Luminescència, ELISA p24 o RT-PCR	Permet mesurar la mida del reservori competent per la replicació	Subestima la mida del reservori. Requereix de moltes cèl·lules i és laboriós i costós.
Quantificació de p24 associat a cèl·lules	Proteïna viral P24 en sobrenedant en presència o absència d'estimulació	P24 ELISA, SIMOA	Sensible, senzilla, ràpida i econòmica; requeriment de poques cèl·lules; aplicable en diferents tipus de mostra; mesura del reservori actiu i induïble; més proper a mesurar la competència de replicació que la mesura de transcrits del VIH.	Sobreestimació de la mida del reservori degut a la detecció de provirus competents per la traducció enloc del virus competent per la replicació.
Anàlisi a nivell de cèl·lules individuals (RNA/FISH flow or HIV-flow)	Freqüència de cèl·lules que produeixen transcrits virals o proteïna p24 a nivell individual	Citometria	Avaluació de la transcripció i/o traducció del VIH a nivell de cèl·lules individuals. Bona relació cost-efectivitat. Mesura del reservori competent per la transcripció.	Manca de mesura virus competents per la replicació.
Tècniques basades en la hibridació <i>in situ</i> (RNA/DNA Scope)	Localització cel·lular i nivells de VIH associats amb la integració (ADN) o transcripció (ARN).	Microscopia	Visualització i caracterització fenotípica de cèl·lules infectades en teixits; millor comprensió de la distribució anatòmica de cèl·lules infectades <i>in vivo</i> ; sensibilitat propera a la RT-qPCR	No permet distinció entre virus defectius i competents per la replicació. No mesura reservori competent per la replicació.

Taula 3 (continuació). Resum de les tècniques de quantificació de reservori. S'inclou el nom de l'assaig, el mètode de detecció i els avantatges i desavantatges.

IX. LLISTAT DE PUBLICACIONS

Llistat de publicacions durant la tesi doctoral

Cantero-Pérez J*, **Grau-Expósito J***, Serra-Peinado C, et al. Resident memory T cells are a cellular reservoir for HIV in the cervical mucosa. *Nat Commun.* 2019;10(1):4739. Published 2019 Oct 18. doi:10.1038/s41467-019-12732-2.

Grau-Expósito J, Luque-Ballesteros L, Navarro J, et al. Latency reversal agents affect differently the latent reservoir present in distinct CD4⁺ T subpopulations. *PLoS Pathog.* 2019;15(8):e1007991. Published 2019 Aug 19. doi:10.1371/journal.ppat.1007991.

Serra-Peinado C, **Grau-Expósito J**, Luque-Ballesteros L, et al. Expression of CD20 after viral reactivation renders HIV-reservoir cells susceptible to Rituximab. *Nat Commun.* 2019;10(1):3705. Published 2019 Aug 16. doi:10.1038/s41467-019-11556-4.

Abdel-Mohsen M*, Kuri-Cervantes L*, **Grau-Expósito J***, et al. CD32 is expressed on cells with transcriptionally active HIV but does not enrich for HIV DNA in resting T cells. *Sci Transl Med.* 2018;10(437):eaar6759. doi:10.1126/scitranslmed.aar6759.

Grau-Expósito J, Serra-Peinado C, Miguel L, et al. A Novel Single-Cell FISH-Flow Assay Identifies Effector Memory CD4⁺ T cells as a Major Niche for HIV-1 Transcription in HIV-Infected Patients. *mBio.* 2017;8(4):e00876-17. Published 2017 Jul 11. doi:10.1128/mBio.00876-17.

Vibholm, L., Schleimann, M.H., Højen, J.F., Benfield, T., Offersen, R., Rasmussen, K., Olesen, R., Dige, A., Agnholt, J., **Grau, J.**, Buzon, M., Wittig, B., Lichterfeld, M., Petersen, A.M., Deng, X., Abdel-Mohsen, M., Pillai, S.K., Rutsaert, S., Trypsteen, W., De Spiegelaere, W., ... Søggaard, O.S. Short-Course Toll-Like Receptor 9 Agonist Treatment Impacts Innate Immunity and Plasma Viremia in Individuals With Human Immunodeficiency Virus Infection. *Clin Infect Dis.* 2017;64(12):1686-1695. doi:10.1093/cid/cix201

