



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>



DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y
BIOLOGÍA MOLECULAR
FACULTAD DE BIOCENCIAS

PAPEL DE LAS CÉLULAS NATURAL KILLER EN LA ELIMINACIÓN DE LOS RESERVORIOS CELULARES DEL VIH Y USO DE LA NANOTECNOLOGÍA PARA POTENCIAR SU FUNCIÓN

Tesis presentada por Antonio Astorga Gamaza para optar al título de
Doctor en Bioquímica, Biología Molecular y Biomedicina por la Universidad
Autónoma de Barcelona

María José Buzón
Directora

Anna Meseguer
Tutora

Antonio Astorga Gamaza
Doctorando

Barcelona, Septiembre de 2021

Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades (Proyecto SAF2015-67334-R y RTI 2018-101082-B-100) (Contrato BES-2016-076382).

AGRADECIMIENTOS

Pensaba que comenzar a escribir este apartado me costaría bastante más. Sin embargo, de primeras me han venido a la cabeza un montón de recuerdos de mi llegada a Barcelona, y no he podido evitar que me salga una sonrisa. Pero no os penséis que todo fueron risas, no me olvido de aquel *tic* tan fuerte en el ojo al recién llegar que me duró unos 9 días, supongo que del estrés de no conocer a nadie y tener que moverme por sitios desconocidos. Sin embargo, el cambio me ha servido para crecer en muchos aspectos durante estos años, y distintas personas a las que quiero agradecer en estas páginas, me han acompañado en el proceso.

Todo comenzó cuando decidí venir a estudiar un máster a la Universidad Autónoma de Barcelona. De aquel año, sobre todo quiero agradecerles su apoyo a Yolanda y a Loren. Loren nos dio grandes momentos en el piso, incluidas situaciones un tanto surrealistas. Yolanda se convirtió en un gran pilar para mí, y me dio mucha pena cuando se fue de Barcelona para hacer un doctorado en Galicia. Espero que no hayas encontrado un compañero mejor para ver *Saber y Ganar*, y que yo ocupe ese hueco siempre. No me olvido de los ratitos tan divertidos durante el Máster con Xavi, Alex y Miriam, ni de las tantas veces que al principio le pedíais a los profes que hablaran castellano para que yo lo entendiera todo un poco mejor jajaja.

Terminó el máster y vi por internet una oferta de trabajo para hacer el doctorado en Vall d'Hebron a cargo de la Dra. María José Buzón, a la cual decidí presentarme. De aquella entrevista recuerdo que me hizo leer un texto en inglés en el que aparecía en múltiples ocasiones el siguiente palabra: *myeloid-derived suppressor cells*. No lo debí hacer tan mal, me seleccionó y a los pocos meses comencé mi doctorado.

A María José le agradezco enormemente haberme dado esta oportunidad y adentrarme en el mundo de la investigación. Gracias por dar cabida a nuestras propuestas e ideas, dejarnos participar en todos los congresos, y enseñarnos lo bueno y lo malo de dedicarse a esto; así como tus consejos para intentar continuar con la carrera investigadora, que no es fácil en España. Estoy seguro que algunas de las cosas que he podido ver en ti, como disfrutar del trabajo, intentar buscar una solución a todo y tener los objetivos claros, me serán de ayuda para mi futuro, sea el que sea. Gracias por todo.

Ha sido guay ver cómo ha ido creciendo el grupo y pasar tantas horas juntos, con agobio incluido a veces. Os agradezco haberme acompañado en este camino, los momentos musicales en la sala de cultivos, las comidas, congresos, etc. A Judith, que ha estado desde un principio. Contigo lo he compartido todo desde los inicios, hasta las comisiones de seguimiento. He ido siguiendo tus pasos y te agradezco todo lo que he aprendido de ti. Alguna que otra vez con discusiones en el camino, también hay que decirlo jajaja. Te agradezco también haber estado conmigo cuando lo he necesitado, como cuando cogí el maldito coronavirus y fui más amarillo que un Simpson al hospital. *Et trobaré a faltar*. A Laura, que se incorporó al grupo meses después y compartimos momentos divertidos de despacho, en el nitrógeno líquido, sobre todo cuando íbamos a la “hora tonta” y no sabíamos de qué nos reíamos, o los momentos de risa cuando hacías un mix de catalán-castellano. A Txell, que con su incorporación trajo alegría al laboratorio, y regalitos como Jon. Gracias Txell por aportar siempre tu granito de arena y experiencia para que mejoremos nuestros trabajos, y las revisiones de los artículos, aunque a veces entren ganas de estamparse

contra la pared. A Jon, fue un placer compartir contigo durante un tiempo el trabajo en el laboratorio, congresos, y charlas de gym. A Núria, la incorporación del equipo MIM con la que he compartido digestiones de recto, vídeos sobre el cortejo de los pájaros, ratitos fuera del lab a los que siempre te apuntas, y momentos de risa mezclados con llanto, esa habilidad que tienes para combinar ambos. A Nerea, por compartir afición por la comida, procesar muestras de pacientes COVID conmigo durante el confinamiento mientras escuchábamos “safaera” de Bad Bunny, y por lo bien que me lo he pasado dándote esos sustos que a veces te cabreaban. Tu llegada aportó aire fresco al lab, y junto con Ana y Joan formáis un trío genial, siempre dispuestos a gastar alguna que otra broma. A David y Marina, los pequeñines del laboratorio, por convertirlos pronto en uno más y compartir tantas anécdotas y momentos buenos con nosotros. A Sebas, el último integrante del grupo, por alegrarnos los ratos con tus historias y estar siempre dispuesto a hacer planes fuera del lab. A Maite y Paula, por compartir con nosotros muchos de esos momentos. Especialmente a Maite, quién ha estado prácticamente desde el principio. Ha sido una suerte coincidir en el mismo espacio a pesar de pertenecer a grupos distintos y poder conocerte. Muchos ánimos en la recta final de tu tesis. A todo el grupo de VIH del Hospital Vall d’Hebron, especialmente a Vicenç, por su cercanía, atención y buen trato cuando lo he necesitado. A Ari y a Bibi, por estar siempre dispuestas a ayudar y colaborar con nosotros. A Víctor Puentes y su equipo, especialmente Michele, por adentrarme en el mundo de las nanopartículas.

A mis amigos. En especial a mi camarote infalible, Laura, Joaquín y Rubén, con quienes he podido compartir experiencias y sensaciones relativas al doctorado. Ha sido un orgullo ver como algunos ya lo habéis conseguido. Gracias por hacer un hueco para vernos cada vez que se planteaba la mínima oportunidad, con la dificultad que tenía estar cada uno en un lugar distinto, por compartir viajes y por ser tan auténticos. Estoy deseando que llegue el próximo viaje juntos.

Y por último, pero no menos importante, se lo agradezco todo a mi familia, en especial a mis padres y a mi tía, por el cariño incondicional y contar los días que faltan para que llegue a casa cuando me cojo las vacaciones. Esa sensación de volver a casa es única, y la alegría que siento cuando me bajo del avión o del tren ya en Jerez. A mis padres, por cuidarme, y por las infinitas croquetas que me alegran la vida. A mi tía, la mayor de mis suertes y la persona más especial que conozco. También a mis hermanos, no sería lo mismo sin ellos. A Rosa, por los momentos compartidos contigo y con Ale. No me puedo olvidar de mi perro y fiel amigo Eric, una de las principales razones para siempre tener ganas de volver.

A todos vosotros, muchísimas gracias.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
I. INTRODUCCIÓN	4
1. INFECCIÓN POR EL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA	5
1.1. Inicios de la enfermedad por el VIH	5
1.2. Situación actual de la pandemia por el VIH	5
1.3. Biología del virus VIH	6
1.4. Genoma y estructura del virus	7
1.5. Ciclo de replicación del VIH	8
2. PATOGÉNESIS DE LA INFECCIÓN POR EL VIH	10
2.1. Primoinfección o fase aguda.....	11
2.2. Fase Asintomática	12
2.3. Fase SIDA.....	13
3. RESPUESTAS INMUNES FRENTE A LA INFECCIÓN POR VIH	13
3.1. Inmunidad innata	13
3.2. Inmunidad adaptativa.....	14
4. TERAPIA ANTIRETROVIRAL	15
5. RESERVORIOS Y PERSISTENCIA DEL VIH	16
5.1. Métodos para cuantificar el reservorio.....	17
5.2. Reservorios celulares del VIH.....	18
5.2.1. Células T CD4 ⁺ de memoria	18
5.2.2. Poblaciones celulares T CD4 ⁺ clasificadas acorde a su función	19
5.2.3. Células T CD4 ⁺ Naive	20
5.2.4. Otros reservorios celulares	20
5.3. Reservorios anatómicos del VIH	20
5.4. Marcadores del reservorio	22
5.5. Generación de células reservorio latentes.....	23
5.5.1. Latencia post-activación	23
5.5.2. Latencia pre-activación	23
5.5.3. Mecanismos implicados en la latencia	24
5.6. Reservorios activos del VIH	24
5.7. Mecanismos de persistencia del reservorio.....	25
5.8. Reversión de la latencia	27
5.9. Retos en la erradicación de los reservorios	28

6. CÉLULAS NATURAL KILLER	29
6.1. Descripción.....	29
6.2. Receptores de las células NK.....	31
6.3. Activación y mecanismos efectores de células NK	33
6.4. Células NK en la infección por VIH	35
6.5. Células NK: potenciales aliados en la lucha contra los reservorios del VIH	35
II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	40
III. RESULTADOS	43
CAPÍTULO 1.....	44
CAPÍTULO 2.....	83
IV. DISCUSIÓN	119
V. CONCLUSIONES	129
VI. BIBLIOGRAFÍA	131
VII. LISTA DE PUBLICACIONES	163

ABREVIATURAS

Lista de abreviaturas más utilizadas en la tesis

ADCC: citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo

ADN: ácido desoxirribonucleico

ARN: ácido ribonucleico

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

CA: cápside

CCR5: *C-C chemokine receptor type 5*

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

CD: célula dendrítica

ddPCR: *droplet digital PCR*

EC: *elite controller*

Env: *envelope*

FDA: *US food and drug administration*

FISH: *Fluorescence in Situ Hybridization*

GALT: *gut-associated lymphoid tissue*

IL: *interleukin*

IN: integrasa

IPDA: *intact Proviral DNA Assay*

ITIAN: inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos

ITINAN: inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleósidos

LRA: *latency reversal agent*

LTR: *long terminal repeat*

MA: matriz

NC: nucleocápside

NC: *natural cytotoxicity*

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

NK: *natural killer*

PBMC: *peripheral blood mononuclear cells*

PAMP: *pathogen-associated molecular patterns*

PCR: *polymerase chain reaction*

PMA: *phorbol 12-myristate 13-acetate*

PRR: *pattern recognition receptors*

QVOA: *quantitative Viral Outgrowth Assay*

RT: *reverse transcriptase*

SIDA: *síndrome de la inmunodeficiencia adquirida*

TAR: *tratamiento antirretroviral*

T_{CD32}^{dim}: *CD32-expressing cell*

T_{CD20}^{dim}: *CD20-expressing T cell*

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 inmunodeficiencia humana*

I. INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. INFECCIÓN POR EL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA

El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) pertenece a la familia de los retrovirus, específicamente al género lentivirus. En ausencia de tratamiento, conduce al desarrollo de una enfermedad conocida como Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA).

1.1. Inicios de la enfermedad por el VIH

Cuarenta años han transcurrido desde la notificación de los primeros casos de inmunodeficiencia vinculados a la infección, por el aquel entonces desconocido, virus VIH. Un largo recorrido que ha traído consigo grandes avances científicos en el tratamiento y abordaje de la enfermedad, que a día de hoy constituye una patología crónica.

Fue en 1981 cuando la organización estadounidense encargada de la vigilancia y prevención de enfermedades (CDC) informó de casos de neumonía, Sarcoma de Kaposi y otras enfermedades oportunistas entre jóvenes homosexuales [1, 2]. Meses más tarde se reportaron nuevos casos, esta vez también en personas que consumían drogas inyectables o que recibían transfusiones de sangre debido a enfermedades como la hemofilia. Así quedaban documentadas las primeras manifestaciones de lo que luego se acuñaría como Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida o SIDA. Consecuentemente se empezó a sospechar que el agente causal de la enfermedad había de ser un microorganismo con transmisión sexual y sanguínea. Casos posteriores en personas heterosexuales y niños evidenciaron también la posible transmisión vertical de madre a hijo [3, 4]. A partir de entonces, nuevos casos de SIDA fueron notificados en diversos colectivos y en varios países; daba comienzo una pandemia que a día de hoy persiste.

En 1983, investigadores del Instituto Pasteur en París, en un estudio liderado por Françoise-Barré Sinoussi y Luc Montagnier, identificaron al agente causal del SIDA, un nuevo retrovirus al que inicialmente denominaron *virus asociado a la linfadenopatía* (LAV) [5]. Un año más tarde, investigadores estadounidenses señalarían también como responsable del SIDA a un retrovirus, que bautizaron como HTLV-III [6]. LAV y HTLV-III eran en realidad el mismo virus, y en 1986, el Comité Internacional de Taxonomía de Virus propuso el nombre de virus de la inmunodeficiencia humana para denominar al virus del SIDA, en sustitución a las denominaciones anteriores [7].

Además del descubrimiento del agente causal del SIDA, el desarrollo de las primeras pruebas diagnósticas en 1985, la aprobación del primer fármaco antirretroviral en 1987 (zidovudina) y la posterior aprobación y optimización de un amplio abanico de antirretrovirales, supusieron un cambio de paradigma en el manejo de la infección por el VIH [4]. En 1997 se demostró que la combinación de varios fármacos antirretrovirales suprimía la viremia por debajo de los límites de detección de los ensayos clínicos [8]. A pesar de ello, la terapia antirretroviral (TAR) actual logra suprimir la replicación del virus en la mayoría de pacientes pero no se consigue su erradicación.

1.2. Situación actual de la pandemia por el VIH

A día de hoy, la infección por el VIH sigue estando presente en todo el mundo. En el año 2020 aproximadamente 37,7 millones de personas estaban viviendo con el VIH, de los cuales

alrededor de 150.000 residían en España. En el mismo año se contrajeron 1,5 millones de nuevas infecciones a nivel mundial, y aproximadamente 3.500 personas se infectaron en España. Lamentablemente, también se produjeron alrededor de 680.000 muertes a causa de enfermedades relacionadas con el SIDA. La ausencia de vacunas eficaces, el desconocimiento de algunas personas que han contraído la infección y la desigualdad en cuanto al acceso al tratamiento, no han conseguido frenar su expansión. Concretamente, los últimos datos arrojados hasta la fecha de 2020, indicaban que de todas las personas que viven con el VIH, el 84% [67–98%] conocían su estado, el 73% [56–88%] tenían acceso al tratamiento, y el 66% [53–79%] presentaban una carga viral indetectable (UNAIDS). Lograr la supresión viral en la gran mayoría de personas infectadas es de vital importancia, ya que se ha demostrado que una carga viral por debajo de los límites de detección de las técnicas clínicas disponibles supone la no transmisibilidad del virus [9].

1.3. Biología del virus VIH

El VIH pertenece a la familia de los retrovirus, específicamente al género lentivirus. La familia *Retroviridae*, que incluye virus con genoma basado en ácido ribonucleico (ARN), ocupa un lugar peculiar en el mundo microbiano por su forma de replicarse, empleando el proceso conocido como transcripción inversa. De esta forma, en su ciclo de vida incluyen este paso esencial que consiste en convertir la molécula de ARN que compone su material genético, en ADN (ácido desoxirribonucleico), revirtiendo el flujo de información genética. Este ADN viral se puede integrar en el genoma de las células infectadas y, como en el caso del VIH, persistir durante largos periodos de tiempo. Asimismo, el término lentivirus hace referencia a su capacidad de causar infecciones persistentes, dando lugar a enfermedades con periodos de incubación largos [10].

El VIH se clasifica en dos tipos: VIH-1 y VIH-2, presentando un 40-50 % de homología genética y una organización genómica similar. Ambos tienen también mecanismos similares de transmisión y las mismas consecuencias clínicas, pudiendo resultar en SIDA [11]. No obstante, el VIH-2 se caracteriza por una capacidad de transmisión más baja y una progresión de la enfermedad más lenta. Otros aspectos de carácter epidemiológico, clínico, virológico e inmune, distinguen ambos virus. Mientras que el VIH-1 se extiende por todo el mundo, siendo el causante de la pandemia mundial de SIDA, el VIH-2 se encuentra principalmente en zonas del África occidental. La carga viral en plasma así como los niveles de activación inmune son más bajos en la infección por el VIH-2, que a su vez parece desencadenar respuestas celulares antivirales más robustas y multifuncionales [12]. En cuanto al origen, en base a homología viral, se considera que el VIH-1 y el VIH-2 provienen de diferentes saltos inter-especie de virus que infectan poblaciones de simios en África. El VIH-1 parece provenir del SIVcpz, virus que infecta a la variedad de chimpancé *Pan troglodytes*, mientras que el VIH-2 presenta una gran homología filogenética con el SIVsmm, virus de la inmunodeficiencia del mono *Sooty mangabey* [13, 14]. A nivel genómico, la principal diferencia entre el VIH-1 y el VIH-2 radica en que ambos codifican de forma exclusiva una proteína reguladora. Así, la proteína viral Vpu solo es sintetizada por el VIH-1, y de forma análoga, Vpx es exclusiva del VIH-2. En los siguientes apartados de la presente tesis, cuando se haga mención al VIH se asumirá que se está haciendo referencia al subtipo VIH-1, mundialmente expandido.

1.4. Genoma y estructura del virus

Un prototipo de retrovirus consta de mínimo 3 genes que codifican las proteínas estructurales necesarias para constituir los viriones, así como las enzimas requeridas para la replicación del genoma, denominados *gag*, *pol* y *env*. Concretamente, *gag* dirige la síntesis de las proteínas internas del virión como la matriz (MA), la cápside (CA) y la nucleocápside (NC); *pol* contiene la información para las enzimas transcriptasa inversa o retrotranscriptasa (RT), integrasa (IN) y proteasa (PR); y *env* codifica las proteínas transmembrana y de superficie de la envuelta [10]. Por su parte, el VIH es un retrovirus complejo, ya que además incorpora genes que codifican proteínas reguladoras que le permiten controlar su expresión en la célula infectada.

Una vez constituido, el virión presenta una estructura esférica de aproximadamente 100 nm de diámetro (**Figura 1**), en la que se pueden diferenciar tres capas [15]:

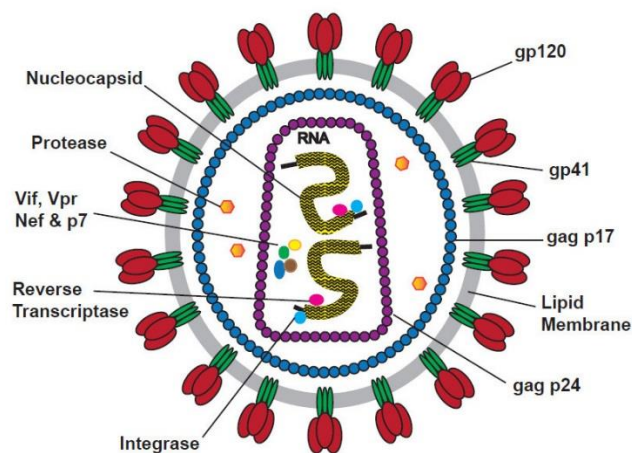


Figura 1. Estructura del VIH. Imagen extraída de <https://www.eenzyme.com/HIV-research-tools.aspx>.

- Capa externa o envuelta. Formada por una membrana lipídica que contiene dos glicoproteínas codificadas por el gen *env*: gp120 (superficie) y gp41 (transmembrana), así como proteínas derivadas de la célula huésped. Debajo de esta membrana lipídica, se encuentra la proteína matriz *gag* p17 que se une a gp41.

- Cápside icosaédrica, formada por la proteína p24 codificada por *gag*.

- Capa interna o nucleoide: contiene el ARN viral, la nucleoproteína p7, las enzimas codificadas por el gen *pol*: RT, IN y PR, así como algunas proteínas accesorias.

El genoma del VIH está formado por dos moléculas de ARN monocatenario de 9,8 kb. Además de los tres genes estructurales (*gag*, *pol* y *env*), presenta una serie de genes (*tat*, *rev*, *nef*, *vif*, *vpr*, *vpu*) que determinan la síntesis de proteínas reguladoras y accesorias que llevan su mismo nombre y que son imprescindibles en el ciclo biológico del virus. Tat y Rev son proteínas reguladoras, la primera constituye un potente activador de la transcripción y la segunda actúa como factor de exportación de transcritos virales entre el núcleo y el citoplasma. El resto de proteínas, denominadas accesorias, han sido implicadas en el transporte al núcleo del complejo

viral pre-integración, como en el caso de Vpr, y en procesos para contrarrestar la respuesta antiviral por parte de la célula infectada, entre otros. Por ejemplo, Nef puede regular negativamente la expresión de moléculas MHC de clase I, y Vif y Vpu interactúan con los factores de restricción APOBEC3G y Tetherin, respectivamente, anulando su efecto antiviral y favoreciendo la expansión del VIH [16].

Además, los dos extremos del genoma del virus integrado están flanqueados por dos secuencias no codificantes: las regiones terminales repetidas (LTR), compuestas por las regiones U3, R y U5, que controlan la expresión de los genes estructurales y accesorios [17]. Estos LTR juegan un papel muy importante ya que son necesarios para la integración del virus en el genoma de la célula huésped y están implicados en el establecimiento de la latencia viral, tema que se abordará más adelante.

1.5. Ciclo de replicación del VIH

El proceso de replicación del VIH consta de varios pasos que se detallan a continuación:

I) Unión del virión a la superficie de la célula huésped.

En este proceso intervienen en primer lugar la proteína viral gp120 y el receptor celular CD4; situando a los linfocitos T CD4⁺ como principal diana del virus [18]. La molécula CD4 también se encuentra en macrófagos, siendo por tanto susceptibles a la infección [19]. La interacción con CD4 provoca un cambio conformacional en la proteína gp120, produciéndose entonces la interacción con otros correceptores requeridos para la entrada del virus. Estos correceptores pueden ser los receptores de quimiocinas CCR5 y CXCR4 [20, 21], que determinan el tropismo viral, dando lugar a la existencia de cepas R5 o X4 trópicas, e incluso duales, pudiendo utilizar ambos receptores [22].

II) Fusión de membranas.

El doble reconocimiento por parte de gp120 de la glucoproteína CD4 y el correceptor CCR5 o CXCR4, induce la exposición de la zona fusogénica amino-terminal de la proteína de la envuelta viral gp41, permitiendo la fusión de ambas membranas: viral y celular. Se produce entonces la entrada de la partícula y la liberación de la cápside viral en el interior de la célula.

III) Transcripción inversa.

La cápside se desintegra y el virus usa la enzima RT para convertir su material genético consistente en ARN monocatenario en una molécula de ADN bicatenario. Este proceso de transcripción inversa tiene una tasa de error elevada que la RT es incapaz de corregir, y junto con la posibilidad de recombinación de fragmentos genómicos en caso de infección de una misma célula por varias partículas, inducen una gran variabilidad genética en la población de virus [23]. La transcripción inversa ocurre antes o durante la desintegración de la cápside, sin embargo, se desconoce el compartimento celular donde tiene lugar. Estudios muy recientes han aportado nuevos conocimientos sobre este paso del ciclo viral, demostrando que la importación al núcleo precede la retrotranscripción y la desintegración de la cápside, indicando por tanto que puede tener lugar en el núcleo y no exclusivamente en el citoplasma [24-26].

IV) Integración.

El DNA viral de doble cadena es transportado al núcleo como parte del complejo de pre-integración, donde la proteína viral integrasa se encarga de insertarlo en el genoma de la célula infectada. Generalmente, el proceso de retrotranscripción da lugar a una molécula lineal de ADN viral codificante que puede integrarse en el genoma de la célula. A esta forma de ADN viral integrada se le conoce como provirus. No obstante, se han identificado también otras formas de ADN proviral circular no integrado en el núcleo, conocidas como ADN episomal, carentes de capacidad replicativa autónoma [27].

V) Replicación.

Una vez integrado, el VIH comienza a usar elementos propios y de la maquinaria celular para crear proteínas virales y dar lugar a nuevos viriones, siendo esencial la enzima celular ARN polimerasa II (ARNPII). La transcripción de los genes virales se inicia en el promotor U3 de la región LTR, sintetizando en primer lugar la proteína viral Tat, que es requerida para la elongación y formación del resto de proteínas. Consecuente, se producen transcritos de ARNm (ARN mensajero) de diferente longitud y procesamiento mediante corte y empalme o *splicing*. Los ARNm más pequeños son exportados directamente desde el núcleo al citoplasma, donde tiene lugar la traducción de los mismos y la síntesis de las proteínas Tat y Rev. Por el contrario, las formas *unspliced* y *singly spliced* requieren la acción de Rev para su transporte al citoplasma [28]. Una vez producidas cantidades suficientes de Tat, el reclutamiento de TEFb (factor de transcripción positiva b) activa la transcripción de las demás proteínas virales [29]. Una vez obtenido el ARN completo, tiene lugar la traducción secuencial de los genes *gag*, *pol* y *env* y por tanto la síntesis de las proteínas virales que codifican, en forma de precursores.

VI) Ensamblaje.

En este punto, el nuevo ARN y las proteínas virales sintetizadas se desplazan hacia la superficie celular y se ensamblan en una partícula inmadura, sin potencial infeccioso aún. Las poliproteínas Gag y GagPol se dirigen hacia la parte interna de la membrana plasmática (MP), donde se ensamblan en una red hexámera inmadura, induciendo la curvatura de la MP [30]. Por otro lado, durante su tráfico por el aparato de Golgi, la proteína Env precursora, gp160, es escindida por proteasas celulares de tipo furina para generar las subunidades gp120 y gp41. Dímeros del RNA genómico viral son empaquetados por la red Gag de ensamblaje, y se incorporan también complejos Env heterotriméricos gp120/gp41 a la membrana en los sitios de ensamblaje [31].

VII) Liberación de la partícula viral y maduración.

Las partículas virales inmaduras se liberan de la célula huésped a través de la escisión de la membrana [32]. En el proceso de ensamblaje y posterior liberación es necesaria la reducción de los niveles del receptor CD4 en la superficie celular, de forma que los nuevos viriones no puedan reinfectar a la misma célula. En esta tarea de regulación negativa de los niveles de CD4 interviene la proteína accesoria Nef. Simultáneamente a la liberación de las partículas, las poliproteínas Gag son escindidas por la proteasa viral en sus proteínas constituyentes maduras. Al igual que las enzimas virales RT e IN, la proteasa PR es empaquetada en los viriones como parte de la poliproteína GagPol. La escisión de Gag desencadena el desmontaje de la red Gag inmadura

unida a la membrana, resultando en el ensamblaje de la cápside cónica madura a partir de las proteínas de la cápside completamente procesadas [33]. A este proceso de escisión de Gag seguido de la reestructuración del virión se le conoce como maduración. La maduración adecuada de las partículas virales es esencial para adquirir capacidad infectiva, y requiere el empaquetamiento de dos copias monocatenarias del genoma ARN viral además de la RT e IN en la cápside naciente [34].

En la **Figura 2** se pueden observar de forma resumida los distintos procesos que tienen lugar durante el ciclo de replicación del VIH.

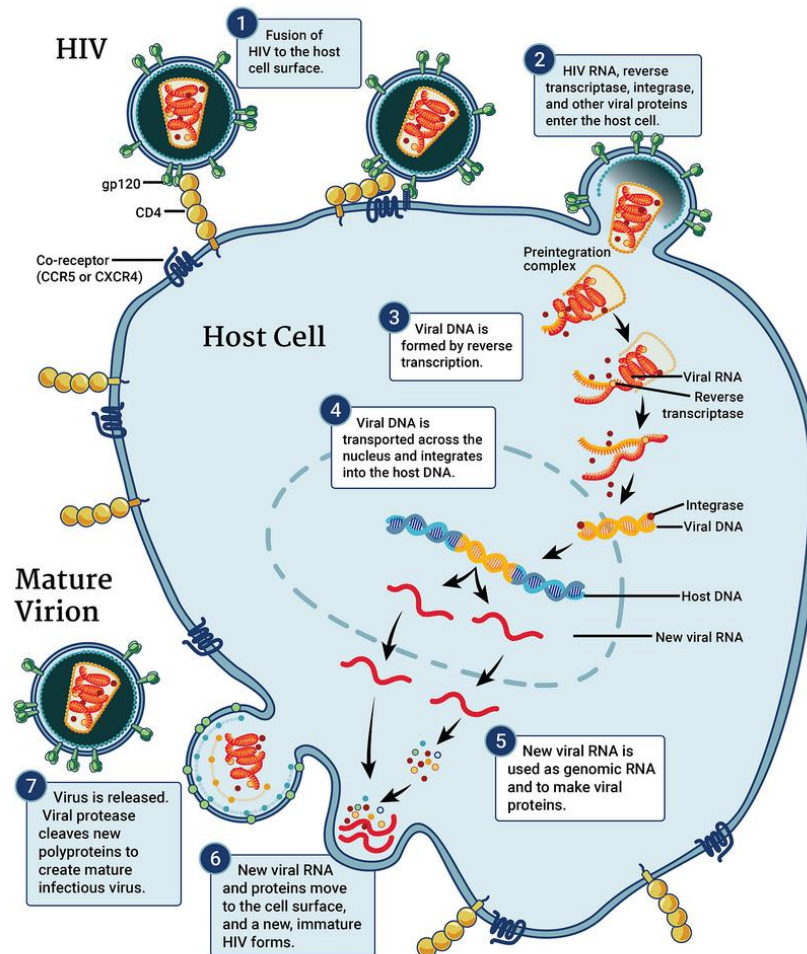


Figura 2. Esquema del ciclo de replicación del VIH. Imagen extraída de <https://www.niaid.nih.gov/diseases-conditions/hiv-replication-cycle>.

2. PATOGÉNESIS DE LA INFECCIÓN POR EL VIH

La patogénesis de la infección por el VIH y la progresión a SIDA son consecuencia de las propiedades de la cepa viral infectante y la respuesta inmune del huésped frente al virus. La infección en ausencia de tratamiento tiene un curso definido en los distintos pacientes en el transcurso de varios años, que comprende los estadios de la primoinfección, fase crónica, y por

último fase SIDA. La monitorización se lleva a cabo mediante distintas pruebas clínicas y la medición de parámetros como el recuento de linfocitos T CD4⁺, las concentraciones plasmáticas de ARN viral, el estudio de diferentes manifestaciones clínicas y la presencia de enfermedades oportunistas.

2.1. Primoinfección o fase aguda

La principal vía de transmisión del VIH es sexual, por lo que usualmente la diseminación del virus comienza desde la mucosa anal o vaginal hacia el sistema monocito/macrófago y el tejido linfoide, donde encuentra sus células diana. La principal diana del virus son los linfocitos T CD4⁺, aunque también células dendríticas (CD), monocitos y macrófagos [35].

En el primer estadio de diseminación, conocido como fase eclipse, aún no se evidencian manifestaciones clínicas ni se produce una viremia detectable, y por tanto, no se producen aún respuestas inmunes contra el virus. Las CD y linfocitos T CD4⁺ infectados permiten la propagación del virus a los nódulos linfáticos regionales y posteriormente al torrente sanguíneo. Se producen entonces elevadas tasas de replicación viral en el tejido linfático de las mucosas infectadas y los nódulos linfáticos regionales, causando una gran depleción de células T CD4⁺ [36, 37]. A nivel del tejido linfoide asociado al intestino (GALT, del inglés *Gut-associated Lymphoid Tissue*), la infección destruye su función barrera, lo que induce una elevada presencia de productos bacterianos como lipopolisacáridos (LPS) en los ganglios mesentéricos, proceso que se conoce como translocación bacteriana, induciendo inflamación crónica [38]. La viremia comienza a ser detectable, mediante métodos de amplificación por RT-PCR, transcurridos entre 10 y 12 días desde el inicio de la infección [39, 40]. Niveles muy elevados de replicación viral, a menudo por encima de un millón de copias/ml, suelen ser de corta duración, ya que el paciente genera respuestas inmunes de tipo humoral y celular que consiguen controlar parcialmente la replicación del VIH. De esta manera, la viremia decae varios órdenes de magnitud en cuestión de semanas. En el control inicial de la replicación viral intervienen varios factores asociados con la inmunidad antiviral innata y adquirida, resultando esencial la actividad citotóxica específica de los linfocitos T CD8⁺, hasta que comienzan a aparecer también anticuerpos específicos contra el virus [41]. La seroconversión, o en otras palabras, la aparición de los primeros anticuerpos específicos contra el VIH, ocurre en un periodo de entre 3 y 5 semanas desde el primer contacto con el virus, tardando una media de 22 días (**Figura 3**) [42]. El periodo en el que aún no se detectan anticuerpos se conoce como periodo ventana. En algunas personas la seroconversión puede conllevar más tiempo, incluso hasta 3 meses.

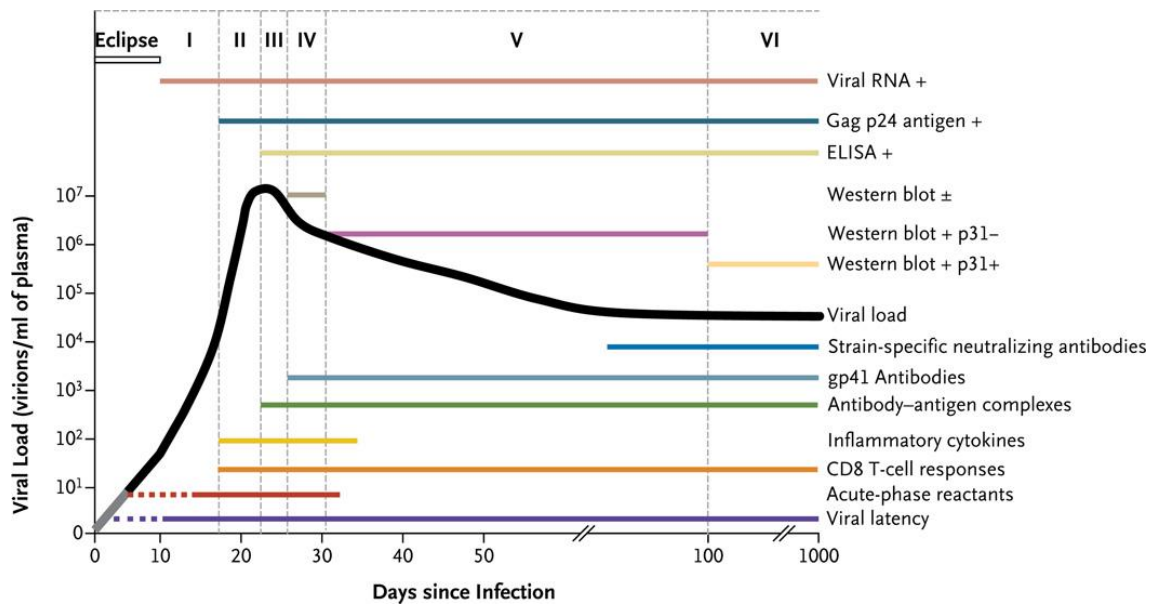


Figura 3. Eventos clave durante el curso natural de la infección VIH no tratada. Progresión de la infección descrita en seis fases indicadas por números romanos. Estas fases se definen de acuerdo a los resultados de pruebas clínicas estándar (listadas por encima de la curva de color negro de la carga viral). La aparición secuencial de ARN viral en plasma, de la proteína viral p24 y anticuerpos específicos del VIH, definen distintos estados. Las líneas por debajo de la curva de la carga viral muestran el tiempo aproximado en el que ocurren eventos clave como la aparición de respuestas inmunes mediadas por células T CD8⁺ así como anticuerpos específicos. Imagen extraída del artículo [39].

Respecto a las manifestaciones clínicas, pasados desde varios días hasta varias semanas de la exposición al virus, la mayoría de personas infectadas desarrollan síntomas parecidos a los de una gripe, pudiendo presentar fiebre, linfadenopatía, faringitis o mialgia, entre otros síntomas [43]. Este cuadro clínico puede ser muy heterogéneo, y se ha descrito que aquellos pacientes que muestran síntomas más severos y duraderos durante la infección aguda tienden a progresar más rápido hacia SIDA [44, 45]. La fase sintomática de la infección aguda dura entre 7 y 10 días.

2.2. Fase Asintomática

Varias semanas después del inicio de la infección, los pacientes entran en un periodo de latencia clínica, también conocida como fase asintomática, caracterizada por niveles de replicación viral bajos y ausencia de síntomas. Esto es un reflejo de la presión que ejercen las respuestas inmunes innatas y adaptativas contra el VIH [46]. Por un lado, los anticuerpos específicos contra antígenos virales ejercen su acción mediante distintos mecanismos, como la neutralización de las partículas virales o la eliminación de las células infectadas mediante inducción de respuestas citotóxicas; por ejemplo reclutando células natural killer (NK) y desencadenando una respuesta citotóxica dependiente de anticuerpo (ADCC) [47, 48]. Por otro lado, también se desencadenan respuestas citotóxicas mediadas por linfocitos T específicos que reconocen antígenos virales en la superficie de las células infectadas. A pesar de ello, en la fase asintomática, el VIH continúa replicándose e induce un estado de inflamación crónica sistémica. Son varias las razones por las que el sistema inmune no es capaz de erradicar la infección. La principal es la persistencia de células, denominadas reservorios, que albergan copias virales integradas conocidas como

provirus, y que generalmente presentan ausencia o niveles bajos de expresión de antígenos virales [49]. En consecuencia, los efectos patogénicos asociados al virus persisten e inducen una lenta pero progresiva pérdida de linfocitos T CD4⁺ y un deterioro de las respuestas inmunes [46]. La magnitud de la reducción de linfocitos T CD4⁺ marcará el final de la fase asintomática.

2.3. Fase SIDA

Con el tiempo, debido a la exposición antigénica constante y activación continuada, las funciones reguladoras y efectoras del sistema inmune se ven alteradas, con la consecuente aparición de enfermedades oportunistas. Esta última etapa, conocida como síndrome de inmunodeficiencia adquirida o SIDA, se caracteriza por la incapacidad de controlar la replicación viral y la caída del recuento de linfocitos T CD4⁺ por debajo de 200 células/ μ l, lo cual determina el riesgo de enfermedades causadas por bacterias, virus, hongos, parásitos, así como tumores, que pueden conducir a la muerte del paciente. Las infecciones oportunistas más comunes son causadas por *Microcystis carinii*, *Candida albicans*, Citomegalovirus, Herpes zoster o parásitos enteropáticos como *Cryptosporidium*. Neoplasias como Sarcoma de Kaposi y linfomas son también frecuentes [50].

Datos aportados por la Organización Mundial de la Salud indican que en ausencia de tratamiento, la muerte de una persona debido a progresión a SIDA tiene lugar en un transcurso de tiempo aproximado de 11 años.

3. RESPUESTAS INMUNES FRENTE A LA INFECCIÓN POR VIH

Como se ha mencionado en el apartado anterior, tanto la inmunidad innata como la inmunidad adaptativa desencadenan una fuerte y variada respuesta con el objetivo de frenar la infección por VIH.

3.1. Inmunidad innata

El sistema inmune innato es la primera línea de defensa del organismo contra distintos patógenos. Ofrece protección mediante barreras físicas como la piel y las membranas mucosas, así como distintos tipos celulares que poseen diversos mecanismos efectores, como neutrófilos, macrófagos, células dendríticas, y células NK.

La inmunidad innata se induce cuando receptores de reconocimiento de patógenos (PRR, del inglés, *pattern recognition receptors*) detectan productos virales, incluyendo ácidos nucleicos, como elementos no propios [51]. Este proceso de detección de patrones moleculares asociado a patógenos (PAMPs, del inglés, *pathogen-associated molecular patterns*) desencadena vías de señalización que conducen a la expresión de genes con función antiviral y moduladora del sistema inmune, restringiendo así la replicación viral y regulando la respuesta inmune adaptativa [52].

Todas las células nucleadas poseen PRRs capaces de responder a PAMPs [53]. Estos incluyen receptores tipo RLR (del inglés, *RIG-I-like receptors*) y receptores tipo TLR (del inglés, *toll-like receptors*) [54, 55]. Por ejemplo, las células dendríticas plasmacitoides (pDCs), que son la

principal población inmune productora de interferón (IFN) en el organismo, expresan ampliamente TLR7 y TLR9, lo cual les ofrece la capacidad de reconocer genomas monocatenarios como el del VIH [56]. Estudios recientes han mostrado también la detección de la infección por VIH a través de productos de la transcriptasa inversa mediante al menos 2 PRRs intracelulares adicionales, IFI16 (del inglés, *interferón inducible protein 16*) y cGAS (*cyclic GMP-AMP sintasa*) [57, 58]. La detección del VIH puede ocurrir además a otros niveles. Así, la proteína viral gp120 puede ser reconocida por TLR2 y TLR4 en la superficie de células epiteliales de la mucosa, lo cual resulta en la producción de citoquinas proinflamatorias y quimiocinas que reclutan células inmunes al sitio de encuentro con el virus [59]; y el ARN genómico viral puede ser reconocido por TLR7 y TLR8 [60], además de RIG-1 [61]. Una característica común de la señalización mediada a través de PRRs es la inducción de producción de interferón (IFN), con la consecuente inducción de cientos de genes estimulados por esta citoquina (ISGs, del inglés, *interferón-stimulated genes*), que ayudan a la creación de un estado antiviral y la activación de la inmunidad adaptativa [62, 63]. La expresión de *tetherin* en las células T CD4⁺ es un ejemplo de producto ISG expresado en respuesta a IFN. Esta proteína dificulta la gemación de las partículas virales y limita la expansión de la infección [64, 65]. Después de la interacción con el VIH, *tetherin* también actúa como PRR e inicia una señalización intracelular que activa el factor de transcripción NF-κB y conduce a la producción de citoquinas proinflamatorias [66]. De forma similar, IFI16 sirve como PRR del VIH e induce la producción de IFN tipo I, conduciendo a la eliminación de células T CD4⁺ [67], cuya disminución drástica es una característica de la infección por VIH.

En global, la detección de la infección del VIH mediante PRRs resulta en la activación inmune innata tanto de células infectadas como células del entorno, acompañado de la inducción y producción de citoquinas proinflamatorias y quimiocinas. Las primeras células en responder y producir citoquinas son las CD. Consecutivamente, monocitos, macrófagos y células NK son activados y participan activamente produciendo mediadores inmunes. Las CD son células presentadoras de antígeno que secretan interferones de tipo I como el IFN-α tras la infección [68]. Uno de los efectos del IFN-α es la subsiguiente activación de las células NK, una población de células efectoras con importantes funciones citotóxicas y reguladoras [69]. Una variedad de citoquinas producidas durante la fase inicial de la infección por VIH, incluyendo el IFN-α, IL-12, IL-15 e IL-2, activan de manera robusta la función NK [70], que ven incrementada su capacidad citotóxica y secretan citoquinas como IFN-γ, interviniendo en el control de la infección [71]. Una importante función del IFN-γ es la activación de la respuesta inmune adaptativa.

3.2. Inmunidad adaptativa

La inmunidad adaptativa comprende dos tipos de respuesta: la denominada respuesta humoral, que consiste en la producción de anticuerpos específicos de antígeno por parte de células B; y la respuesta celular mediada por linfocitos T CD4⁺ y T CD8⁺. Estas se activan en un periodo de días a semanas tras el pico de viremia alcanzado en la fase inicial de la infección, tras producirse la respuesta inflamatoria inducida por la inmunidad innata en las mucosas de los diferentes tejidos, principalmente intestino y ganglios linfáticos. En consecuencia se expanden distintas poblaciones celulares y se orquesta una respuesta multicelular, que incluye la interacción entre células T y células B [72]. Uno de los resultados es la activación de células B y de la respuesta humoral, que se caracteriza por la producción de anticuerpos específicos contra el VIH. La

mayoría de anticuerpos producidos durante la infección aguda son no-neutralizantes [73, 74], sin embargo este tipo de moléculas puede dar lugar a variadas respuestas efectoras como fagocitosis o citotoxicidad dependiente de anticuerpo (ADCC). Por otro lado, los linfocitos T CD4⁺, que son la principal diana del virus y sufren una depleción masiva, sobre todo en determinadas subpoblaciones como la $\alpha 4\beta 7$ en intestino [75] o las Th17 y Th1 [76], también producen respuestas anti-virales caracterizadas por la producción de IL-17, IFN- γ e IL-2, indicando que al menos una fracción conserva capacidad funcional [77]. Por su parte, células T CD8⁺ específicas del VIH se expanden y su actividad se asocia al control de la infección, mostrando altos niveles de moléculas citotóxicas como perforina y granzima B [78-80]. De hecho, en individuos denominados controladores de élite, los cuales representan la aproximación más cercana a una cura funcional de la infección, el control de la replicación viral sin necesidad de tratamiento se ha asociado a respuestas celulares más robustas mediadas por células T CD8⁺ [81], entre otros factores [82]. Merece la pena resaltar que células T CD8⁺ activadas han sido localizadas durante la infección aguda en compartimentos anatómicos como el fluido cerebroespinal [83]. La habilidad de estas células para migrar a lugares de persistencia viral podría ser clave. En relación a esto, estudios con macacos han demostrado que linfocitos T citotóxicos (CTL) específicos del virus de la inmunodeficiencia en simios (VIS), parecen quedar excluidos de los centros germinales en los ganglios linfáticos, tanto en la infección aguda como crónica [84, 85], lo cual podría explicar la capacidad del VIH para persistir en algunos compartimentos anatómicos a pesar de desarrollarse múltiples y potentes respuestas inmunes contra el virus. Se pueden citar otros ejemplos de efectos que son un arma de doble filo a raíz de la respuesta desencadenada contra la infección por VIH, como la producción de IL-10 por parte de células B, ya que puede inhibir las respuestas mediadas por CTLs [86, 87]; o el estado de disfunción que alcanzan estas últimas debido a la reducción en el número de células T CD4⁺ colaboradoras o a la exposición constante a antígeno [79, 80, 88]. En la inmunidad innata también se producen eventos que facilitan la perpetuación del virus, por ejemplo la producción de quimiocinas que atraen linfocitos T CD4⁺ a los lugares de infección y que facilitan la diseminación del virus [89, 90].

4. TERAPIA ANTIRRETROVIRAL

El tratamiento antirretroviral (TAR) disponible actualmente consigue controlar la replicación del VIH hasta niveles indetectables (<50 copias/ml plasma) en la mayoría de pacientes infectados. Con ello también revierte, al menos parcialmente, el daño inmunológico y reduce el riesgo de progresión a SIDA y de eventos que conducen a la muerte.

Actualmente hay 5 clases de fármacos antirretrovirales aprobados por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA), la mayoría de los cuales interfieren en los primeros pasos del ciclo de replicación del virus [30].

I) Inhibidores de la entrada, a través de múltiples mecanismos. Enfuvirtide es un ejemplo, y se fundamenta en su unión a gp41 y la inhibición de la fusión entre las membranas viral y celular.

II) Inhibidores de transcriptasa inversa análogos de nucleósidos (ITIAN). Se incorporan a la cadena de ADN viral e interrumpen su elongación.

III) Inhibidores de transcriptasa inversa no análogos de nucleósidos (ITINN). Bloquean la transcriptasa inversa provocándole un cambio conformacional e inhibiendo su actividad ADN polimerasa.

IV) Inhibidores de la integrasa.

V) Inhibidores de la proteasa. Bloquean la escisión de las proteínas precursoras Gag y GagPol, dando como resultado defectos en la maduración de las partículas virales.

El TAR incluye normalmente tres fármacos de al menos dos clases distintas, usualmente dos ITIAN en combinación con un ITINN o un inhibidor de la integrasa o la proteasa. Este cóctel de fármacos es muy eficaz en la reducción de la carga viral, sin embargo no erradica la infección, lo cual obliga a su administración de por vida. Esto se debe a que el VIH establece reservorios capaces de persistir, incluso en aquellos pacientes en los que la terapia consigue una supresión completa y prolongada, y promover nuevas infecciones en caso de interrupción del tratamiento o el desarrollo de resistencias al mismo [8]. Esto resalta la necesidad de desarrollar nuevos fármacos que exploten vías alternativas para inhibir la replicación del VIH. De hecho, actualmente se está testando en ensayos clínicos una nueva familia de fármacos denominados inhibidores de la cápside [91]. Otros factores contribuyen a la persistencia de los reservorios virales, como la disfunción en determinadas respuestas inmunes que persiste también a pesar del TAR, y se detallará más adelante.

5. RESERVORIOS Y PERSISTENCIA DEL VIH

Colectivamente, el término reservorio hace referencia a aquellas células que contienen copias virales integradas con potencial infeccioso, y permiten la persistencia del VIH durante largos periodos de tiempo a pesar de la presión ejercida por el TAR. La frecuencia de estas células es muy baja, estimándose en aproximadamente una por millón de linfocitos T CD4⁺ en reposo [92]. Sin embargo, aunque la cantidad de células con capacidad para producir virus infeccioso es pequeña, existen limitaciones técnicas que probablemente conducen a una subestimación de la misma.

La existencia de compartimentos celulares que sirven de reservorios virales de larga duración quedó patente a raíz de la implementación de la terapia antiretroviral combinada. Aunque se han descrito santuarios farmacológicos, este tratamiento, en general logra bloquear la generación de nuevas rondas de infección en la mayoría de pacientes, reduciendo la viremia hasta niveles indetectables. No permite sin embargo erradicar la infección, debido a la incapacidad para suprimir la producción de virus por parte de las células que ya contienen ADN proviral integrado. Esto se traduce en un rebote viral en el transcurso de pocas semanas en caso de interrupción del tratamiento [93, 94], debido a los reservorios persistentes.

Actualmente, las técnicas de medición y caracterización del reservorio han permitido una visión más completa y precisa, resaltando su gran heterogeneidad. Así, en cuanto al estado de activación del provirus en las células persistentes, se distinguen dos tipos de reservorio:

- Reservorio latente: comprende aquellas células en estado de reposo que contienen una copia integrada del genoma viral y que no expresan transcritos virales ni proteínas. Estos provirus inactivos no son susceptibles por tanto a la terapia antirretroviral ni al reconocimiento y eliminación por parte del sistema inmune.

- Reservorio activo: compuesto por células en estado transcripcionalmente activo, produciendo ARN viral, proteínas y posiblemente viriones.

5.1. Métodos para cuantificar el reservorio

Hasta ahora, el método mejor considerado para cuantificar el reservorio competente es el denominado QVOA (del inglés, *Quantitative Viral Outgrowth Assay*), y se basa en estimular las células infectadas y cultivarlas con otras células susceptibles a la infección con el objetivo de expandir el virus. Una de las principales limitaciones del método QVOA es que con una sola ronda de activación de las células infectadas no es posible reactivar todos los provirus y por tanto subestima el tamaño del reservorio, además de ser caro, laborioso y requerir un gran número de células [95].

Por otro lado, existen otros métodos clásicos de cuantificación, como la detección del ADN viral mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), los cuales ofrecen una medida total de la cantidad de células que contienen copias virales pero sobreestima el tamaño del reservorio competente, ya que la mayoría de los genomas virales detectados son defectuosos [96]. En este sentido, recientemente se han desarrollado técnicas que proporcionan información sobre la integridad de la secuencia viral contenida en las células reservorio, siendo capaces de discriminar entre provirus intactos y defectuosos, suponiendo una alternativa más precisa y escalable. Una de estas técnicas, denominada IPDA (del inglés, *Intact Provirus DNA Assay*), se basa en la metodología *droplex digital PCR* (ddPCR) y el uso de *primers* y sondas específicos que permiten diferenciar genomas intactos de aquellos que portan deleciones o hipermutaciones sin necesidad de secuenciar el virus [97]. Como el resto de técnicas que se usan para tratar de estimar el tamaño del reservorio en los pacientes infectados, el IPDA no carece de limitaciones, entre ellas errores en la detección debido a polimorfismos [98]. Para una revisión detallada de los métodos disponibles para cuantificar y caracterizar el reservorio, así como recomendaciones sobre cuál de ellos priorizar en ensayos clínicos dirigidos a curar la infección, se puede consultar un artículo reciente de Abdel-Mohsen y colaboradores [95].

Otras técnicas permiten estudiar concretamente el reservorio activo, detectando la transcripción de ARN viral y la traducción de proteínas del VIH [99]. Una posibilidad es la cuantificación de ARN viral mediante la extracción de material genético y la retrotranscripción por PCR (RT-qPCR, del inglés *real time reverse transcription*). Otra alternativa, diseñada para la cuantificación de ARN viral tras la estimulación de las células es el ensayo TILDA (*Tat/Rev Induced Limiting Dilution Assay*) [100]. Por otro lado, un reflejo de la actividad proviral de los reservorios en los pacientes infectados es la viremia plasmática residual detectada a pesar de la supresión prolongada gracias al TAR [101-103]. Para la detección de estos niveles bajos de ARN en plasma hay disponibles varios métodos, que pueden tener un límite de detección de una sola copia de ARN viral por mililitro de plasma [104]. Entre ellos se encuentra el SCA o *single copy assay*, y se usa para monitorizar la presencia de viremia residual. Además, mediante citometría y microscopía se puede estudiar también la transcripción y traducción del VIH en células

individuales, lo cual permite a la vez caracterizarlas gracias al uso de anticuerpos acoplados a fluorocromos. De esta forma, es posible aplicar protocolos de hibridación *in situ* que permiten detectar ácidos nucleicos como el ARN viral, y su posterior visualización mediante microscopía en muestras de tejido (técnica RNAscope) o mediante citometría de flujo en el caso de muestras de sangre periférica (ensayo RNA/FISH flow) [105-107]. La disponibilidad de anticuerpos comerciales dirigidos a la proteína viral de la cápside p24, permite también la detección de células competentes para la traducción, evaluando los resultados mediante microscopía, citometría, o utilizando ensayos de detección ultrasensible tipo ELISA, como el denominado SIMOA [108].

5.2. Reservorios celulares del VIH

La principal diana y reservorio por excelencia del VIH son los linfocitos T CD4⁺. Concretamente, distintas subpoblaciones de memoria son las que contribuyen mayoritariamente a la persistencia del VIH en los individuos en tratamiento antirretroviral.

5.2.1. Células T CD4⁺ de memoria

Las subpoblaciones de células T CD4⁺ con fenotipo de memoria y en estado de reposo han sido las más estudiadas debido a su mayor capacidad intrínseca para albergar VIH latente, y por tanto, la probabilidad de constituir nichos de larga duración para el virus mediante evasión del sistema inmune y el efecto de los fármacos antirretrovirales [109]. De hecho, ya a finales de los años 1990, varios grupos mostraron que se podía inducir VIH con potencial de replicación en células T CD4⁺ en reposo aisladas de pacientes en tratamiento antirretroviral por largos periodos de tiempo [110-112].

El compartimento celular T CD4⁺ es intrínsecamente heterogéneo, pudiendo distinguirse subpoblaciones con expresión diferencial de marcadores, distintos estadios de maduración, activación, diferenciación, función y vida media. En sangre periférica, las subpoblaciones de memoria con fenotipo *central memory* (T_{CM}), *transitional memory* (T_{TM}) y *effector memory* (T_{EM}) contienen la mayor proporción de provirus [113, 114]. T_{CM} y T_{EM} constituyen dos de las principales subpoblaciones de memoria, y es posible distinguirlas siguiendo múltiples criterios [115]: I) la ausencia (T_{CM}) o presencia (T_{EM}) de funciones efectoras inmediatas; II) la expresión del receptor de migración CCR7, que permite a las células migrar a órganos linfoides secundarios (T_{CM}) versus tejidos no linfoides (T_{EM}); III) la capacidad para producir IL-2 (T_{CM}) o IFN- γ (T_{EM}) tras estimulación antigénica; IV) la prevalencia de un programa pro-supervivencia (T_{CM}) o pro-apoptótico (T_{EM}). Tras la estimulación antigénica, las células T_{CM} se diferencian en T_{EM}, mientras que las células T_{EM} no pueden revertir a un fenotipo T_{CM} [116]. Las células T_{CM} poseen una larga vida media y capacidad de auto-renovación, y su contribución al total de células infectadas por el VIH es la más significativa [113, 117]. Por su parte, las T_{EM} contribuyen en menor proporción al total de células que albergan genomas virales, pero poseen una mayor capacidad de proliferación y están enriquecidas en genomas intactos y con potencial de inducción [97, 105, 118-121]. Por otro lado, Las células T_{TM} representan una subpoblación intermedia entre las T_{CM} y T_{EM} en términos de diferenciación celular y capacidad de expansión en respuesta a IL-15 *in vivo*, y contribuyen sustancialmente al reservorio viral total [113].

Otras poblaciones celulares de memoria contribuyen notablemente a la persistencia del VIH, como es el caso de las T CD4⁺ *stem cell memory* (T_{SCM}) y *tissue-resident memory* (T_{RM}). Las células T_{SCM} son una población minoritaria (aproximadamente 2-3 % de los linfocitos circulantes) con características fenotípicas similares a células naive (T_{NA}) y ciertas propiedades de células madre. Las T_{SCM} preceden a las células T_{CM} en diferenciación, y aunque poseen capacidades funcionales propias de células de memoria, mantienen una serie de genes expresados en células T_{NA} y otros patrones biológicos similares, como la recirculación y distribución in vivo [116]. Estas células pueden dar lugar al resto de subpoblaciones de memoria mediante diferenciación, y además poseen una gran capacidad de auto-renovación. La capacidad de sobrevivir durante largos periodos de tiempo y el enriquecimiento en DNA viral que presentan estas células en los pacientes VIH⁺ en tratamiento, convierten a las T_{SCM} en un gran desafío para la erradicación del VIH [114]. Por otro lado, las células T_{RM} son una población de células T de memoria no circulante, residentes de tejido, cuyo papel protector frente a diversos patógenos invasores podría ser determinante [122]. Estas células presentan un perfil fenotípico característico [123], principalmente definido por la expresión de CD69, y han sido identificadas en varios tejidos en ratones y en humanos, incluyendo pulmón, hígado, piel, intestino y tejidos linfoides [124]. En la mucosa cervical de mujeres VIH⁺, se ha demostrado que las células T CD4⁺ con fenotipo T_{RM} son una diana preferencial para el VIH y constituyen el mayor reservorio celular en este tejido [125].

5.2.2. Poblaciones celulares T CD4⁺ clasificadas acorde a su función

Aunque las subpoblaciones de memoria se definen comúnmente de acuerdo a su potencial para migrar a órganos linfoides secundarios y la rapidez para mediar funciones efectoras, es importante tener en cuenta que una vez activadas, por ejemplo tras un reencuentro con un antígeno conocido, ejercerán funciones efectoras específicas. De acuerdo a estas propiedades funcionales, al perfil de citoquinas que producen y receptores de quimiocinas que expresan, se puede establecer una clasificación alternativa de estas células, clasificándose como células T auxiliares o Th (del inglés, *T helper cells*), células T reguladoras o Treg, y células T foliculares (Tfh) [126]. El grupo de células Th engloba varios subtipos: Th1, Th2, Th9, Th17 y Th22. Las células Th1, a pesar de tener una vida media relativamente corta, parecen contribuir a la persistencia del VIH a través de la proliferación inducida por antígeno, ya que albergan genomas virales intactos expandidos mediante proliferación clonal [127]. Las células Th9, especializadas en respuestas inmunes antitumorales [128], y en menor medida las Th2, están enriquecidas en genomas virales con tropismo X4 [129]. Por otro lado, las células Th17 poseen ciertas propiedades de células madre [130, 131], lo cual refuerza el posible papel de estas células como reservorios de larga duración para el VIH [132, 133]. Además, las células Treg y Tfh también han sido identificadas como un reservorio viral [134-136]. Las células Tfh representan un compartimento celular muy relevante, localizado principalmente en los folículos B de órganos linfoides secundarios como los nódulos linfáticos, bazo y las placas de Peyer, donde son responsables de la maduración de las células B a través de la producción de IL-21 e IL-4, aunque también se pueden detectar células Tfh circulantes en sangre [137, 138]. Estas células están altamente enriquecidas en VIH y constituyen uno de los compartimentos celulares más permisivos para la replicación y producción de partículas virales, lo cual las sitúa como un importante obstáculo para la erradicación del VIH [135, 136].

5.2.3. Células T CD4⁺ Naive

Aunque las células de memoria son el reservorio latente del VIH mejor caracterizado [139], dado sus niveles más elevados de DNA viral [113] y expresión del correceptor CCR5 [140], varios estudios han apuntado también a las células T_{NA} como un importante reservorio viral. Recientemente se ha demostrado que las T_{NA} contribuyen sustancialmente al reservorio competente, conteniendo secuencias virales con potencial infeccioso [141, 142]. Estas células presentan una elevada expresión del correceptor CXCR4, lo cual las hace susceptibles a la infección por el VIH [113, 114, 143-145]. Otra serie de características únicas, como una larga supervivencia [146], la resistencia a la expresión del VIH después de la integración [105, 106, 145] y la habilidad para dar lugar a las distintas subpoblaciones de memoria, las sitúan como un importante obstáculo para la erradicación del VIH.

5.2.4. Otros reservorios celulares

El papel de otros tipos celulares en la persistencia del VIH ha sido estudiado, como es el caso de macrófagos [147], células dendríticas [148], o células del sistema nervioso central como astrocitos y células de la microglía [149]. Sin embargo, aún estaría por esclarecerse si constituyen verdaderamente reservorios virales, entre otras razones por la dificultad de obtener muestras de los tejidos donde residen.

Entre los tipos celulares mencionados, los macrófagos son la población de la que se dispone cada vez más evidencia sobre su papel como reservorio viral [150]. De hecho, se ha detectado ADN y ARN viral en macrófagos residentes en varios tejidos humanos como los pulmones y el aparato reproductor masculino, en individuos VIH⁺ con carga viral indetectable [19, 151]. Además, un estudio reciente ha postulado a los macrófagos presentes en la uretra como un reservorio importante del VIH, sustentando formas latentes del virus, ya que observaron que contienen ADN, ARN, proteínas y viriones intactos del VIH [19]. Es de destacar que los autores fueron capaces de reactivar virus competentes para la replicación a partir de estos macrófagos.

5.3. Reservorios anatómicos del VIH

El estudio de las diferentes poblaciones de células en sangre ha proporcionado un conocimiento muy valioso sobre la patogénesis del VIH en ausencia y en presencia del TAR. Sin embargo, se debe tener en cuenta que las células T CD4⁺ circulantes en sangre suponen menos del 2 % del total de estos linfocitos en el cuerpo humano [152, 153]. Por tanto, investigar la persistencia viral en otros tejidos, pese a que es una tarea más complicada, es fundamental. De hecho, diversos estudios han evidenciado varios tejidos como lugares preferentes para la persistencia del VIH, como los ganglios linfáticos, intestino y tracto genital, donde se detectan cantidades más elevadas de células portadoras de genomas virales que en sangre [125, 135, 154, 155]. Además, se han encontrado células infectadas por el VIH en el sistema nervioso central (CNS), pulmón, riñón, hígado, tejido adiposo, tracto genitourinario y médula ósea [156]. Merece la pena destacar, que hasta en 28 compartimentos anatómicos distintos se han detectado genomas con secuencias intactas en determinadas regiones, y por tanto probablemente con potencial infeccioso [121, 157] y capacidad de producir rebote viral. Por tanto, encontrar una cura para la infección requerirá seguramente la eliminación de todos estos reservorios anatómicos, dada la alta carga viral que albergan, y la inclusión tanto de genomas defectivos como con potencial de

replicación [158, 159]. Los reservorios virales defectivos también podrían contribuir negativamente a la patogénesis del VIH, mediante el empeoramiento de las respuestas inmunes en los pacientes VIH⁺ e inducción de inflamación persistente [160-162].

La mayoría de la replicación del VIH tiene lugar en órganos linfoides secundarios como el bazo, ganglios linfáticos y tejido linfoide asociado al intestino [156]. Varios estudios han demostrado la presencia en estos compartimentos de células que constituyen reservorios competentes [163]. Además, concentran una gran cantidad de células, concretamente dentro de los folículos de células B, que producen espontáneamente ARN viral y juegan un papel importante en la persistencia del VIH, tanto en la infección crónica no tratada como bajo presión del TAR [164-167]. Esta elevada transcripción activa del VIH en el folículo B se debe a varios factores descritos hasta ahora: I) Subpoblaciones de células T foliculares, incluyendo las Tfh y células T foliculares reguladoras, que son más permisivas al virus que otras subpoblaciones extra-foliculares [168, 169]; II) El folículo B además contiene un gran reservorio de viriones VIH extracelulares, que se acumulan en la superficie de células dendríticas foliculares (FDCs, del inglés, *follicular dendritic cells*) en los centros germinales. Los viriones vinculados a las FDC mantienen su capacidad infecciosa y pueden persistir durante meses e incluso años [170-172]; III) Además, el folículo B es un compartimento anatómico inmune privilegiado para el VIH, ya que escapa parcialmente del control inmune mediado por linfocitos T citotóxicos (CTL). La frecuencia de CTL específicos de VIH o VIS es menor en los folículos B que en la región extra-folicular, ya que la mayoría de CTLs no expresan el receptor de migración folicular CXCR5 [84, 165, 173, 174]. Además, una proporción de CTLs en el folículo B podría ser menos funcional, ya que muchos presentan un fenotipo de célula T CD8⁺ folicular reguladora [175-177]; IV) Otros estudios también han sugerido que la penetración subóptima de fármacos antivirales en estos compartimentos facilitarían los niveles elevados de transcripción viral [178].

Además de los ganglios linfáticos, el intestino es otro compartimento anatómico que desde los inicios de la infección se ve altamente afectado, siendo uno de los órganos con el mayor número de células infectadas incluso en presencia del TAR. Esto se debe a que el intestino contiene una gran proporción de tejido linfoide y de linfocitos diana, con gran susceptibilidad a la infección y permisivos para la replicación viral, atribuido a la activación de estas células T y a su expresión elevada de CCR5 [179, 180]. Esto hace que rápidamente tras la infección, se produzca una pérdida masiva de células T en esta región y se produzcan daños en la barrera intestinal que conllevan un proceso de translocación microbiana y la activación persistente del sistema inmune, que perdurará incluso en presencia de la terapia [181-183]. En pacientes con carga viral suprimida gracias al TAR, se ha detectado ADN y ARN viral en células T CD4⁺ del intestino y en otros tipos celulares como células mieloides CD13⁺ y macrófagos [154, 184-186]. Además, los niveles de ADN viral en las células intestinales parecen ser mucho más elevados que en células circulantes en sangre, incluso tras muchos años de supresión viral gracias al tratamiento, como ocurre también con los niveles de transcripción viral [155, 187].

Otros compartimentos anatómicos han sido propuestos como lugares de persistencia viral, siendo destacable el sistema nervioso central, donde es posible detectar ADN y ARN viral en el cerebro de pacientes bajo tratamiento, principalmente en macrófagos, células de la microglía y ocasionalmente en astrocitos [188-192]. Además, dos estudios encontraron virus en el cerebro y fluido cerebroespinal con mutaciones de resistencia a fármacos [191, 193]. La persistencia del

VIH en el cerebro ha sido sugerida en otras publicaciones, describiendo casos de pacientes con síntomas neurológicos, una complicación ampliamente reconocida a causa de la infección por VIH, asociados a un rebote viral a partir del fluido cerebroespinal [194, 195].

5.4. Marcadores del reservorio

Dada la amplia variedad de reservorios celulares y anatómicos, descubrir un marcador capaz de identificar las células que contienen virus competentes para la replicación facilitaría el desarrollo de estrategias dirigidas a erradicar la infección. Hasta ahora se han identificado varias moléculas y marcadores de agotamiento inmune, como CD2, CXCR3, CD32a, CD161, PD-1, TIGIT, CTLA-4 y TIM-3, que identifican células latentes enriquecidas en provirus con potencial de inducción y producción de antígenos virales [196]. Sin embargo, ninguno de los marcadores propuestos hasta la fecha engloba el total de células infectadas, y hacen falta más estudios para clarificar su relevancia. No obstante, han supuesto un progreso importante, y un avance en el conocimiento de los reservorios. Tal es el caso de CD30, una molécula que pertenece a la familia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNF) que se encuentra expresada en linfoma de Hodgkin y otros linfomas agresivos, además de en una pequeña proporción de linfocitos en ausencia de patología [197]. Varios virus inducen su expresión, y en el contexto de la infección por VIH, un estudio ha demostrado que las células T CD4⁺ con expresión de CD30 están altamente enriquecidas en ARN viral en individuos VIH⁺ en tratamiento, tanto en sangre como en intestino [198], constituyendo por tanto un marcador del reservorio activo. Además, tras interrupción del TAR y previamente a que ocurra el rebote viral, parece producirse un incremento significativo de células T CD4⁺ CD30⁺ en los pacientes, por lo que CD30 podría ser útil como marcador de replicación temprana [199]. Por otro lado, CD20 es un conocido marcador de células B, que también se ha encontrado expresado en una pequeña población de células T CD4⁺, viéndose incrementada su frecuencia tras infección por VIH [107]. Las células T CD4⁺ CD20⁺ presentan enriquecimiento en ARN viral en sangre y en tejidos como los ganglios linfáticos, siendo por tanto otro marcador del reservorio viral activo [107]. Es de destacar, que el ataque a estos reservorios activos mediante anticuerpos específicos, brentuximab en el caso de CD30 y rituximab dirigido a CD20, consiguió reducir parcialmente la carga de células infectadas. Otro marcador relevante podría ser CD32a, un receptor de baja afinidad por la porción constante de inmunoglobulinas G, usualmente expresado en células mieloides y plaquetas [200]. CD32a es probablemente el marcador de células reservorio con mayores implicaciones en la persistencia viral. Se expresa en una pequeña proporción de células T CD4⁺, cuya frecuencia se ve incrementada tras la infección por el VIH [201]. En individuos infectados y con carga viral suprimida gracias al TAR, se ha demostrado que las células T CD4⁺ CD32⁺ pueden contener genomas latentes [202, 203], pero sobre todo conforman una subpoblación enriquecida en VIH en estado transcripcionalmente activo, en sangre y en importantes reservorios anatómicos como los ganglios linfáticos e intestino [201, 204, 205]. Otras propiedades, como un enriquecimiento en moléculas asociadas a una mayor susceptibilidad a la infección y persistencia a largo plazo, como $\alpha 4\beta 7$, CXCR4, CXCR6 o receptores de IL-2 (CD122 y CD132), hacen de las células CD32⁺ un importante reservorio para el VIH [125]. Diversas cuestiones, como el papel y consecuencias que la expresión de un receptor Fc puede tener en linfocitos T CD4⁺, así como los mecanismos que facilitan la supervivencia y persistencia de células con

expresión viral activa en pacientes VIH⁺, permanecen sin resolver, y ha sido objeto de estudio del trabajo presentado en el **CAPÍTULO 1** de la presente tesis.

5.5. Generación de células reservorio latentes

A diferencia de lo que ocurre en personas VIH⁺ que no han recibido tratamiento para la infección, en las que es posible detectar grandes cantidades de células productivamente infectadas [206], aquellos pacientes que toman TAR presentan principalmente células reservorio en estado latente, es decir, con provirus con escasa o nula actividad transcripcional [49]. Cómo se establece esta infección latente sigue siendo a día de hoy objeto de debate. Dos modelos: latencia post-activación y latencia pre-activación, tratan de explicarlo.

5.5.1. Latencia post-activación

Este modelo se basa en la idea de que las células latentes se generan a partir de células productivamente infectadas que revierten a un estado de reposo, es decir, en la transición de las células desde un estado activado, lo cual facilita su infección, a un fenotipo de reposo, que iría acompañado del silenciamiento viral [207].

En el contexto de una respuesta inmune, cuando los niveles de antígeno a combatir decaen, se produce la fase de contracción de dicha respuesta y un grupo de células activadas sobrevive y pasa de un fenotipo efector a uno de memoria. Estas células sobre-expresan el correceptor CCR5, lo que conlleva su permisividad a la infección VIH, y además están programadas transcripcionalmente para convertirse en células quiescentes, un estado que favorece la latencia viral [207]. Otro factor que influye en la generación de células T CD4⁺ de memoria es la fuerza de estimulación del TCR [208]. Señales de activación de baja o media intensidad predisponen a las células a la infección latente [209, 210].

5.5.2. Latencia pre-activación

Este modelo postula la infección directa de células en reposo y el establecimiento directo de la latencia. Las células T CD4⁺ en reposo son bastante refractarias a la infección debido a bloqueos en distintos pasos del ciclo del virus como la entrada, transcripción inversa, importación al núcleo y expresión génica viral [211-213]. Sin embargo, determinadas quimiocinas, como por ejemplo CCL9 y CCL20, implicadas en la migración de células a los ganglios linfáticos y el tejido linfoide asociado al intestino a través de CCR7 y CCR6 respectivamente, parecen incrementar la susceptibilidad a la infección de células T CD4⁺ en reposo [214]. Estos hallazgos de un modelo in vitro están en línea con la importante contribución de las células CCR7⁺, como las T_{CM}, al reservorio [113]. Otro modelo de latencia in vitro mostró la posibilidad de generar células latentes mediante exposición de células en reposo a TGF- β e IL-7 [215]. IL-7 es una citoquina implicada en la homeostasis de células T, que además puede modular la actividad del factor de restricción SAMHD1, e incrementa la permisividad de células en reposo a la infección por VIH [216, 217]. Además, CD127, la cadena α del receptor IL-7, se ha identificado como un marcador de susceptibilidad a infección latente de células T CD4⁺ de memoria aisladas de tejidos [218].

5.5.3. Mecanismos implicados en la latencia

En el establecimiento y mantenimiento de la latencia intervienen diversos mecanismos, por ejemplo procesos de condensación de la cromatina que reprimen la transcripción de ARN y la expresión génica [219]. Otros condicionantes como el sitio de integración, niveles bajos de factores de transcripción y de la proteína viral Tat, interferencia transcripcional, y defectos en el *splicing* y exportación del ARN, han sido descritos. Así, son diversos los bloqueos que se deben superar para que se produzca la expresión de los genes del VIH, y que por tanto favorecen la latencia viral.

Un factor clave en el mantenimiento de la latencia es el lugar de integración del genoma viral en la célula huésped, como se ha demostrado recientemente en una pequeña población de individuos infectados capaces de controlar la infección sin necesidad de tratamiento, denominados controladores de élite. Estos pacientes presentan un reservorio mayoritariamente en un estado de latencia profunda, que viene dado por una localización preferencial de los genomas virales en regiones centroméricas y con características de heterocromatina, lo cual explicaría en parte su mayor capacidad para controlar el virus [220].

Las células T CD4⁺ en reposo o *resting* contienen niveles elevados de heterocromatina, en un estado condensado, que limitan la expresión viral [221]. Una explicación posible para el fenómeno de la latencia en estas células podría ser por tanto una integración preferente del VIH en regiones de heterocromatina. Sin embargo, se conoce a partir del análisis in vivo de células T de personas VIH⁺ en tratamiento, que la mayoría de los eventos de integración ocurre en intrones de genes con transcripción activa [222, 223]. Esto implica por tanto que otros mecanismos intervienen en el mantenimiento de la latencia viral, como es el caso del silenciamiento epigenético. Hay evidencias de elementos epigenéticos represivos que impiden la iniciación de la transcripción viral, así como posibles bloqueos posteriores a nivel de la elongación, atribuidos a niveles bajos de Tat y del factor de transcripción P-TEFb [224]. Durante la latencia, el promotor del VIH está fuertemente controlado por mecanismos epigenéticos, que incluyen la metilación del ADN [225, 226] y modificaciones post-traduccionales de las histonas, como la acetilación [227, 228]. Incluso si ambas, iniciación y elongación, transcurren con éxito, aún se pueden dar interferencias que impidan la expresión génica viral productiva, dependientes de la orientación del VIH respecto al gen celular [222, 229].

Además de los citados mecanismos, hay un componente estocástico en la transcripción del VIH, debido probablemente a factores celulares como el estado metabólico o punto del ciclo celular en que se encuentran [230].

5.6. Reservorios activos del VIH

Como se ha comentado en los apartados anteriores, la mayor parte de células persistentemente infectadas contienen VIH en estado latente. Sin embargo, estudios recientes han obligado a revisar y ampliar la visión clásica del reservorio. Varios estudios, han puesto de manifiesto la persistencia de células que cumplen con la definición de reservorio y que además presentan transcripción viral activa y producen proteínas virales [99]. Una fracción de entre el 2-18 % de todas las células infectadas es activa para la transcripción y producción de proteínas del VIH bajo tratamiento antirretroviral, y conforman el reservorio activo [231-233]. En el pasado, estas

células con actividad proviral quedaban excluidas sistemáticamente de los estudios debido a varias asunciones. Una de ellas es que las células activadas, usualmente asociadas a expresión viral, se consideraban de corta vida y por tanto improbable que formasen parte del reservorio. Por otro lado, se esperaba que la transcripción activa y la producción de partículas virales resultara en la eliminación de estas células bien por la propia citotoxicidad viral o por acción del sistema inmune [109]. Sin embargo, diversas investigaciones han indicado que células con un fenotipo no activado o de reposo también pueden transcribir VIH [234], que clones de células infectadas con genomas intactos y transcripción viral activa pueden persistir durante años [120, 231, 232, 235], y que los reservorios activos podrían ser la causa de la viremia residual evidenciada en los pacientes en tratamiento y con carga viral fuertemente suprimida [235]. Estos estudios han posicionado al reservorio activo como un componente fundamental a investigar, para el diseño de estrategias dirigidas a erradicar la infección. En sangre, las células T_{EM} y T_{TM} , células con vida media relativamente cortas, son las poblaciones que más contribuyen a la transcripción activa del VIH [105, 154]. En los ganglios linfáticos, la población Tfh está altamente enriquecida en ARN viral y VIH competente para la replicación [135, 136]. De forma similar, en el tracto genital femenino, las células T $CD4^+$ con fenotipo T_{RM} contienen VIH transcripcionalmente activo [125]. Algunas de estas subpoblaciones y compartimentos anatómicos podrían constituir santuarios para la persistencia viral incluso bajo tratamiento y podrían promover un rebote viral en caso de interrupción del mismo. Respecto a marcadores del reservorio, como se ha comentado anteriormente, las moléculas CD30, CD20 y CD32a podrían ayudar a identificar estos reservorios activos [196]. Aspectos clave como la dinámica de expresión viral, constitutiva o intermitente, en estos clones de células activos, o si el sistema inmune es capaz de reconocerlos adecuadamente son cuestiones aún por resolver. El trabajo presentado en el **CAPÍTULO 1** de la presente tesis se centra en la capacidad de reconocimiento y eliminación por parte de células NK de distintas subpoblaciones T $CD4^+$ que constituyen reservorios del VIH, profundizando en posibles mecanismos de persistencia del reservorio activo $CD32^+$.

5.7. Mecanismos de persistencia del reservorio

La persistencia del VIH bajo presión del TAR se puede ver facilitada por distintos factores descritos hasta ahora, y que incluyen el estado de latencia proviral en células de larga vida media, mecanismos de expansión clonal y disfunción del sistema inmune.

I) El estado de latencia proviral en la mayoría de células reservorio les ayuda a escapar de la acción de los fármacos y del reconocimiento por parte del sistema inmune. En células con larga vida, ello asegura la persistencia del VIH a largo plazo.

II) Expansión clonal de las células infectadas. Diversos estudios han mostrado que la expansión clonal es uno de los principales mecanismos de persistencia del VIH. El descubrimiento de multitud de células con provirus integrado exactamente en la misma posición del genoma en un determinado paciente, es una prueba directa de la proliferación de las células latentes [236-240]. Se han descrito varios estímulos que pueden inducir este proceso de proliferación. La integración del VIH en genes pro-crecimiento o relacionados con el ciclo celular podría contribuir a la proliferación de algunos clones de células infectadas [236, 237]. Los resultados de otro estudio sugirieron que la proliferación homeostática inducida por las citoquinas IL-7 e IL-15

podría incrementar el número de células infectadas in vivo [113]. La proliferación inducida por antígeno también ha sido propuesta, encontrándose clones de células infectadas posiblemente expandidos en respuesta a antígenos tumorales o derivados de co-infecciones por citomegalovirus (CMV) y virus Epstein-Barr [239, 241].

La expansión clonal parece darse con mayor frecuencia en células portadoras de genomas VIH defectivos [238], aunque también se ha evidenciado expansión clonal de provirus competentes para la replicación [239, 240, 242, 243]. Esto último, la supervivencia y proliferación de células con genomas virales competentes, pone de manifiesto la existencia probablemente de otros mecanismos de persistencia viral, como el desarrollo de resistencias a determinadas respuestas inmunes [244]. Otra explicación alternativa podría ser la menor susceptibilidad a la inducción de expresión génica viral por parte de algunos provirus competentes [159, 240], debido por ejemplo a una influencia negativa ejercida por el estado transcripcional o metabólico de las células T CD4⁺, que por tanto facilitarían la proliferación.

III) Ciclos continuos de replicación del VIH a pesar del TAR. La existencia de ciclos de replicación continuada de bajo nivel en los pacientes en tratamiento, es objeto de controversia. La combinación de fármacos antirretrovirales suprime la replicación del VIH y reduce los niveles de ARN viral hasta niveles indetectables en sangre, sin embargo la capacidad para hacer lo propio en el tejido linfoide no está del todo clara. Estos tejidos son una fuente de producción viral, almacenamiento de partículas virales y persistencia viral incluso en presencia del TAR [135, 136, 245]. Una de las causas podría ser una menor acumulación de los fármacos en el tejido linfoide comparado con la sangre [178]. En este sentido, varios estudios han evaluado los efectos de una intensificación del tratamiento y los resultados sugirieron un impacto en el reservorio y en la activación inmune, encontrando niveles incrementados de formas virales no integradas que podrían indicar la existencia de nuevos ciclos de replicación en los pacientes tratados [246, 247]. En un principio, también parecía posible la idea de la replicación viral continuada como mecanismo responsable de la viremia residual en el plasma de pacientes a pesar del TAR [248, 249]. En este sentido, ensayos de alta sensibilidad permiten detectar en todos los individuos bajo tratamiento, una viremia residual a menudo en el rango de 1-3 copias/ml [101, 103]. Sin embargo, ésta parece provenir mayoritariamente del reservorio latente, de clones expandidos mediante proliferación y que podrían comprender una pequeña fracción que producen virus [250], y no de ciclos de replicación completa activa, como han demostrado varios estudios basados en la intensificación del TAR y que fallaron en reducir la viremia residual [251, 252].

Por otro lado, una posible consecuencia, aunque no necesaria, de la generación de nuevas infecciones a pesar de la presión ejercida por el TAR, incluye cambios en la secuencia del genoma dada la alta tasa de error de la enzima transcriptasa inversa, y la aparición de mutaciones de resistencia. En este sentido, numerosos estudios han mostrado que las secuencias de los provirus integrados en células de la sangre, y del ARN viral en plasma, no evolucionan en función del tiempo [113, 253-256]. Por el contrario, un estudio encontró evidencias de evolución usando muestras de ganglio linfático [245]. Debido a la dificultad de obtención de muestras de tejido, o muestras con el tamaño suficiente para realizar este tipo de estudios, aún estaría por demostrarse si verdaderamente una diversificación genética tiene lugar en pacientes suprimidos.

IV) Disfunción inmunológica. Otra barrera que dificulta la eliminación de los reservorios del VIH es la disfunción que presentan distintas poblaciones inmunes, con funciones citolíticas comprometidas debido a la cronicidad de la infección. Esta disfunción puede ocurrir a varios niveles: en la capacidad de reconocer las células infectadas, respuestas efectoras hipofuncionales debido a una exposición continuada a antígenos, y exclusión relativa de determinados compartimentos anatómicos que representan un santuario para el VIH como los ganglios linfáticos.

Los linfocitos T citotóxicos (CTL) son un componente principal de la respuesta contra el VIH [257]. Mutaciones de escape en epítomos virales dominantes que dificultan el reconocimiento de las células infectadas por parte de los CTLs han sido descritas [258]. Por otro lado, el exceso de provirus defectivos, algunos de los cuales pueden producir epítomos reconocidos por clones de células T específicos, pueden inducir respuestas subóptimas mediadas por estas células [161, 162]. Además, el TAR disminuye la frecuencia de células T CD4⁺ específicas para el péptido viral Gag, lo cual tiene a su vez un impacto en las respuestas de memoria mediada por las células T CD8⁺ [259]. El TAR no revierte tampoco al completo defectos inducidos en las respuestas inmunes mediadas por células T CD4⁺ y T CD8⁺, que muestran signos de agotamiento [260-262]. Lo mismo ocurre con otras poblaciones inmunes con importantes funciones antivirales, como las células NK, que muestran signos de activación persistente a pesar de la supresión viral [263, 264].

Otro concepto que apoyan investigaciones recientes, conocido como edición inmune del reservorio, es la selección de determinadas poblaciones infectadas in vivo durante el TAR, debido a adaptaciones que les permiten sobrevivir a las respuestas inmunes en el huésped [265]. Ello implica una susceptibilidad diferencial de algunas subpoblaciones de células reservorio al sistema inmune. Ejemplo de ello es la sobreexpresión en células latentes de la proteína pro-supervivencia BCL-2, la cual confiere resistencia a la eliminación mediada por células T CD8⁺ [266].

5.8. Reversión de la latencia

Actualmente, la estrategia más explorada para intentar reducir o eliminar el reservorio se denomina “shock and kill” [267]. Consiste en revertir la latencia empleando distintos compuestos, de forma que se permita la expresión génica viral y promover así la eliminación de las células infectadas. Un estímulo fuerte para la reactivación, así como una respuesta eficiente contra las células infectadas son necesarios. Idealmente la reactivación debería inducir expresión del VIH sin causar activación global de la célula T, ya que en estudios iniciales resultó ser tóxico [268, 269]. Numerosas moléculas, denominadas agentes revertidores de la latencia (LRA, del inglés, *latency reversal agent*) se han identificado para tal fin. Estas incluyen: agonistas de la proteína quinasa C (agonista PKC), agonistas de proteínas quinasas activadas por mitógenos (agonista MAPK), antagonistas de CCR5, pequeñas moléculas miméticas de péptidos derivados de una proteína endógena inhibidora de apoptosis (*SMAC mimetics*), inductores de P-TEFb, activadores de la vía Akt, derivados de benzotriazol, moléculas inmunomoduladoras como agonistas de TLR, agonistas de IL-15 e inhibidores de puntos de control inmune como anticuerpos anti-PD-1; y modificadores epigenéticos de latencia, que incluyen inhibidores de las histonas desacetilasas (HDACi), inhibidores de la ADN metiltransferasa (DNMTi), e inhibidores

del bromodominio y el dominio extraterminal [270]. Estudios *in vitro* y *ex vivo* han mostrado efectos potentes mediante el uso de un único LRA o la combinación de varios, sin embargo, varios ensayos clínicos han fallado en el objetivo principal perseguido con estos compuestos, no consiguiendo una disminución del tamaño del reservorio *in vivo*. Algunos estudios observaron un incremento transitorio de ARN viral asociado a células [271] o de ARN viral en plasma [272]. En otro estudio se observó un cambio significativo en los niveles de ARN viral en plasma acompañado de una reducción del reservorio tras tratamiento con el anticuerpo nivolumab [273], dirigido al punto de control inmune PD-1; pero se encontraba limitado a un solo paciente, y estudios posteriores no han podido reproducir los resultados [274]. Otro estudio consistente en la combinación de una vacuna y la reactivación con romidepsina, demostró un impacto en el tamaño del reservorio, aunque no prolongó el tiempo hasta producirse un rebote viral tras interrupción del tratamiento [275]. Por tanto, a día de hoy, la estrategia “shock and kill” continúa siendo un concepto teórico más que una realidad terapéutica. Se requiere la investigación de LRAs más potentes y estrategias combinadas que fomenten la eliminación de las células infectadas, para así conseguir reducir los reservorios virales.

La falta de éxito en la erradicación del reservorio mediante el uso de los LRAs testados hasta ahora, se ha atribuido a varias causas, entre ellas a una poca capacidad para reactivar el reservorio latente [276] y una posible interferencia de algunos de los compuestos en la función efectora de las células inmunes [277-279]. Otros impedimentos incluyen la no eliminación de las células latentes tras la reactivación debido a factores como una cantidad insuficiente de antígenos virales presentados en superficie, disfunción de linfocitos citotóxicos [275, 280, 281], o mecanismos de resistencia de las células latentes [258, 282]. Un ejemplo de barrera intrínseca de las células latentes a la muerte celular es la disminución relativa de proteínas pro-apoptóticas en comparación a la expresión de proteínas anti-apoptóticas [283]. La principal conclusión extraída de los estudios de reversión de la latencia ha sido que la estimulación del sistema inmune es un requisito indispensable para eliminar los reservorios virales [282]. Algunas propuestas se están evaluando, y consisten por ejemplo en el uso de compuestos que hacen a las células latentes más susceptibles a la apoptosis, como podrían ser antagonistas de Bcl-2 [266, 284].

5.9. Retos en la erradicación de los reservorios

La erradicación basada en el TAR y la eliminación natural del reservorio se ha mostrado prácticamente imposible. La longevidad natural de las células T CD4⁺ favorece la persistencia de las células reservorio durante muchos meses, estimándose la vida media de esta población en aproximadamente 3,7 años [92]. Por tanto, la erradicación podría llevar hasta 73 años en un paciente con un reservorio de 10⁶ células [92]. Estudios posteriores, analizando muestras longitudinales de personas con regímenes de TAR más actuales han encontrado resultados similares, resaltando la estabilidad del reservorio [285]. Por tanto, es fundamental el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas que aceleren la eliminación del reservorio y lograr una cura para la infección.

La eliminación de todos los reservorios se refiere como cura esterilizante, y difiere de la denominada cura funcional en que en este último caso el reservorio permanece, pero se realizan

intervenciones en el sistema inmune con el objetivo de controlar la replicación viral sin TAR. Los individuos controlados de élite son un modelo importante para la cura del VIH, y sugieren que además de la reversión de la latencia viral, es necesario mejorar el reconocimiento y la respuesta inmune contra las células infectadas. La mayoría de esfuerzos se han dirigido a terapias citolíticas basadas en células T, debido a la fuerte presión que ejercen sobre el virus, y al hecho de que potentes respuestas CTL parecen determinar en parte el control viral logrado en controladores de élite [49]. Sin embargo, distintas propiedades de las células NK apuntan a que estos linfocitos podrían tener un papel clave en las estrategias de cura, y por tanto intervenciones destinadas a estimular y dirigir su respuesta hacia las células infectadas pueden ser de gran utilidad. Diversos aspectos sobre estas células se detallarán en el siguiente apartado.

6. CÉLULAS NATURAL KILLER

6.1. Descripción

Las células asesinas naturales (del inglés, *natural killer*) son un tipo de linfocitos desarrollados principalmente en la médula ósea, capaces de mediar potentes respuestas inmunes mediante la producción de citoquinas y actividad citotóxica directa [286]. Se encuentran distribuidas en la sangre, donde representan aproximadamente entre un 5 y un 15 % del total de linfocitos, y también en diversos tejidos linfoides y no linfoides, como la piel, intestino, hígado, pulmones y útero, entre otros [287]. Recibieron ese particular nombre por su capacidad para destruir células tumorales sin necesidad de contacto previo con el antígeno [288, 289]. El papel fundamental de estas células en la inmunidad antiviral también ha sido demostrado; de hecho, individuos con deficiencias de células NK presentan complicaciones, como infecciones virales recurrentes por herpesvirus o papilomavirus por ejemplo [290-293]. Desde su descubrimiento en los años 1970 hasta ahora, se ha avanzado mucho en el conocimiento de las células NK. Aun así son muchos los aspectos que permanecen sin resolverse sobre la biología y el funcionamiento de estos linfocitos.

Las células NK son miembros de la familia de células linfoides innatas (ILC, del inglés, *innate lymphoid cell*), que incluye también a las células ILC1, ILC2 e ILC3 [294]. NKs e ILCs derivan de un progenitor común a partir de células madre hematopoyéticas, siendo el desarrollo de las células NK dependiente de la señalización mediada por la interleuquina IL-15. A diferencia de las células T, las células NK carecen de receptores de reconocimiento de antígeno ni capacidad de reorganización de los mismos. Su identificación a nivel fenotípico se hace a partir de la exclusión de marcadores típicos de células T como el *cluster* de diferenciación CD3, y una serie de marcadores ampliamente expresados por ellas, entre los que destacan las moléculas CD56 y CD16. CD56 es una glicoproteína de adhesión celular también conocida como NCAM (del inglés, *Neural cell adhesion molecule*), y forma parte de la superfamilia de las inmunoglobulinas. De acuerdo a los niveles de expresión de CD56 en superficie, se pueden distinguir dos grandes subpoblaciones de células NK: una población con altos niveles (CD56^{bright}), considerada el estado más inmaduro, y otra población con niveles intermedios (CD56^{dim}) y propiedades de célula madura [295]. Estas subpoblaciones exhiben diferencias notables, por ejemplo en el potencial de proliferación o la actividad citolítica (**Figura 4**).

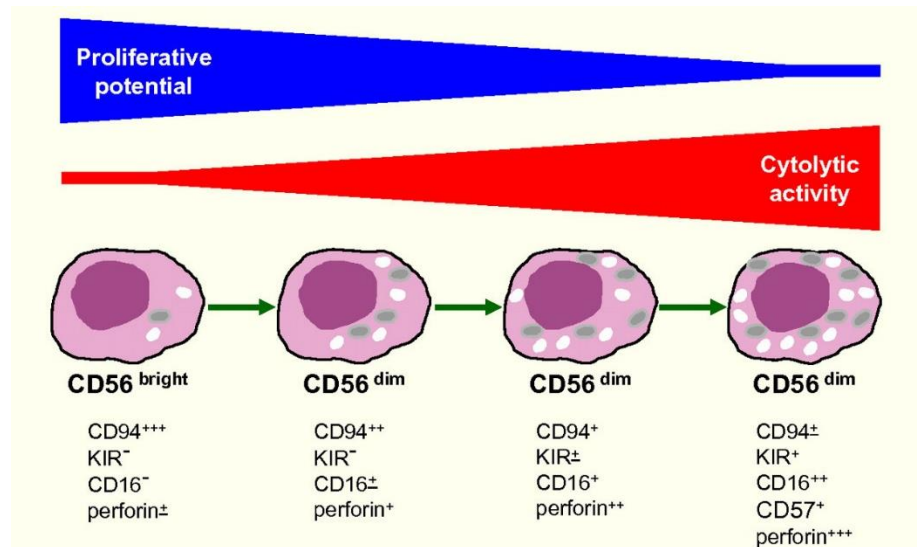


Figura 4. Esquema representativo de distintas subpoblaciones de células NK de acuerdo a los niveles de expresión de CD56, y sus capacidades relativas para proliferar o mediar respuestas citotóxicas. Imagen extraída del artículo [296].

Las células NK CD56^{bright} representan aproximadamente un 10% del total de células NK en sangre, y se caracterizan por tener una nula o escasa expresión de CD16 y por expresar CD25, el receptor de baja afinidad de la IL-2. Por otro lado, las células NK CD56^{dim} (aproximadamente el 90% de células NK en sangre), expresan CD16 y CD122/132, el receptor de afinidad intermedia por la IL-2. Otras diferencias entre estas dos subpoblaciones incluyen la expresión de moléculas de migración y las capacidades efectoras. Las células CD56^{bright} expresan CCR7, CXCR3 y CD62L, lo cual les permite migrar a órganos linfoides secundarios (en respuesta a CCL19 y CCL21); de hecho en estos tejidos la población de células NK CD56^{bright} es la mayoritaria [297, 298]. Además, las células CD56^{bright} se caracterizan por poseer niveles bajos de gránulos líticos y producir altas cantidades de citoquinas como IFN- γ , factor de necrosis tumoral TNF- α y factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF) tras activación por IL-2, IL-15 e IL-12. Por el contrario, las células más maduras CD56^{dim}, son menos respondedoras a la estimulación por citoquinas pero contienen gránulos cargados de moléculas citotóxicas como granzimas y perforinas, que les permiten mediar potentes respuestas citotóxicas de forma rápida. Además, la subpoblación CD56^{dim} puede migrar preferencialmente a tejidos periféricos inflamados mediante CXCR1, CX₃CR1 y ChemR23 en respuesta a sus correspondientes ligandos (IL-8, Fraktalkine y Chemerin), y también pueden producir cantidades abundantes de IFN- γ y otras citoquinas tras recibir señales de activación a través de distintos receptores activadores expresados en superficie [296]. Las células CD56^{dim} se considera un estado de desarrollo maduro de las células NK, y parecen provenir de un proceso de diferenciación que implica la pérdida de receptores inhibidores como NKG2A y la ganancia de expresión de otros como CD16, KIR (del inglés, *killer cell immunoglobulin-like receptor*) y CD57.

A pesar de esta clasificación, la población de células NK es extremadamente diversa, y estudios recientes usando citometría de masas y una combinación de anticuerpos específicos para distintos marcadores expresados por ellas, han estimado hasta 30.000 subpoblaciones fenotípicas en sangre periférica de donantes sanos [299, 300]. Parte de esta heterogeneidad

podría ser el reflejo de distintos estados de desarrollo o activación de las células en circulación, más que subpoblaciones estables y funcionalmente distintas.

6.2. Receptores de las células NK

Las células NK poseen mecanismos para discriminar entre células anómalas y células sanas en el organismo. Su sistema de detección consta de una variedad de receptores expresados en superficie, algunos de los cuales tienen naturaleza activadora mientras que otros poseen función inhibitoria. El resultado global de la integración de señales recibidas a través de estos receptores tras la interacción con células del entorno, determina la activación de la célula NK y la decisión de atacar o no a la célula diana [301, 302].

Receptores activadores

En humanos, entre los receptores activadores más importantes implicados en la eliminación de células diana, se incluye a los receptores de citotoxicidad natural (NCRs), NKG2D, NKG2C y CD16. Estos receptores reconocen ligandos cuya expresión se produce *de novo*, o se incrementa tras procesos de estrés celular, infección viral o transformación tumoral [303].

Los NCRs son moléculas transmembrana que pertenecen a la familia de proteínas de tipo inmunoglobulina, y constan de 3 miembros: NKp46, NKp44 y NKp30. Su función es importante para inducir citotoxicidad contra tumores y células infectadas. NKp46 y NKp30 son expresados por casi todas las células NK en estado quiescente, y además su expresión se ve incrementada tras la activación celular. Por el contrario, NKp44 se expresa constitutivamente solo en la subpoblación CD56^{bright}, pero prácticamente todas las células NK activadas por citoquinas adquieren este receptor. Diferentes moléculas pueden interactuar con los dominios extracelulares de los NCR. Algunas de ellas son moléculas derivadas de virus que pueden activar las respuestas efectoras mediadas por células NK, como por ejemplo la proteína HA derivada del virus de la influenza, reconocida por NKp46 o NKp44 [304]. Otros ligandos para los receptores NCR son proteínas intracelulares que pueden encontrarse en la superficie celular en respuesta a estrés o transformación tumoral, como BAT3/BAG6, MLL5 y PCNA [305]. Además, recientemente se ha descubierto la capacidad de NKp46 y NKp44 para reconocer ligandos extracelulares [303]. Es de destacar que en la infección por VIH, las células NK de los pacientes infectados muestran una expresión reducida de NCRs [306].

NKG2D es otro receptor activador importante. Se trata de un receptor lectina tipo C, que también se puede encontrar en células T citotóxicas. Ligandos reconocidos de este receptor son ULBP-1 y MICA/B, que son homólogos estructurales de moléculas MHC de clase I, y que se encuentran expresados en células infectadas, estresadas y células tumorales [307, 308].

NKG2C es un receptor activador que tras interacción con su ligando celular, activa respuestas citotóxicas por parte de la NK y la producción de moléculas inflamatorias contra células viralmente infectadas. Se expresa en las últimas etapas de maduración de las células NK. Estudios recientes han revelado que las células NK NKG2C⁺ pueden poseer características de células adaptativas, siendo capaces de detectar péptidos específicos del CMV unidos a HLA-E, y de proliferar selectivamente en respuesta a determinadas combinaciones de péptidos.

Actualmente se emplea el término *adaptive* o *memory-like* para designar a la subpoblación de células NK NKG2C^{bright}, la cual se caracteriza por tener un fenotipo CD56^{dim} CD57⁺ KIR⁺ NKG2A^{neg}, y se expande en donantes infectados por CMV [309]. La expansión de células NK NKG2C⁺ ha sido también descrita en otras infecciones como VIH, hantavirus, chikungunya y SARS-CoV-2 [310].

Otras moléculas, entre las que se incluyen 2B4, NTB-A, DNAM-1, CD59 y NKp80 actúan como correceptores y pueden amplificar la señal de activación de la célula NK inducida por NCRs o NKG2D. Además, la expresión de TLRs en las células NK puede inducir también una activación potente de las mismas después de la interacción con productos virales o bacterianos, y en presencia de citoquinas pro-inflamatorias [303].

Finalmente, el receptor CD16 ocupa un lugar destacable entre los receptores activadores de las células NK. Es un receptor de baja afinidad por la porción constante de inmunoglobulinas G (IgG), y permite a las células NK mediar un importante mecanismo inmune conocido como citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) [311]. Una respuesta de tipo ADCC ocurre cuando un anticuerpo específico se une a su antígeno en la célula diana mediante el fragmento variable, mientras deja expuesto el fragmento cristalizante o porción constante (Fc) de forma que puede interactuar con receptores Fc como CD16, ampliamente expresado en células NK. La interacción a través del receptor Fc inicia eventos de señalización que conducen a la producción de moléculas líticas por parte de la NK y que resultan finalmente en la eliminación de la célula anómala. La expresión de CD16 se restringe a las células NK maduras CD56^{dim}.

Receptores inhibidores

Un componente fundamental para la regulación de la función de las células NK son los receptores inhibidores específicos de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad o HLA de clase I. De hecho, el reconocimiento de moléculas HLA clase I expresadas en células sanas por parte de estos receptores inhibidores, previene el ataque de las células NK y por tanto el daño a tejidos sanos. Las células NK humanas expresan 2 clases de receptores inhibidores específicos de HLA clase I: I) miembros de la familia KIR/CD158; II) el heterodímero CD94/NKG2A (CD94/CD159a) [303].

Los KIRs son receptores transmembrana específicos de moléculas polimórficas HLA-A, B y C, mientras que NKG2A es un receptor transmembrana que puede interactuar con HLA-E, una molécula HLA no clásica y de polimorfismo limitado [312]. Ambos tipos de receptores contienen motivos inhibidores basados en tirosina (ITIM) en su cola citoplasmática a través de los cuales inducen señales inhibitorias. Los KIRs inhibidores se caracterizan por tener colas citoplasmáticas de longitud larga ("L", del inglés *long*, en la nomenclatura de estos receptores). Además, se han identificado formas activadoras de receptores KIR y se caracterizan por poseer colas citoplasmáticas más cortas ("S", del inglés *short*, en la nomenclatura) y un residuo básico dentro del dominio transmembrana, que facilita su interacción con proteínas adaptadoras que contienen dominios de activación basados en tirosina (ITAM). Respecto al dominio de tipo inmunoglobulina, cada KIR tiene dos o tres dominios de este tipo (denominados D0, D1, D2),

dando lugar a la nomenclatura KIR2D-KIR3D. No solo las moléculas HLA de clase I, sino también los KIRs, se caracterizan por poseer altos niveles de polimorfismo. Quince genes KIR han sido identificados en humanos, existiendo una diversidad genética remarcable en el loci, lo cual resulta en diferencias significativas entre individuos en el repertorio de KIRs que expresan [313]. Esto tiene un impacto en las interacciones KIR/HLA, y ciertas combinaciones correlacionan con una mayor protección o susceptibilidad a enfermedades infecciosas o autoinmunes. A modo de ejemplo, varios estudios han mostrado que individuos VIH⁺ que expresan el alelo del KIR3DS1 (receptor activador) y alelos de HLA clase I que codifican una isoleucina en la posición 80 (HLA-Bw480I), exhiben una progresión lenta a SIDA y tienen células NK con mayor capacidad citotóxica, de producción de IFN- γ y de suprimir la replicación viral [314].

Por su parte, NKG2A, al igual que NKG2C, puede interactuar con moléculas HLA-E, aunque en este caso con mayor afinidad [315]. Junto con los KIR inhibidores, NKG2A puede prevenir la respuesta contra células con expresión normal de moléculas HLA-I. NKG2A se expresa principalmente en células NK inmaduras en sangre periférica.

La población de células NK madura está dotada de al menos un receptor inhibidor para antígenos propios HLA-clase I, bien sea un KIR o NKG2A. Solo una pequeña fracción de células NK de sangre periférica puede carecer de estos receptores y son anérgicas [316]. El repertorio de receptores inhibidores se configura durante la maduración de células NK y es el resultado de un proceso de selección denominado “educación de la célula NK” o “NK *licensing*” [316, 317]. Consistentemente, solo las células NK que expresan estos receptores adquieren pleno potencial funcional, mientras que las demás son eliminadas o resultan anérgicas [318].

Además de los receptores inhibidores específicos de HLA, otros puntos de control de la función NK han sido descritos, como PD-1, TIGIT, CD96, TIM-3 o KLRG1. Algunos de ellos son inducidos en condiciones patológicas y pueden afectar a la respuesta inmune mediada por células NK tras interacción con sus ligandos [303].

6.3. Activación y mecanismos efectores de células NK

Como se ha comentado anteriormente, la activación de las células NK depende de un balance complejo de señales recibidas a través de sus receptores. Varios eventos pueden inclinar la balanza hacia la activación celular.

1) La disminución de moléculas HLA clase I en la superficie de la célula diana, reduciéndose por tanto las señales inhibitorias transmitidas a través de los receptores KIR, por ejemplo. Aunque esto podría no ser suficiente, ya que para una activación completa de la célula NK se requiere además señales activadoras inducidas por moléculas de estrés [319].

2) El reconocimiento a través de receptores activadores como NCRs de moléculas expresadas en células anómalas.

- 3) El reconocimiento mediante el receptor CD16 de anticuerpos IgG unidos a células anómalas, y activación de una respuesta tipo ADCC.
- 4) Interacción con otros tipos celulares como células dendríticas [71].

Una vez activadas, las células NK citotóxicas pueden inducir la lisis de la célula diana a través de la liberación de perforinas y granzimas o la secreción de citoquinas. Las perforinas son proteínas que inducen poros en la membrana celular y provocan la lisis de la célula diana. Por otro lado, las granzimas entran mediante endocitosis e inducen apoptosis mediante activación de las caspasas [320]. La activación NK produce también citoquinas como IFN- γ , TNF- α , IL-17 e IL-12, o proteína inflamatoria de macrófagos (MIP-1) α , que amplifican la respuesta inmunitaria [321]. El IFN- γ es una de las citoquinas efectoras más potentes, y tiene un papel importante en la activación de macrófagos y potenciación de la fagocitosis, lo cual favorece la actividad microbicida. Además, las células NK pueden potenciar la respuesta mediada por linfocitos T colaboradores mediante la inducción de la producción de IL-12 por parte de macrófagos y células dendríticas, favoreciendo una respuesta Th1. Otro proceso mediante el cual las células NK pueden eliminar células anómalas es la inducción de muerte a través de ligandos de apoptosis. Las células NK expresan el ligando del receptor TNF y el receptor Fas; estos son TNF y TRAIL, respectivamente. Tras la unión de estos ligandos a su correspondiente receptor en la célula diana, se induce un cambio conformacional en el receptor y el reclutamiento de proteínas adaptadoras que conducen a la apoptosis [322].

Además, recientemente se han descrito respuestas mediadas por células NK que antes se asociaban exclusivamente a la inmunidad adaptativa, como la capacidad de adaptación y memoria específica de antígeno [323]. Las células NK exhiben tres tipos de memoria innata y respuestas de tipo memoria dependiendo del estímulo inicial: inducida por haptenos, por citoquinas, o por infecciones virales [310]. Respecto a esta última, mediada por células NK conocidas como adaptadas, se ha caracterizado sobre todo en el contexto de la infección por CMV, detectando células NK con un fenotipo específico y capacidad de memoria, expansión y activación a largo plazo, generando protección frente a la infección [324, 325]. Respuestas de tipo memoria frente a otras infecciones se están explorando actualmente. Hasta la fecha, solo unos cuantos estudios apoyan la existencia de respuestas específicas de antígeno mediadas por células NK en humanos, y han sido descritas para CMV, virus varicela-zoster, hepatitis B, hepatitis C y el bacillus Calmette-Guérin [326-330]. El mecanismo detrás de este tipo de respuesta aún no ha sido completamente elucidado. En el campo del VIH también hay un gran interés en el estudio de estas células NK con potenciales propiedades de memoria [331].

La gran variedad y potencia de respuestas inmunes mediadas por las células NK, sitúan a estos linfocitos como potenciales candidatos para el desarrollo de inmunoterapias en diversas condiciones patológicas, como la infección por VIH.

6.4. Células NK en la infección por VIH

La infección por el VIH provoca diversas alteraciones en el compartimento de las células NK, tanto en frecuencia como en su capacidad funcional. Uno de los cambios más destacados es la expansión de una subpoblación de células NK negativa para la molécula CD56, la cual exhibe baja capacidad citotóxica y de producción de citoquinas. Esta población se expande en favor de la disminución de otras subpoblaciones, principalmente las células CD56^{dim}, debido a una activación inmunológica excesiva a consecuencia de la infección progresiva [332, 333]. La terapia antiretroviral revierte algunas de las alteraciones inducidas por el virus, sin embargo otras permanecen, como una activación persistente de las células NK en los individuos tratados [263]. Otros defectos inducidos por la infección crónica incluyen la regulación negativa de correceptores activadores, o de ligandos expresados en las células infectadas, por parte de proteínas del virus. Por ejemplo, Vpu puede disminuir los niveles de NTB-A, que en condiciones normales actúa como un correceptor activador para NKG2D, y por tanto esta proteína viral podría contrarrestar la eliminación de las células infectadas [334]. La respuesta ADCC también se ve afectada en la infección crónica, debido a un proceso multifactorial, como la disminución de los niveles de CD16 o estrategias de escape viral que dificultan el reconocimiento de antígenos del VIH por parte de algunos anticuerpos [335]. En este caso, la terapia antiretroviral suprime la replicación viral y hace que disminuyan también los niveles de anticuerpos específicos de VIH. Aun así, en los pacientes VIH⁺ bajo tratamiento se pueden detectar respuestas de tipo ADCC [336]. El impacto que las respuestas de tipo ADCC pueden tener en la persistencia de las células reservorio se desconoce a día de hoy, y ha sido objeto de estudio del trabajo descrito en el **CAPÍTULO 1** de la presente tesis.

En resumen, distintas manifestaciones durante la infección por VIH en pro de disminuir o evitar el reconocimiento y eliminación por parte de las células NK, sugieren el potencial de estas células como aliados para eliminar las células infectadas.

6.5. Células NK: potenciales aliados en la lucha contra los reservorios del VIH

Los resultados de varios estudios apuntan a las células NK como un componente esencial para el control del VIH y la eliminación de las células infectadas. Respuestas más potentes mediadas por las células NK en cohortes de pacientes con una habilidad superior para controlar o evitar la infección, la capacidad para mediar diferentes respuestas inmunes, entre las que destacan el mecanismo ADCC, y la implicación de estas células en la eliminación de células infectadas en importantes reservorios anatómicos como los ganglios linfáticos, así lo apoyan.

Papel de las células NK en individuos resistentes a la infección y VIH⁺ controladores naturales

Cada vez se dispone de más evidencia del papel protector de las células NK contra la infección VIH. En individuos resistentes a la infección a pesar de estar continuamente expuestos (HESN, del inglés, *HIV-exposed seronegative*), se ha demostrado una función mejorada de las células NK, con capacidades aumentadas para la producción de citoquinas, principalmente IFN- γ , y para la degranulación [337-339], acompañado en algunos casos de alelos KIR/HLA asociados a actividad funcional elevada [340]. De forma similar, en la cohorte de pacientes controladores y que progresan de forma lenta a SIDA, la resistencia a la progresión se ha asociado a la expresión

de alelos KIR favorables [341, 342], al mantenimiento de células NK con perfil citotóxico y/o polifuncional [342], y a una baja frecuencia de subpoblaciones NK disfuncionales, además de mayor actividad ADCC [333].

Presión de las células NK contra los reservorios virales

Estudios anteriores han apuntado también al importante papel de las células NK en la configuración del reservorio, a través de varios mecanismos y en combinación con estrategias terapéuticas como la interrupción de la latencia. En este sentido, la inducción de células NK con un perfil transcripcional y funcional determinado, concretamente la producción de IFN- γ y expresión de los receptores activadores NKp46/NKp30, se asoció al control y el tamaño del reservorio in vivo [343]. Asimismo, en un estudio diseñado para revertir la latencia viral en individuos VIH⁺ en tratamiento mediante el uso del inhibidor HDAC panobinostat, se observó una caída de los niveles de DNA viral, que fue acompañada de un incremento en las proporciones de células NK [344]. Otro estudio, exploró el tratamiento con IFN- α de pacientes coinfectados por VIH y hepatitis C previamente tratados con TAR durante largos períodos de tiempo, y los resultados arrojaron una correlación entre los niveles de células NK CD56^{bright} y la reducción del DNA viral asociado a las células T CD4⁺ durante el tratamiento con IFN- α [345]. Resultados similares en cuanto a la reducción de los niveles de DNA viral integrado tras el tratamiento con IFN- α fueron obtenidos en otro estudio, y en este caso la reducción confluyó también en un patrón de expresión génica indicativo de activación y citotoxicidad mediada por células NK [346]. Estos resultados podrían ser indicativos de que una actividad funcional óptima de las células NK, fomentada a través de distintas estrategias como se está explotando en la investigación contra el cáncer [347], podría incrementar la eliminación de las células latentes tras la reactivación viral.

Por último, cabe destacar un estudio con *African Green monkeys*, un huésped natural del virus de la inmunodeficiencia simia que no progresa a SIDA, donde los autores hallaron células NK infiltradas en los folículos de los ganglios linfáticos. Además, la depleción de estas células NK incrementó la replicación viral en los folículos [348], indicando el papel que estas células podrían tener en el control del VIH en reservorios anatómicos tan relevantes como el tejido linfoide.

ADCC en la protección contra la infección y eliminación de los reservorios

La respuesta inmune ADCC podría ser un importante mecanismo protector frente a la infección VIH. Así lo indican varios estudios clínicos en humanos y en modelos animales [349-354]. Hasta ahora, solo una vacuna ha mostrado una eficacia parcial en humanos, con un 30% aproximadamente de protección contra la adquisición de VIH. Se trata del ensayo clínico RV144, llevado a cabo en Tailandia, y el efecto protector observado fue asociado en estudios posteriores a niveles superiores de anticuerpos dirigidos a la región V1/V2, así como mayor actividad ADCC en presencia de niveles reducidos de IgA [353, 354]. Los resultados de este ensayo clínico generaron interés en el uso e inducción de anticuerpos con capacidad activadora del sistema inmune, a través de interacción con receptores Fc, para prevenir la infección por el VIH e incluso como posible estrategia de tratamiento y eliminación de las células reservorio. Varios trabajos han arrojado interesantes resultados sobre la utilidad de la respuesta ADCC en la protección contra el VIH, algunos de los cuales en modelos animales no han sido tan alentadores, y por

tanto han dificultado sacar conclusiones claras sobre el impacto real del mecanismo ADCC en la prevención de la infección o en estrategias de cura. La **Tabla 1** resume los resultados obtenidos en diferentes estudios sobre el efecto del mecanismo ADCC en la protección contra el VIH o su homólogo en simios (VIS). A modo de ejemplo, en un estudio con un anticuerpo neutralizante contra el VIH denominado b12, la intervención en su estructura para anular su capacidad de unión a receptores Fc, resultó en una menor protección tras la administración pasiva de dicho anticuerpo e infección vaginal en macacos [355, 356].

Tabla 1. Recopilación de trabajos sobre el impacto del ADCC en la infección por VIH o su homólogo en simios. Se aporta un resumen con el resultado principal de varios trabajos, seleccionados y detallados en el artículo de revisión de Forthal & Finzi 2018 [48].

Impacto en la infección	Intervención/Evidencia	Resultados
Protección contra la adquisición	Correlaciones con respuestas de anticuerpos inducidos por vacunas	ADCC asociado a eficacia de vacunas en estudios en humanos y modelos animales [349, 350, 352, 353, 357-359]
	Infusión pasiva de anticuerpos no-neutralizantes	Falta de impacto en prevenir la infección [360-369] Posible impacto en el número de variantes transmisoras/fundadoras [362, 365] Reducción de la carga viral en animales [368]
Modulación de la infección	Correlaciones con respuestas de anticuerpos inducidos por vacunas	ADCC correlaciona con niveles reducidos de viremia en algunos estudios animales [370-373]
	Infusión pasiva de anticuerpos no-neutralizantes	La infusión de anticuerpos policlonales puede disminuir la viremia transitoriamente [374]
	Correlaciones con respuestas inducidas por la infección	ADCC asociado a la progresión lenta de la enfermedad en animales y humanos [375-378]
Actividad aumentada de anticuerpos neutralizantes in vivo	Infusión pasiva de anticuerpos neutralizantes	La interacción con receptores Fc podría incrementar el efecto protector de algunos anticuerpos, y contribuir a reducir la viremia en animales infectados y humanos [355, 356, 379, 380]

Terapias basadas en anticuerpos, tanto neutralizantes como no-neutralizantes, incluso idealmente una combinación de ambos, podrían resultar útiles en estrategias de tratamiento o curación tipo “shock and kill”. Estas moléculas pueden mediar diversas funciones a través de sus dos dominios, el fragmento variable (Fab) y el fragmento constante (Fc), como la neutralización de cepas virales o la inducción de ADCC contra células infectadas por ejemplo. Los anticuerpos pueden alterar el curso de la infección VIH in vivo y ayudar a erradicar los reservorios [381]. En esta línea, se ha demostrado que anticuerpos dirigidos contra proteínas de la envuelta pueden ejercer una función neutralizante, suprimir la replicación y mejorar la respuesta inmune humoral frente al virus [382]. Una limitación es que la mayoría de individuos VIH⁺ no producen de forma natural anticuerpos neutralizantes, y en los casos que sí, estos no aparecen hasta meses después de la infección inicial [383, 384]. Sin embargo, los avances en el campo de la clonación de células B han permitido producir anticuerpos neutralizantes para estudios de inmunización pasiva [385], y recientemente, se han probado en estudios dirigidos al reservorio latente [386]. La infusión de distintos anticuerpos resultó en una disminución de la viremia en individuos VIH⁺ no tratados [387] y en un retraso en el rebote viral de unos pocos meses en pacientes tratados tras interrumpir el tratamiento [388, 389]. Merece la pena destacar que la eficacia terapéutica del anticuerpo 3BNC117 fue dependiente de las funciones mediadas por el fragmento Fc, lo cual podría resaltar el papel de la respuesta ADCC [379, 380]. La infusión de este anticuerpo aumentó la eliminación de las células infectadas, y en combinación con otros dos anticuerpos (b12 y PGT121), logró suprimir el rebote viral en macacos infectados crónicamente [390]. Ninguno de los estudios mencionados ha testado la administración de anticuerpos en combinación con agentes reversores de la latencia, un escenario donde probablemente se podrían dar resultados más impactantes en términos de reducción del reservorio. Si bien los resultados son prometedores, una serie de acontecimientos pueden dificultar la implementación de las terapias con anticuerpos, como la aparición de mutaciones de resistencia [391], que podría obligar a usar un cocktail de anticuerpos [392], o la necesidad de métodos de inmunización que permitan mayores tiempos de circulación de estas moléculas en el organismo [393]. En la misma línea, nuevas estrategias basadas en la combinación de anticuerpos con otros agentes moduladores inmunes, incluyendo LRAs, se están testando actualmente en ensayos clínicos, como por ejemplo el anticuerpo 3BNC117 más el LRA romidepsina (NCT03041012, NCT02850016), el tratamiento con interferón alfa 2b pegilado más los anticuerpos 3BNC117 y 10-1074 (NCT03588715), o lefitolimod, un agonista de TLR9, en combinación con los anticuerpos 3BNC117 y 10-1074 (NCT03837756) [394].

Por tanto, los resultados procedentes de estos estudios sugieren una posible implicación del mecanismo ADCC y la respuesta inmune NK en la configuración de los reservorios del VIH. El trabajo de la presente tesis presentado en el **CAPÍTULO 1** trata de explorar el papel de la respuesta ADCC en la eliminación de las células reservorio. Por otro lado, el trabajo presentado en el **CAPÍTULO 2**, se basa en el desarrollo de una estrategia innovadora que combina el uso de una plataforma nanotecnológica y anticuerpos, para inducir una respuesta de tipo ADCC mediante estimulación directa de CD16, dirigida específicamente a las células infectadas por VIH empleando un anticuerpo específico contra la proteína viral gp120.

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Actualmente no se dispone de una cura para la infección por el VIH. El tratamiento antirretroviral disponible ha supuesto el mayor avance hasta ahora para combatir la infección, consiguiendo reducir la viremia por debajo de los límites de detección en la mayoría de pacientes, y previniendo el desarrollo de inmunodeficiencias. Sin embargo, el TAR no elimina por completo el virus y puede tener consecuencias para la salud a medio y largo plazo, además de ser difícil su acceso en áreas geográficas con pocos recursos. Por otro lado, la tasa global de nuevas infecciones se ha mantenido estable en los últimos años, en aproximadamente 1,5 millones de nuevas infecciones por año (UNAIDS), incrementándose progresivamente el número de personas que requieren este tratamiento de por vida. Estos argumentos justifican la necesidad de investigar estrategias de cura para la infección.

Los esfuerzos de cura se han centrado en estrategias de reversión de la latencia, como las terapias denominadas *shock and kill*. En global, los resultados de estos ensayos clínicos han puesto de manifiesto la necesidad de compuestos más potentes para inducir la expresión de los provirus latentes, y de intervenciones que favorezcan una respuesta inmune potente contra las células reactivadas en los pacientes VIH⁺. La eliminación de los reservorios activos, bien aquellos con expresión de virus sin necesidad de estímulo, o tras reactivación farmacológica, podría contribuir al control natural del VIH y una aproximación hacia la cura funcional.

Las hipótesis de partida de la presente tesis son:

1- Dada la variedad, rapidez y potencia de las respuestas inmunes mediadas por células NK, las células reservorio podrían haber desarrollado mecanismos de resistencia que facilitan su persistencia en el organismo.

2- La promoción de una sinapsis inmunológica eficiente entre células infectadas por el VIH y células NK, así como la inducción de una respuesta efectora óptima por parte de las últimas, podría contribuir a la reducción del tamaño del reservorio viral.

Así, los objetivos principales de este trabajo han sido, por un lado estudiar la susceptibilidad de distintas poblaciones de células T CD4⁺ que constituyen el reservorio viral a los mecanismos inmunes NK conocidos como citotoxicidad natural y ADCC, profundizando en mecanismos de persistencia del reservorio activo denotado por el marcador CD32. Y por otro lado, desarrollar una estrategia terapéutica basada en nanopartículas biespecíficas que albergan en su superficie dos tipos de anticuerpos ordenados en *clusters*, con el objetivo de desencadenar una respuesta NK óptima y dirigirla de forma específica a las células infectadas.

II. Hipótesis y Objetivos

Los objetivos desglosados son los siguientes:

- 1) Evaluar la respuesta NK mediante citotoxicidad natural y ADCC contra las poblaciones de células T CD4⁺: T_{NA}, T_{SCM}, T_{CM}, T_{EM}, T_{CD20^{dim}}, y T_{CD32^{dim}} en ensayos in vitro y en muestras de pacientes tratados con TAR.
- 2) Identificar posibles mecanismos de persistencia del reservorio activo T_{CD32^{dim}} y evaluar su susceptibilidad a terapias dirigidas a potenciar la función de las células NK.
- 3) Generar una nueva nanoherramienta consistente en nanopartículas biespecíficas que presentan los anticuerpos anti-CD16 y anti-gp120 ordenados en su superficie.
- 4) Evaluar la capacidad de las nanopartículas biespecíficas desarrolladas (pBiAb-AuNPs) para promover el contacto directo entre células infectadas y células NK, y promover la eliminación de las células infectadas.

III. RESULTADOS

CAPÍTULO 1: Estudio de los mecanismos de persistencia de las células reservorio con expresión del marcador CD32

CAPÍTULO 2: Desarrollo de una nueva nanoherramienta para la eliminación de las células infectadas por VIH

CAPÍTULO 1

Título

CÉLULAS RESERVORIO DEL VIH CON EXPRESIÓN DE LA MOLÉCULA CD32 SON RESISTENTES A LA CITOTOXICIDAD CELULAR DEPENDIENTE DE ANTICUERPOS (ADCC) MEDIADA POR CÉLULAS NATURAL KILLER

HIV-RESERVOIR CELLS EXPRESSING CD32 ARE RESISTANT TO NATURAL KILLER ANTIBODY-DEPENDENT IMMUNE RESPONSE

Resumen

El VIH establece una infección persistente en reservorios celulares de naturaleza heterogénea, los cuales se mantienen principalmente mediante proliferación celular, y representan el principal obstáculo para curar la infección. Recientemente, se ha identificado la expresión del marcador CD32 en células reservorio con transcripción viral activa en presencia del TAR. Sin embargo, se desconoce la implicación que la expresión de la molécula CD32 podría tener en la persistencia de estas células. En este capítulo se presentarán resultados que indican una resistencia a la respuesta inmune ADCC mediada por células NK por parte de células infectadas CD32⁺, debido a la unión menos eficiente de anticuerpos VIH-específicos. Las células infectadas CD32⁺ presentan también mayor capacidad de proliferación en presencia de complejos inmunes, y son resistentes a terapias diseñadas para potenciar las respuestas efectoras inmunes NK. Además, la reactivación farmacológica del reservorio latente incrementa la proporción de células con expresión de CD32, que de hecho se benefician de la resistencia al mecanismo ADCC. Por tanto, la sobreexpresión de CD32 en células infectadas podría representar un nuevo mecanismo de evasión inmune y un obstáculo para la erradicación del VIH.

Abstract

HIV establishes a persistent infection in heterogeneous cell reservoirs which are mainly maintained by cellular proliferation and represent the main obstacle to cure the infection. The expression of the Fcγ receptor CD32 has been identified as a marker of the active cell reservoirs in people on antiretroviral therapy, but if its expression has any role on conferring advantage for viral persistence is unknown. Here, we report that HIV-infected cells expressing CD32 are resistant to natural killer (NK) antibody-dependent cell cytotoxicity (ADCC) by a mechanism compatible with suboptimal binding of HIV-specific antibodies. Infected CD32⁺ cells have increased proliferative capacity in the presence of immune complexes, and are resistant to therapies directed to potentiate NK function. Remarkably, reactivation of the latent reservoir increases the pool of infected CD32⁺ cells, which are largely resistant to NK cells. Thus, we report a novel mechanism of immune evasion of HIV-infected cells through upregulation of CD32.

Introduction

Human immunodeficiency virus (HIV) establishes a persistent infection for which, nowadays, there is no available cure. Despite huge advances on the optimization of antiretroviral therapy (ART), which leads to suppression of viral replication, ART does not fully eliminate the virus from the human body nor can completely solve the persistent inflammation caused by HIV [395]. Importantly, ART discontinuation leads to viral rebound from diverse anatomical sites and cell subsets containing replication-competent virus, representing the main obstacle in achieving cure [396].

The HIV reservoir has a complex and heterogeneous nature, where each of the subsets that compose the viral reservoir contributes differently to viral persistence; i.e. central memory cells are the main population contributing to the total reservoir size [113], effector memory cells support HIV transcription [105], and memory stem cells and resident memory T cells are potentially long-lived niches for HIV [114, 125]. Unfortunately, knowledge on the establishment, maintenance, and composition of the reservoir remains incomplete, and the identification of markers to exclusively target persistent HIV-infected cells remains elusive [196, 397]. In this regard, the molecule CD32, a low-affinity receptor for the constant fraction of immunoglobulin G (FcγR-IIa), was proposed as a marker of HIV reservoir cells [203]. While those results were questioned later by the identification of experimental artifacts [398, 399], several new studies partially corroborated the original findings; higher levels of viral DNA within the T_{CD32} population were reported after applying a very stringent cell isolation protocol [202] and CD32 was identified as a marker of transcriptionally active persistent HIV-infected cells, both in blood and in the main reservoir tissues, namely the lymph nodes and the gastrointestinal tract [125, 201, 204, 205, 400]. Importantly, whether or not CD32 is a marker of latent or transcriptionally active infection, infected CD4⁺ T cells expressing CD32 contain replication-competent HIV and are found in long-term ART-treated patients [125, 201-203, 205, 400, 401]. Recently, the cell markers CD20 [107] and CD30 [198] have been shown to also identify transcriptionally active HIV cells in samples from ART-suppressed patients. Whether these transcriptionally active HIV-infected cells persist in the body and are not targeted by host immune responses remains unknown.

Natural killer (NK) cells are lymphocytes that can eliminate cancer cells or virally-infected cells without prior antigen sensitization. They constitute an important arm of the immune system, not only by a direct cytotoxic effect on aberrant cells but also by the modulation of the adaptive immune responses. NK cells kill target cells by several mechanisms, such as natural cytotoxicity (NC), recognizing stress ligands expressed on the surface of infected cells, or by antibody-dependent cell cytotoxicity (ADCC), driven by antibodies that bind to target cells [301]. The decision of NK cells to kill or not to kill a target cell depends on the balance between activating and inhibitory signals received from the interaction with the target cell [402]. Among relevant NK receptors, we find natural cytotoxicity receptors such as NKp46, NKp30, NKp44, different Killer-cell immunoglobulin-like (KIRs), and lectin-like receptors such as NKG2A or NKG2C. Other important activating receptors for NK activity are NKG2D and DNAM-1, whose known ligands are the major histocompatibility complex (MHC) class I-related molecules MICA/B and the UL16-binding proteins or CD155 and CD112, respectively. Further, expression of the inhibitory receptor NKG2A is known to impact NK effector responses through its interaction with

HLA-E molecules [403]. In this sense, therapeutic interventions blocking this interaction represent promising tools to potentiate NK cell immune responses during different pathologies [404, 405]. Importantly, HIV infection causes NK cell dysfunction, which is not completely restored by ART [263, 264]. NK cells play an important role in containing viral replication during early infection and shaping adaptive immune responses during chronic infection [71]. However, the role of NK cells in controlling the viral reservoir in patients on ART remains undefined. Mounting evidence supports the importance of NK cell function in shaping the HIV reservoir size, for example through the induction of interferon (IFN- γ) and the expression of certain activating receptors [343]. Moreover, proportions of NK cells inversely correlated with HIV-1 DNA reservoir levels in a clinical study designed to disrupt viral latency [344]. Importantly, during chronic infection, several strategies used by HIV to evade NK cell immune responses have been described, including the modulation of HLA class I molecules expression at the surface of infected cells [335]. However, immune evasion mechanisms of HIV-infected reservoir cells to NK cell-mediated killing have not been identified.

Here we show that CD32 expression in HIV-infected cells confers resistance to NK cell-mediated ADCC killing by a mechanism compatible with a reduced binding of HIV-specific antibodies required for this mechanism. Importantly, this immune-resistant mechanism is also observed in latently HIV-infected cells after viral reactivation, providing a plausible explanation for the maintenance of transcriptionally active HIV-infected cells in ART-treated patients.

Materials and Methods

Ethics statement and patient samples

PBMCs from HIV-1-infected patients were obtained from the HIV unit of the Hospital Universitari Vall d'Hebron in Barcelona, Spain. Study protocols were approved by the corresponding Ethical Committees (Institutional Review Board numbers PR(AG)270/2015 and PR(AG)39/2016). PBMCs from healthy donors were obtained from the Blood and Tissue Bank, Barcelona, Spain. All patients recruited to this study were adults who provided written informed consent. Samples were completely anonymous and untraceable and were prospectively collected and cryopreserved in the Biobank (register number C.0003590). Information on plasma viral loads, CD4⁺ T cell counts, and time on ART from suppressed patients is summarized in **Table S1**.

Cells, virus, and reagents

PBMCs were obtained from HIV-infected patients and uninfected donors by Ficoll-Paque density gradient centrifugation and cryopreserved in liquid nitrogen. PBMCs were cultured in RPMI medium (Gibco) supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (Gibco), 100 µg/ml streptomycin (Fisher Scientific), and 100 U/ml penicillin (Fisher Scientific) (R10 medium), and maintained at 37°C in a 5% CO₂ incubator. For RNA FISH-flow assays, fresh PBMCs were obtained from a whole blood donation (400 ml) from HIV-infected patients by Ficoll-Paque density gradient centrifugation and CD4⁺ T cells were immediately isolated and used without previous cryopreservation.

All plasmids needed for the generation of viral stocks and delta molecular clones were obtained through the NIH AIDS Reagent Program (cat# 12755, 11440, 13403, 3552, 968, and 114). Viral stocks were generated by transfection of 293T cells with the plasmids encoding the different molecular clones, and the resulting viral particles were titrated in TZMbl cells using an enzyme luminescence assay (britelite plus kit; PerkinElmer) as described previously [406]. pCI NL4-3 Nef-HA-WT plasmid was a gift from Warner Greene (Addgene plasmid #24162; <http://n2t.net/addgene:24162> ; RRID:Addgene_24162). BaL gp120 recombinant protein was obtained through the NIH AIDS Reagent Program. The A32 antibody was obtained through the AIDS Research and Reference Program, NIAID, NIH (Cat#11438) from Dr. James E. Robinson [407]. Interleukin-2 (IL-2) was obtained from the Vall d'Hebron Hospital pharmacy. The pan-caspase inhibitor named Q-VD-OPh (quinolyl-valyl-O-methylaspartyl-[-2,6-difluorophenoxy]-methyl ketone) was purchased from Selleckchem. IL-7 was purchased from Bio-Techne R&D Systems.

ADCC assay in cells coated with recombinant gp120

PBMCs from ART-suppressed patients, elite controllers, or uninfected donors were thawed and rested overnight in R10 medium. To exclude monocytes, PBMCs were cultured in a lying flask and adherent cells were discarded the next day. CD4⁺ T cells and NK cells were isolated from cryopreserved PBMCs using commercial kits (MagniSort Human CD4⁺ T Cell Enrichment; Affymetrix, and MagniSort™ Human NK cell Enrichment; eBioscience). Two rounds of cell separation were performed to maximize the purity of the cells (overall purity >85%). CD4⁺ T cells were stained with the membrane lipid marker PKH67 (Sigma-Aldrich) following the

manufacturer's instructions and then coated with 1 µg of recombinant gp120 protein for 1h at RT. A pool of uncoated cells was used as a negative control. After coating, target cells were extensively washed in ice-cold R10 medium and dispensed in U-bottom 96-well plates (100,000 cells per well, 10 wells per condition). After that, CD4⁺ T cells were incubated for 15 mins with plasma (1:1,000 dilution) from a viremic (high viral load in blood) HIV⁺ patient. Then, NK effector cells were added at 1:1 target/effector ratio. Plates were centrifuged at 400xg for 3 mins and incubated for 4h at 37°C and 5% CO₂. After incubation, cells were collected in FACs tubes, washed with staining buffer (PBS 3% FBS), and stained with anti-CCR7-PE-CF594 (150503, Becton Dickinson) for 30 mins at 37°C. Next, cells were washed and stained with anti-CD3-AF700 (SK7, Biolegend), anti-CD45RO-BV605 (UCHL1, Biolegend), anti-CD32-PE-Cy7 (FUN-2, Biolegend), anti-HLA-DR-BV711 (L243, Biolegend), anti-CD20-BV786 (2H7, Biolegend), and anti-CD95-PE-Cy5 (DX2, Becton Dickinson) for 20 mins at RT. Finally, cells were washed with staining buffer (PBS 3% FBS) and fixed with PFA (2%). Flow cytometry particles for absolute cell counting (5*10⁴/ml) (AccuCount Blank 5.0-5.9 µm, Cytognos) were added. Samples were acquired on an LSR Fortessa flow cytometer (Becton Dickinson) and analyzed using FlowJo V10 software. We calculated the % of killing as the number of cells that disappeared in each population, following the next formula:

$$\% \text{ ADCC} = 100 - \frac{\text{Cells (gp120)}}{\text{Cells (no gp120)}} * 100$$

In some experiments, we assessed the capacity of NK cells to perform ADCC after being stimulated with IFN-α or IL-15 (Miltenyi Biotec). In such cases, PBMCs were stimulated overnight with 5,000 U/ml IFN-α or 25 ng/ml of IL-15, and NK cells were isolated the next day.

Assessment of the gp120-coating in the different CD4⁺ T cell subsets

CD4⁺ T cells were coated with recombinant gp120 as described above and then stained with anti-CCR7-PE-CF594 (150503, Becton Dickinson), anti-CD3-AF700 (SK7, Biolegend), anti-CD45RO-BV605 (UCHL1, Biolegend), anti-CD32-PE-Cy7 (FUN-2, Biolegend), anti-HLA-DR-BV711 (L243, Biolegend), anti-CD20-BV786 (2H7, Biolegend) and anti-CD95-PE-Cy5 (DX2, Becton Dickinson) antibodies. Next, cells were incubated for 20 mins at RT with 5 µg/ml of A32 antibody (which binds to gp120 HIV protein). Then, cells were stained for 20 mins at RT with an anti-human FITC-labelled secondary antibody (dilution 1:100) (Thermo Fisher) for A32 detection. Samples were acquired on an LSR Fortessa flow cytometer and data analyzed using FlowJo.

Binding assessment of HIV-specific antibodies to T_{CD32^{dim}} cells

Isolated CD4⁺ T cells from uninfected donors were coated with gp120 recombinant protein. To detect if IC might result in steric hindrance precluding the binding of HIV-specific Igs to the T_{CD32^{dim}} subset, we labeled the gp120-specific antibody (A32 mAb) with Allophycocyanin (APC) following the manufacturer instructions (Zenon Human IgG labeling kit, Invitrogen) and measured cell binding by flow cytometry. A pool of non-coated cells was used as a negative control. Cells were incubated with plasma containing high titer of non-HIV specific immune complexes (dilution 1,000) for 20 mins at RT. After, cells were incubated with A32-APC (3.3 µg/ml) for 25 minutes and labeled with anti-CD3-AF700 (SK7, Biolegend) and anti-CD32-PE-Cy7 (FUN-2, Biolegend). After, cells were washed once with PBS and stained with LIVE/DEAD Fixable Violet Viability (Invitrogen) for 20 mins at RT. Finally, cells were washed with PBS and fixed with

PFA (2%). Samples were acquired on an LSR Fortessa flow cytometer and data analyzed using FlowJo.

ADCC-mediated NK cell activation of isolated T_{CD32^{dim}} cells.

For cell sorting experiments, 100 million PBMCs from healthy donors were stained with LIVE/DEAD violet viability (Invitrogen) for 20 mins at RT. After washing, cells were surface stained with anti-CD3-PerCP (SK7; Becton Dickinson), anti-CD56-FITC (B159, Becton Dickinson), anti-CD32-PE-Cy7 (FUN-2, Biolegend) and, anti-CD4-BV605 (RPA-T4, Becton Dickinson) antibodies for 20 mins at RT. Cells were then washed and immediately sorted using a BD FACS Aria Cell Sorter. We sorted the populations CD4⁻CD3⁻CD56⁺ (NK cells), CD3⁺CD4⁺CD32⁺ (T_{CD32^{dim}}) and CD3⁺CD4⁺CD32⁻ (T_{CD32⁻}). Then, we performed the ADCC assay and measured NK cell activation by flow cytometry. Purity of the cells was >97% in all cases.

Sorted T_{CD32^{dim}} and T_{CD32⁻} cells were coated with recombinant gp120 as described above and incubated with plasma from a viremic HIV-infected patient at 1:1,000 dilution 15 minutes before the addition of NK cells (ratio 1:2). Co-cultures were maintained for 4 h in a 96-well plate at 37°C and 5% CO₂. NK cytotoxicity was assessed by measurement of CD107a and IFN- γ . As a positive control, we included NK cells cultured with 10 ng/ml PMA plus 1 μ M ionomycin, and as a negative control, NK cells were cultured without any stimulus. CD107a-PE-Cy5 (H4A3; Beckton Dickinson), BD GolgiPlug Protein Transport Inhibitor (Becton Dickinson) and, BD GolgiStop Protein Transport Inhibitor containing monensin (Becton Dickinson) were also added to each well at the recommended concentrations at the beginning of cell culture. After incubation, cells were washed and stained with a viability dye (LIVE/DEAD Fixable Violet dead cell stain; Invitrogen). Cells were then stained with anti-CD56-FITC (B159; Becton Dickinson), anti-CD32-PE-Cy7 (FUN-2, Biolegend) and, anti-CD4-BV605 (RPA-T4, Becton Dickinson) antibodies for 20 mins at RT. After that, cells were washed and fixed and permeabilized with Fixation/Permeabilization Solution (Becton Dickinson) for 20 mins at 4°C, washed with BD Perm/Wash buffer, and stained with anti-IFN- γ AF700 (Life technologies) for 30 mins at 4°C. After washing, cells were fixed with PFA (2%) and acquired on an LSR Fortessa flow cytometer (Becton Dickinson). Flow cytometry particles for absolute cell counting (5*10⁴/ml) (AccuCount Blank 5.0-5.9 μ m, Cytognos) were added. Data were analyzed using FlowJo V10 software.

Ex vivo infection of unstimulated PBMCs

PBMCs from ART-suppressed patients or healthy donors were thawed and incubated overnight in R10 medium containing 40 U/ml IL-2. The next day, CD4⁺ T cells were isolated using a commercial kit (MagniSort Human CD4⁺ T Cell Enrichment; Affymetrix) and infected by incubation for 4 h at 37°C with 156,250 or 2,500 TCID₅₀ (50% tissue culture infectious dose) of HIV_{NL4.3} or HIV_{BaL} viral strains, respectively. In some experiments, cells were infected by spinoculation at 1200*g for 2 h at 37 °C (TCID₅₀ of 78,125 and 625 for HIV_{NL4.3} and HIV_{BaL}). Cells were then washed twice with PBS and cultured at 1 M/ml in a 96-well plate round-bottom with R10 containing 100 U/ml of IL-2 for the next 5 days. The resulting HIV-infected CD4⁺ T cells were used for different experiments listed below.

Phenotyping of HIV-infected CD4⁺ T cells

HIV-infected cells were stained with LIVE/DEAD AQUA viability (Invitrogen) for 30 mins at RT. After washing once with staining buffer, cells were stained with anti-ULBP1-PerCP (170818, R&D Systems), anti-CD32-PE-Cy7 (FUN-2, Biolegend), anti-CD3-PE-Cy5 (UCHT-1, Biolegend), anti-CD4-AF700 (RPA-T4, Becton Dickinson), anti-HLA-E-APC (3D12, Biolegend), anti-CD155-BV786 (TX24, Becton Dickinson) and anti-MIC A/B-BV605 (6D4, Becton Dickinson) antibodies for 20 mins at RT. Cells were then fixed and permeabilized with Fixation/Permeabilization Solution (Becton Dickinson) for 20 mins at 4 °C, washed with BD Perm/Wash buffer, and stained with anti-p24-PE (Beckman Coulter) for 20 mins on ice and 20 mins at RT. After washing with BD Perm/Wash buffer, cells were fixed with PFA (2%). Samples were acquired on an LSR Fortessa flow cytometer and data analyzed using FlowJo V10 software. Gating was performed according to the different FMO controls.

Assessment of the proliferative potential of T_{CD32^{dim}} cells

HIV-infected cells were incubated with plasma from a viremic HIV⁺ patient or plasma from an uninfected healthy donor (dilution 1:1,000) for 4h at 37°C and 5% CO₂. Additionally, a pool of HIV-infected cells previously treated with an Fc receptor blocker (human Fc block, Becton Dickinson) was used as a control. After incubation, cells were washed and stained with LIVE/DEAD Fixable Violet Viability (Invitrogen) for 20 mins at RT. Next, cells were washed with staining buffer and stained with anti-CCR7-PE-CF594 (150503, Becton Dickinson) for 30 mins at 37 °C. After washing, cells were stained with anti-CD56-FITC (B159, Becton Dickinson), anti-CD3-AF700 (SK7, Biolegend), anti-CD45RO-BV605 (UCHL1, Biolegend), anti-CD32-PE-Cy7 (FUN-2, Biolegend), anti-CD20-BV786 (2H7, Biolegend), anti-CD95-PE-Cy5 (DX2, Becton Dickinson), and anti-CD4-APC (OKT4, Biolegend) for 20 mins at RT. Cells were then fixed and permeabilized with Fixation/Permeabilization Solution (Becton Dickinson) for 20 mins at 4°C, washed with BD Perm/Wash buffer and stained with anti-p24-PE (KC57, Beckman Coulter) for 20 mins on ice and, during the additional 30 mins at RT an anti-Ki67-BV510 (B56, Becton Dickinson) was added. Finally, cells were washed and fixed with PFA (2%). Positive cells for the ki67 marker were determined according to FMO controls. Samples were acquired in an LSR Fortessa flow cytometer (Becton Dickinson) and analyzed with FlowJo V10 software.

Natural cytotoxicity and ADCC NK-based assays

5 days after infection, HIV-infected cells were placed in a 96 round bottom well plate at 100,000 cells/well (ten replicates). Autologous NK cells, previously isolated from PBMCs by negative isolation using magnetic beads (MagniSort™ Human NK cell Enrichment Kit, eBioscience) were added at 1:1 ratio. For the study of the ADCC response, plasma from a viremic HIV-infected patient containing a mix of antibodies targeting different HIV epitopes was added at 1:1,000 dilution to HIV-infected cells 15 minutes before the addition of NK cells. After, the plate was centrifuged at 400*g for 3 minutes to facilitate cell contact and then incubated at 37 °C with 5% CO₂ for 4 h. After, cells were collected in FACs tubes, washed with PBS, and stained with LIVE/DEAD Fixable Violet Viability (Invitrogen) for 20 mins at RT. Next, cells were washed with staining buffer and stained first with anti-CCR7-PE-CF594 for 30 mins at 37 °C, and after an additional wash, with anti-CD56-FITC (B159, Becton Dickinson), anti-CD3-AF700 (SK7, Biolegend), anti-CD45RO-BV605 (UCHL1, Biolegend), anti-CD32-PE-Cy7 (FUN-2, Biolegend), anti-

CD20-BV786 (2H7, Biolegend), anti-CD95-PE-Cy5 (DX2, Becton Dickinson), and anti-CD4-APC (OKT4, Biolegend) antibodies for 20 mins at RT. Cells were then fixed and permeabilized with Fixation/Permeabilization Solution (Becton Dickinson) for 20 mins at 4°C, washed with BD Perm/Wash buffer, and stained with anti-p24-PE (KC57, Beckman Coulter) for 20 mins on ice and 20 mins at RT. Finally, cells were washed and fixed with PFA (2%). Flow cytometry particles for absolute cell counting (5×10^4 /ml) (AccuCount Blank 5.0-5.9 μm , Cytognos) were added. We also included a non-infected condition. Gating of the CD32 subpopulation was done according to FMO controls. Samples were acquired in an LSR Fortessa flow cytometer and analyzed with FlowJo software. The percentage of ADCC killing was determined by calculating the number of cells that disappeared in each infected population, normalizing numbers to the condition of HIV-infected CD4⁺ T cells plus NK cells (in the absence of plasma). The NC response was quantified as the reduction in the % of p24 HIV protein in T_{CD32}^{neg} and T_{CD32}^{dim} subsets, in comparison to the % of p24 in these subsets in basal conditions in the absence of NK cells. In the experiments assessing the effect of blocking HLA-E, HIV-infected cells were previously incubated with 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of anti-human HLA-E (clone 3D12, Biolegend) antibody for 20 mins at RT, or with an isotype control mouse IgG1 (Becton Dickinson). In these assays, cells were first stained with AQUA viability (Thermo Fisher), then with a panel of surface antibodies: anti-ULBP1-PerCP (170818, R&D Systems), anti-CD56-FITC (B159, Becton Dickinson), anti-CD32-PE-Cy7 (FUN-2, Biolegend), anti-CD3-PE-Cy5 (UCHT-1, Biolegend), anti-CD4-AF700 (RPA-T4, Becton Dickinson), anti-HLA-E-APC (3D12, Biolegend), anti-CD155-BV786 (TX24, Becton Dickinson), anti-MIC A/B – BV605 (6D4, Becton Dickinson); and finally intracellularly stained with anti-p24-PE (KC57, Beckman Coulter) as previously described.

Fluorescence-activated cell sorting of CD4⁺ T cells and infection with *delta* HIV viruses

For the sorting experiments, 100 million PBMCs from healthy donors were stained with LIVE/DEAD violet viability (Invitrogen) for 20 mins at RT. After washing, cells were surface stained with anti-CD3-PerCP (SK7; Becton Dickinson), anti-CD32-PE-Cy7 (FUN-2, Biolegend), and anti-CD4-AF700 (RPA-T4, Becton Dickinson) antibodies for 20 mins at RT. Cells were then washed and immediately sorted using a BD FACSAria Cell Sorter. We sorted the population CD32⁺CD4⁺ T and performed infection assays with the different viral constructs. Sorted cells were infected with NL4.3, ΔNef , and ΔVpu by incubation for 4 h at 37°C with 69,877 TCID₅₀ (50% tissue culture infectious dose), or with 89.6 and ΔVpr by spinoculation at 1200*g for 2 h at 37 °C (2,795 TCID₅₀). Cells were then washed twice with PBS and cultured at concentration 1 M/ml in a 96-well plate round-bottom with R10 containing 100 U/ml IL-2 for the next 5 days. At day 5, cells were stained with LIVE/DEAD violet viability (Thermo Fisher), anti-CD3-PerCP (SK7; Becton Dickinson), anti-CD32-PE-Cy7 (FUN-2, Biolegend) and, anti-CD4-AF700 (RPA-T4, Becton Dickinson) antibodies; as well as intracellularly stained with anti-p24-PE (KC57, Beckman Coulter) as previously described. Samples were acquired in an LSR Fortessa flow cytometer and analyzed with FlowJo V10 software.

Nucleofection of CD4⁺ T cells with a *Nef*-expressing plasmid.

Primary CD32⁺CD4⁺ T cells from healthy donors were isolated by cell sorting as described above, and nucleofected with pCI NL4.3 Nef-HA-WT, a plasmid coding the *Nef* protein with a HA tag. Non-transfected cells or cells transfected with a plasmid expressing the green fluorescent

protein (GFP) were used as controls. Nucleofection was performed using the Nucleofector II device (Amaxa) (program V-024) following the instructions provided by the Human T cell nucleofector kit (Cultek), with 4.7 µg of the plasmid Nef and 2 µg of the plasmid GFP. The detection of transfected cells was performed by flow cytometry using an anti-HA Tag Alexa Fluor 647 conjugated antibody (Clone 912426; R&D systems) or measuring GFP signal, 4 and 19 hours post-transfection. To assess the expression of CD32, cells were stained with LIVE/DEAD violet viability (Thermo Fisher), anti-CD3-PerCP (SK7; Becton Dickinson), anti-CD32-PE-Cy7 (FUN-2, Biolegend) and anti-CD4-AF700 (RPA-T4, Becton Dickinson) antibodies.

Cell latency model of HIV-1

100 million PBMCs from ART-treated HIV-infected patients were used for each experiment. PBMCs were thawed and CD4⁺ T cells were isolated using a commercial kit (MagniSort Human CD4⁺ T Cell Enrichment; Affymetrix) and infected with the HIV_{NL4.3} viral strain (78,125 TCID₅₀/million cells) 30 mins by spinoculation (1200**g* and 37°C) and 90 mins at 37°C 5 % CO₂. Cells were washed twice with PBS and cultured in R10 with IL-2 (10 U/ml) and IL-7 (1 nM) (Bio-Techne R&D Systems). 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. The next day, cells were incubated with Q-VD (10 µM) for 2h at 37°C and 5 % CO₂, in R10 medium containing IL-2, IL-7, Raltegravir, Darunavir, and Nevirapine at the indicated concentrations, and then the latent viral infection was reactivated during 20h with Ingenol (100 nM) and subjected to the cytotoxic NK assay. The cytotoxic assays were performed in round bottom 96 wells plates, adding autologous NK cells at ratio 1:1, in the presence or absence of plasma from a viremic HIV⁺ patient (dilution 1:1,000). Viral-reactivated cells were cocultured with the NKs for 4 hours at 37°C 5 % CO₂ in R10 medium containing Raltegravir, Darunavir and Nevirapine. After the incubation, cells were stained with LIVE/DEAD violet viability (Invitrogen) for 20 mins at RT. Then we washed once with staining buffer, and the cells were stained with anti-CD3-AF700 (SK7; Biolegend), anti-CD32-PE-Cy7 (FUN-2, Biolegend), and anti-CD56-FITC (B159; Becton Dickinson) antibodies for 20 mins at RT. Next, cells were fixed and permeabilized with Fixation/Permeabilization Solution (Becton Dickinson) for 20 mins at 4 °C, washed with BD Perm/Wash buffer, and stained with anti-p24-PE (KC57, Beckman Coulter) for 20 mins on ice and 20 mins at RT. After washing, cells were fixed with PFA (2%). Samples were acquired on an LSR Fortessa flow cytometer (Becton Dickinson) and data analyzed using FlowJo V10 software. Reduction in p24⁺ cells was used to assess the NK cytotoxic response. To calculate the magnitude of the ADCC response we normalized values for the condition (Ingenol+NK+Plasma) to the control consisting of the addition of plasma alone (Ingenol+Plasma).

Detection of cells expressing HIV-1 RNA by the RNA FISH-flow assay

PBMCs from nine ART-treated HIV-infected patients were obtained from a whole blood donation (400 ml) and CD4⁺ T cells were isolated by a negative selection kit (MagniSort Human CD4⁺ T Cell Enrichment; eBioscience). At least 6x10⁶ of freshly-isolated CD4⁺ T cells were studied per condition, being subjected to viral reactivation with different LRAs (Ingenol and Romidepsin), and including the positive (PMA plus ionomycin) and negative controls (medium condition). Before viral reactivation, cells were pre-incubated with the pan-caspase inhibitor Q-VD-OPh (Selleckchem) for 2h. In addition, to prevent new rounds of viral infection during HIV

reactivation, the cells were treated with LRAs in the presence of Raltegravir (1 μ M) for 22h. Afterward, the RNA FISH-flow assay was performed according to the manufacturer's instructions (Human PrimerFlow RNA Assay, eBioscience) with some modifications as previously described [408]. Briefly, after antibody staining and cell fixation and permeabilization, cells were ready for hybridization with a set of 50 probes spanning the whole Gag-Pol HIV mRNA sequence (bases 1165 to 4402 of the HXB2 consensus genome). Next, the cells were subjected to amplification signal steps, and HIV RNA was detected using Alexa Fluor 647-labeled probes. In these experiments, for surface antigen labeling, anti-human CD3 (AF700, Biolegend), anti-human CD32 (PE-Cy7, Biolegend), anti-human CD20 (BV785, Biolegend), and anti-human HLA-DR (BV711, Biolegend) antibodies were used, and cell viability analyzed with violet viability dye (Invitrogen). Samples were analyzed with the LSR Fortessa flow cytometer, and the results were analyzed with FlowJo v10 software.

Ex vivo viral reactivation of the natural reservoir from HIV-suppressed patients

CD4⁺ T lymphocytes from ART-suppressed HIV-infected patients were isolated as described above and cultured in R10 medium with Q-VD-OPh (Selleckchem) for 2h in the presence of Raltegravir (1 μ M), Darunavir (1 μ M), and Nevirapine (1 μ M) to prevent new rounds of viral infection. After 2h, PMA plus ionomycin (PMA 81 nM; ionomycin 1 μ M) were added to the cell culture as a latency reversal agent and left for 18h to reactivate latent HIV. After viral reactivation, cells were subjected to cytotoxicity and ADCC assays as previously described here. For these experiments, we used the autologous plasma from each patient. After, cells were stained with LIVE/DEAD Far Red viability for 20 minutes at RT and then with anti-CD32 (FITC, Biolegend) and anti-CD3 (PerCP, Becton Dickinson) antibodies for 20 minutes at RT. After the cell surface staining, cells were fixed and permeabilized with Fixation/Permeabilization Solution (Becton Dickinson) for 20 mins at 4°C, washed with BD Perm/Wash buffer, and stained with anti-p24-PE (Beckman Coulter) for 20 mins on ice and 20 mins at RT. Finally, cells were washed and fixed with PFA (2%). Samples were acquired in a FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson) and analyzed with FlowJo V10 software. The limit of detection of the assay was established at 50 p24⁺ cells/million CD4⁺ T cells (**Figure S10C**).

Quantification of HIV DNA and HIV RNA by quantitative PCR

CD4⁺ T lymphocytes were enriched from total PBMCs using a negative selection kit (MagneSort Human CD4⁺ T Cell Enrichment, eBioscience). Then, CD4⁺ T cells were fractionated to extract RNA or quantify the HIV DNA from cell lysates. CD4⁺ T cells for DNA analysis were immediately lysed with proteinase K-containing lysis buffer (at 55°C overnight and 95°C for 5 minutes). The HIV DNA in the cell lysates was quantified by qPCR using primers and probes specific for the 1-LTR HIV region (LTR forward 5'-TTAAGCCTCAATAAAGCTTGCC-3', LTR reverse 5'-GTTCGGGCGCCACTGCTAG-3' and probe 5' /56-FAM/CCAGAGTCA/ZEN/CACAACAGACGGGCA/31ABkFQ/ 3'). CCR5 gene was used for cell input normalization. Samples were analyzed in an Applied Biosystems 7000 Real-Time PCR System. For Viral RNA quantification, CD4⁺ T cells were subjected to RNA extraction using the mirVana kit following the manufacturer's instructions (Ambion). Reverse transcription of RNA to cDNA was performed with SuperScriptIII (Invitrogen), and cDNA was quantified by qPCR with primers

against the HIV long terminal repeat (LTR). Quantification of RNA and DNA copies was performed using a standard curve, and values were normalized to 1 million CD4⁺ T cells.

Statistical analyses

Statistical analyses were performed with Prism software, version 6.0 (GraphPad). A P value <0.05 was considered significant.

RESULTS

Susceptibility of HIV-reservoir cell subsets to NK immune response

While it is clear that ADCC, largely mediated by NK cells, is an important protective mechanism against HIV and SIV infection [350, 353, 409], the capacity of this immune mechanism to limit the infection of different T cell subsets composing the viral reservoir is currently unknown. Thus, we first assessed the intrinsic susceptibility of Naïve (T_{NA}), Stem Cell Memory (T_{SCM}), Central Memory (T_{CM}), Effector Memory (T_{EM}), T_{CD20}^{dim} , and T_{CD32}^{dim} $CD4^+$ T cell subsets to ADCC response. Gp120-coated $CD4^+$ T cells from 15 ART-treated and virologically-suppressed HIV-infected patients (patients #8-22, **Table S1**) were subjected to a flow cytometry-based ADCC assay [410, 411]. In this assay, we used gp120-coated cells and plasma from an HIV-infected patient with a high titer of HIV-specific immunoglobulins, which allowed a comparative evaluation of the intrinsic susceptibility of the different subpopulations to NK-mediated killing. Gating of $CD32^+$ cells was performed as previously reported in our previous publications [13, 6], whereby cell conjugates were excluded by the elimination of T cell-B cell doublets, defined as $CD4^+T CD32^{high}$ cells. Coating efficiency with the recombinant protein gp120 of different cell subsets is shown in **Figure S1A**, and a representative gating strategy used for the identification of killed cells by ADCC is shown in **Figure S1B**. Results showed that each $CD4^+$ T cell subset had a different susceptibility to autologous NK cells, being $T_{EM} > T_{CM} > T_{CD20}^{dim} > T_{NA} > T_{SCM} > T_{CD32}^{dim}$ more prone to be killed (ANOVA Friedman test $p=0.0001$) (**Figure 1A**). Overall, most $CD4^+T$ cell subsets were susceptible to ADCC, however T_{CD32}^{dim} cells, and to a lesser extent T_{SCM} , showed the highest resistance to ADCC. To address if this pattern was exclusive of ART-treated patients, we included samples from Elite controllers (EC) (patients #1-7, **Table S1**), and healthy donors (HD). We observed that overall, NK cells from healthy donors were highly efficient at killing the total $CD4^+$ T cell population (**Figure 1B**) and the different $CD4^+$ T subsets (**Figure 1C**). EC represented a heterogeneous group of individuals, in which no significant differences were detected compared to HD as a total (**Figure 1B**) or by subset (**Figure 1C**). In contrast, total $CD4^+$ T cells (**Figure 1B**) as well as all subsets from ART-treated patients were less susceptible to ADCC-mediated killing than HD (**Figure 1C**). The altered frequencies, phenotypes, and decreased functions of NK cell subsets reported during HIV infection [412], which are not fully restored by ART [264], could explain the different NK potency observed in these ART-suppressed patients. Notably, and regardless of that, NK cells from all cohorts showed a marked impaired capacity to kill T_{CD32}^{dim} cells (median % of ADCC of 0.00, 34.84, and 45.01, for ART, EC, and HD, respectively) (**Figure 1C** and **Figure S1C and S1D**). We also investigated the potential relationship between the total cell reservoir size in vivo and ADCC activity. We observed a statistically significant inverse correlation between the percentage of ADCC activity against $CD4^+$ T cells and the total HIV-DNA reservoir size (**Figure 1D**) and, in particular, for the ADCC against T_{CD32}^{dim} cells (**Figure 1E**).

HIV proteins are known to alter the expression of molecules on the infected cells, thereby impacting their recognition and likely the killing mediated by immune cells. Thus, we ought to confirm our results in a more physiological setting using ex vivo infected $CD4^+$ T cells. Isolated $CD4^+$ T cells from ART-suppressed patients were infected with HIV_{BaL} or HIV_{NL4.3}, and after 5 days, were subjected to NK natural cytotoxicity (NC) and ADCC assays (patients #23-29, 36, 44, 46-49 and 51, **Table S1**). A representative flow gating strategy is shown in **Figure 1F**. No significant differences between the killing of T_{CD32}^{dim} and T_{CD32}^{neg} by NC in ART-suppressed patients were

observed (Figure 1G). However, and in concordance with results in Figures 1A and C, $T_{CD32^{dim}}$ cells from ART-suppressed patients were significantly more resistant to ADCC in comparison to their negative cell counterparts (median % ADCC killing of 19.66 vs 35.85 for $T_{CD32^{dim}}$ and $T_{CD32^{neg}}$, respectively) (Figure 1H). In addition, we observed that the capacity to kill infected $T_{CD32^{dim}}$ cells was directly related to the global capacity to kill all infected cells, indicating the essential role of NK potency, in addition to the intrinsic susceptibility of the target cells (Figure S2). These results show that, regardless of differences between patients on the overall killing capacity of their NK cells, different subpopulations of infected $CD4^+$ T cells have distinct intrinsic susceptibility to ADCC responses, being the pool of $CD4^+$ T cells expressing the CD32 molecule highly resistant. Moreover, ART-suppressed individuals, most likely due to the existence of impaired NK cells, have a remarkable inability to kill this population of infected cells.

Figure 1

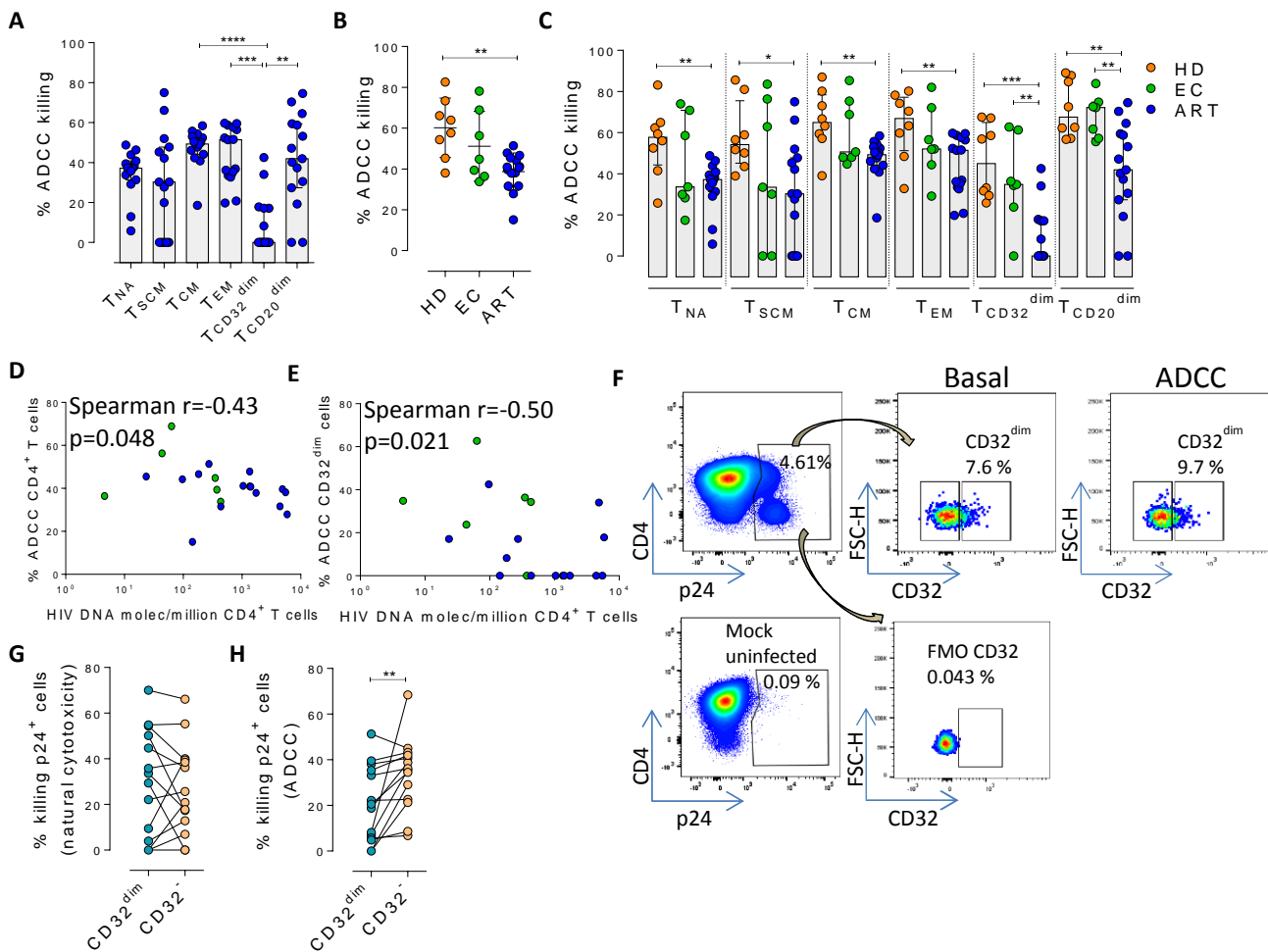


Figure 1. Susceptibility of $CD4^+$ T cell subsets to the NK immune response. The susceptibility of the different cell subpopulations that compose the HIV-reservoir to Natural Cytotoxicity (NC) and Antibody-Dependent Cell Cytotoxicity (ADCC) mediated by NK cells was measured by performing functional assays. **A)** Percentage of gp120 coated cells killed by ADCC after being exposed to HIV-specific immunoglobulins (Igs) in the presence of NK cells. The intrinsic susceptibility to ADCC was measured in Naïve (T_{NA}), Stem Cell Memory (T_{SCM}), Central Memory (T_{CM}), Effector Memory (T_{EM}), $T_{CD32^{dim}}$, and $T_{CD20^{dim}}$ subsets. Statistical comparisons were performed using the ANOVA Friedman test. Median with interquartile range is shown.

B) Percentage of total gp120 coated CD4⁺ T cells from different cohorts of patients killed by ADCC. Healthy donors (HD), Elite Controllers (EC), and antiretroviral treated HIV-infected patients (ART). Statistical comparisons were performed using the Mann-Whitney test. Median with interquartile range is shown. **C)** Percentage of cell subsets killed by ADCC in cells from HD, EC, and ART. Statistical comparisons were performed using the Mann-Whitney test. Median with interquartile range is shown. **D-E)** Spearman correlations between the size of the HIV-reservoir measured as total HIV-DNA in samples from ART-suppressed HIV-infected patients, and the potency of autologous NK cells to kill **(D)** total CD4⁺ T cells or **(E)** T_{CD32^{dim}} cells by ADCC. **F)** Representative flow cytometry gating strategy used to quantify HIV infection after ex vivo infection with BaL or NL4.3. Fluorescence minus one (FMO) control was used to determine CD32 expression. Cells were infected for 5 days and the frequency of expression of CD32 on HIV-infected cells was measured for each condition. **G)** Percentage of killing by NK of ex-vivo HIV-infected T_{CD32^{dim}} and T_{CD32⁻} cells mediated by autologous NK cells from ART-treated patients (n=14). Killing was calculated by normalizing the proportion of each subset within the p24⁺ fraction in the co-culture condition to the basal condition. **H)** Percentage of ADCC killing of ex-vivo HIV-infected T_{CD32^{dim}} and T_{CD32⁻} cells mediated by autologous NK cells from ART-treated patients (n=14). Killing was calculated by normalizing the proportion of each subset within the p24⁺ fraction in the co-culture condition with plasma to the co-culture without plasma. Statistical comparisons were performed using the Wilcoxon matched-pairs signed rank test. *p<0.05; **p<0.01.

Suboptimal binding of HIV-specific immunoglobulins to CD32⁺ HIV-infected cells inefficiently triggers NK cell degranulation

Different hypotheses might help to explain why T_{CD32^{dim}} cells are resistant to ADCC. CD32a is a low-affinity receptor for the constant fraction of immunoglobulin G (FcγR-IIa) [200, 413, 414], and the expression of this molecule on HIV-infected cells would provide them with a bivalent capacity to interact with immunoglobulins present in plasma, both through their constant fraction (Fc portion) or the variable fragment (antigen-specific). In addition, pentraxins, conserved innate immune molecules involved in infectious processes and inflammation, can bind to CD32 and compete with IgGs [415]. Thus, the engagement of such molecules or immune complexes (IC) to the CD32 Fc receptor might offer a selective advantage by protecting infected cells from HIV-specific ADCC-inducing antibodies. Accordingly, we tested if HIV-specific immunoglobulins (Igs) were able to efficiently bind to CD32-expressing cells previously coated with gp120. After incubation with plasma containing HIV-unspecific immunocomplexes (ICs), we found a decrease in the total number of HIV-specific molecules (A32 mAb) able to bind to T_{CD32^{dim}} cells (**Figure 2A-B**), but such effect was not observed in the T_{CD32^{neg}} population (**Figure 2C**). A reduction in the total number of cells being recognized by the A32 mAb was not observed (**Supplementary Figure 3A-B**). This suggests that components present in plasma might bind to the FcγR receptor CD32 representing a steric hindrance and precluding further binding of HIV-specific IgGs. Alternatively, this may indicate competition between CD32 and gp120 for the binding of the same IgG.

Next, we studied the capacity of ex vivo infected CD4⁺ T cells expressing CD32 to form ADCC-induced conjugates with NK cells. We observed a significantly higher frequency of T_{CD32^{dim}} – NK doublets compared to T_{CD32^{neg}} cells (**Figure 2D**). This could be explained by the inefficient elimination of T_{CD32^{dim}} cells by ADCC (as shown in **Figure 1H**), more likely as a consequence of suboptimal antibody-induced immune synapse. This phenomenon has been previously described in HIV-infected macrophages where increased effector-target cell contact time was associated with relative resistance to cytotoxic T lymphocytes [416]. Indeed, when we tested

the capacity of previously-isolated and gp120-coated T_{CD32}^{dim} cells to activate NK cells, we observed that these cells triggered a less potent NK degranulation than their negative counterparts (**Figure 2E**), while $IFN-\gamma$ was equally induced in both cases (**Supplementary Figure 3C**). Overall, our results suggest that potential immune factors present in the plasma that are ligands of CD32 might promote a steric interference that precludes the subsequent binding of HIV-specific antibodies, leading to poor NK activation and therefore resistance to ADCC (as illustrated in **Figure 2F**).

Figure 2

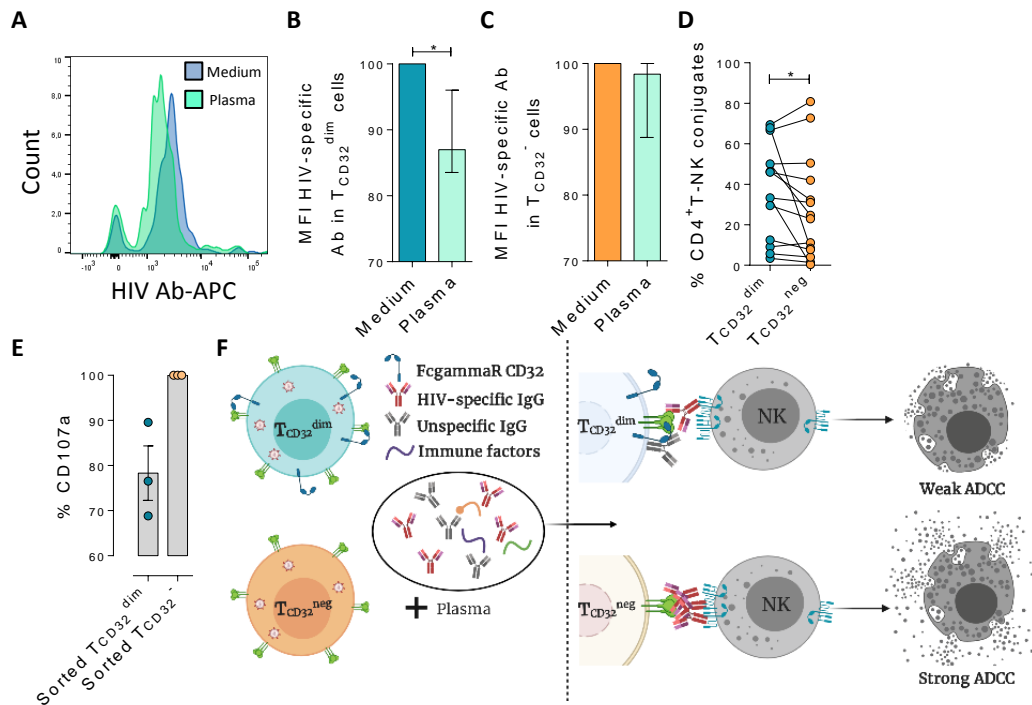


Figure 2. Reduced binding of HIV-specific antibodies to T_{CD32}^{dim} cells and the effect on NK degranulation. The binding capability of the HIVgp120-specific IgG A32, an antibody (Ab) labelled with allophycocyanin (APC), to gp120-coated T_{CD32}^{dim} and T_{CD32}^{-} cells from healthy donors, before and after incubation with plasma containing non-HIV specific IgGs, was measured by flow cytometry (n=7). Percentage of the Mean Fluorescence Intensity (MFI) signal, normalized to the medium, for $A32^{+}$ cells after plasma addition is shown in **A**) Representative histogram of $A32^{+}T_{CD32}^{dim}$ cells, **B**) T_{CD32}^{dim} and **C**) T_{CD32}^{-} cells. **D**) Percentage of cell conjugates between ex vivo HIV-infected T_{CD32}^{dim} or T_{CD32}^{-} and NK cells after performing ADCC assays (n=14). **E**) Percentage of NK degranulation (CD107a marker) in cell conjugates with sorted T_{CD32}^{dim} or T_{CD32}^{-} coated with gp120 HIV protein and incubated with plasma HIV⁺, after a 4h ADCC activation assay (n=3). Values are normalized to the CD32⁻ population **F**) Schematic illustration of the impaired ADCC response against T_{CD32}^{dim} cells. Graphs show median with range and statistical comparisons were performed using Wilcoxon matched-pairs signed rank test. *p<0.05.

HIV-infected cells expressing CD32 show higher proliferation potential after immune complexes engagement

We next explored the possibility that the engagement of IC to the CD32 molecule might induce cell proliferation, and therefore, contribute to their persistence. To study that, we

performed ex vivo infection experiments and measured cell proliferation after IC engagement by flow cytometry. First, we observed that HIV-infected cells, and in particular infected cells expressing CD32^{dim}, had higher proliferative potential measured by the expression of Ki67 (median of 6.67% vs. 4.62% for T_{CD32^{dim}} and T_{CD32^{neg}}, respectively) (**Figure 3A and B**). Importantly, we observed that the addition of plasma from an HIV-infected patient (containing a high titer of Igs), induced significant proliferation of infected T_{CD32^{dim}} cells (median of 7.52% vs. 12.80% for basal condition and plasma HIV⁺, respectively), which was abrogated when Fc receptor blockers were added to the culture (**Figure 3C**). Of note, no effect was observed after the addition of plasma from an HIV-negative donor (**Figure 3C**). In contrast, cell proliferation was unchanged in the infected T_{CD32^{neg}} population (**Figure 3D**). Overall, these results suggest that IC present in the plasma of HIV-infected patients could contribute to the perpetuation of the T_{CD32^{dim}} HIV-infected subset by inducing cell proliferation, besides protecting them from ADCC.

Figure 3

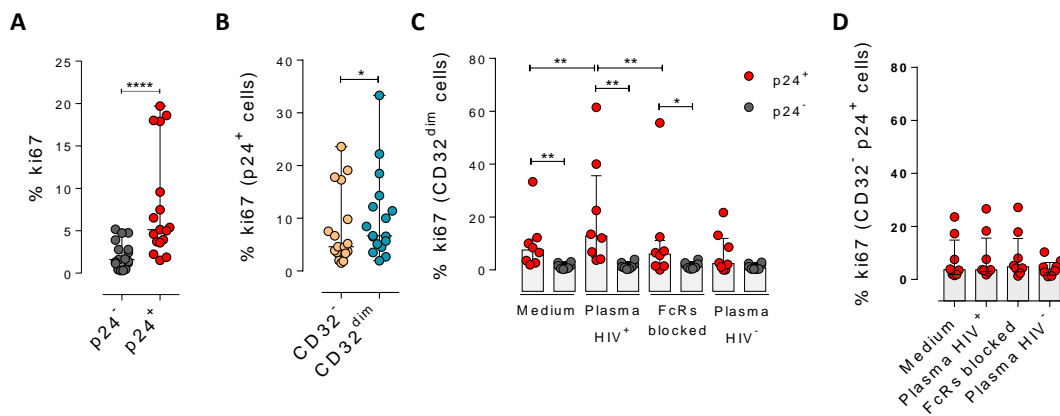


Figure 3. Immune complexes engagement with CD32 induces proliferation in HIV-infected CD32^{dim} cells. Cells from healthy donors were infected with the viral strain HIV_{BaL} and 5 days post-infection Ki67 expression was measured by flow cytometry. **A)** Expression of the proliferation marker Ki67 in uninfected or ex-vivo HIV-infected CD4⁺ T cells. Median and ranges are shown (n=17). **B)** Percentage of Ki67⁺ cells in HIV-infected T_{CD32^{dim}} and T_{CD32^{neg}} subsets are shown (n=17). Median and ranges are shown. **C)** Percentage of Ki67 expression on T_{CD32^{dim}} cells after immune complexes engagement (Plasma HIV⁺). Medium alone, FcRs blockers and plasma from an HIV-negative individual were included as controls. Median with interquartile range is shown (n=8). **D)** Percentage of Ki67 expression on HIV-infected T_{CD32^{neg}} cells incubated under the same experimental conditions as shown in C. Median with interquartile range is represented (n=8). Statistical comparisons consisted of the Wilcoxon matched-pairs signed rank test. *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001; ****p<0.0001.

Accessory viral proteins have a limited role modulating CD32 expression in HIV-infected cells

The FcγR-IIa receptor CD32a is typically found in myeloid cells and platelets [200, 413, 414], but the role of CD32 in CD4⁺ T cells is not fully elucidated. To better understand the mechanism by which CD32 is expressed on HIV-infected cells, we first quantified its expression on CD4⁺ T cells from different cohorts of patients (patients #1-22, **Table S1**, n=15 ART-suppressed, n=7 elite controllers, and 8 HD). We followed a very stringent flow cytometry gating strategy (**Figure S1B**).

In agreement with previous studies [201, 202, 417, 418], we found that a median of 1.21% of CD4⁺ T cells expressed the CD32 receptor, and no statistically significant differences were detected between ART-suppressed, EC patients and HD (**Figure 4A**). In addition, and in concordance with the study of García et al., but differing from the report of Darcis et al. [202, 418], there was no correlation between the HIV-DNA or HIV-RNA levels and the frequency of CD32 expression on CD4⁺ T cells (**Figure S4A and S4B**). Next, we investigated the effect of HIV infection on the expression of CD32. CD4⁺ T cells from ART-suppressed patients were ex vivo infected and productive infection was measured by flow cytometry by the production of the viral protein p24. HIV-infected cells with both, R5 (*BaL*) and X4 (*NL4.3*) tropic viruses showed higher expression of the CD32 molecule in comparison to uninfected cells (**Figure 4B and 4C**). To further dissect the mechanism of CD32 expression, and assess if HIV plays a role inducing its expression, we performed ex vivo infection assays of unstimulated CD4⁺ T cells with virus lacking the accessory viral proteins *Nef*, *Vpr*, or *Vpu*. These proteins have a regulatory role [16], and therefore are potential candidates to upregulate CD32 upon infection. T_{CD32}^{neg} cells were sorted and infected with different defective viral constructs (**Figure S5A-B**). We observed that HIV lacking *Nef* failed to fully upregulate CD32 on the HIV-infected cell population (**Figure 4D**), however *Vpu* and *Vpr*-defective viruses were still able to increase CD32 expression upon infection, similarly to their parental virus (**Figure 4E and F**). The absence of *Nef* was translated into a median of ~50% reduction in the frequency of CD32 expression (**Figure 4G**). To confirm the possible contribution of *Nef* to the upregulation of CD32, we exogenously expressed *Nef* in sorted primary CD32⁻CD4⁺ T cells. We used a plasmid encoding the *Nef* protein coupled with an HA-tag. After transfection, close to 27% of CD4⁺ T cells expressed *Nef* (**Figure S5C**), and some of these cells slightly induced the expression of CD32 (**Figure 4H**). However, we did not observe a clear pattern of CD32 expression as a function of *Nef*, as it could be expected in the case of direct involvement of this viral protein in CD32 upregulation. Note that the transfected GFP⁺ controls did not upregulate CD32 (**Figure S5D**). Thus, our results suggest only a modest role of *Nef* in the upregulation of CD32.

Figure 4

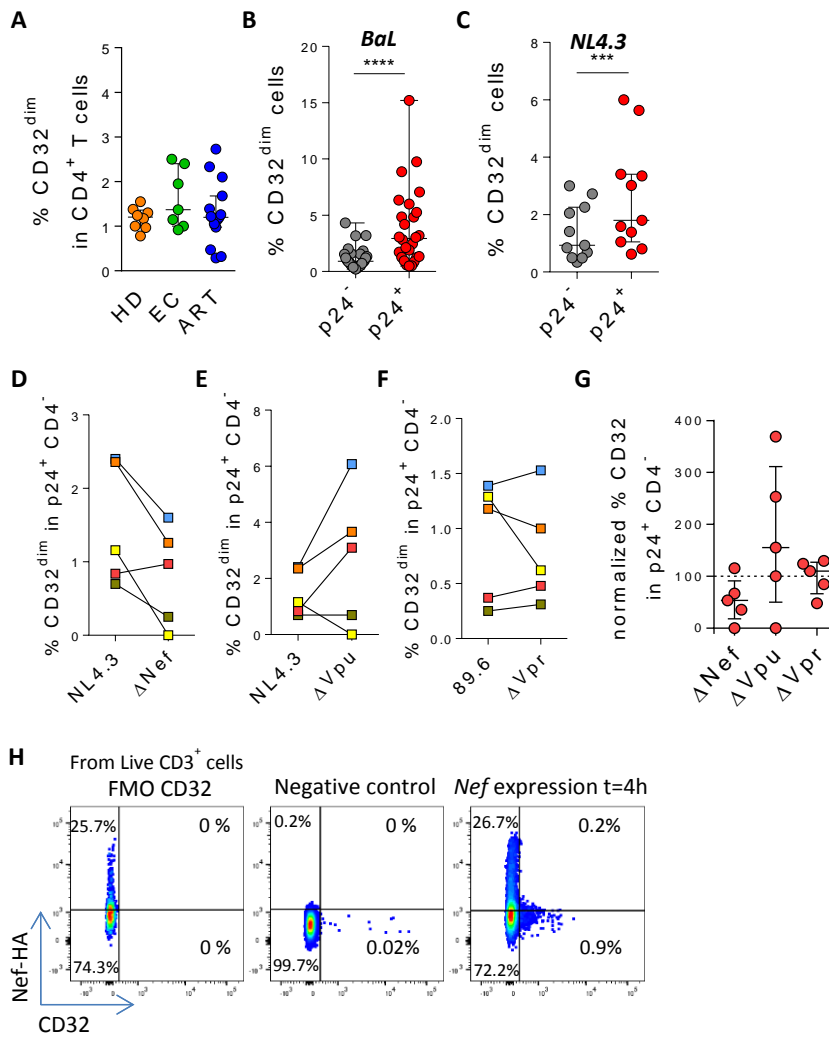


Figure 4. Expression of CD32 during HIV-infection and the role of accessory viral proteins. **A)** Frequency of expression measured by flow cytometry of CD32 on CD4⁺ T cells from healthy donors (HD, n=8), Elite controllers (EC, n=7) and antiretroviral treated HIV-infected patients (ART, n=15). Median with interquartile range are shown. Statistical comparisons were performed using the Mann-Whitney test. ***p<0.001; ****p<0.0001. Percentage of CD32 expression on uninfected cells (p24⁻) and HIV-infected cells (p24⁺) with BaL (n=26) in **(B)** or with NL4.3 (n=11) in **(C)** after 5 days of infection. Median with interquartile range are shown. Statistical analyses consisted of the Wilcoxon matched-pairs signed rank test. **D-F)** Percentage of CD32 expression after HIV infection with defective viruses (ΔNef, ΔVpu, and ΔVpr) on p24⁺ CD4⁺ T CD32⁻ cells previously isolated by cell sorting. Each defective virus is represented with its parental viral construct. **G)** Summary graph of the percentage of CD32 expression after ex vivo infection with the defective viral constructs normalized to their parental viruses. **H)** Flow cytometry plots displaying the expression of CD32 molecules in CD4⁺T CD32⁻ nucleofected cells with a Nef-HA-expressing plasmid at 4h and 19h after transfection. The controls FMO for CD32, and cells subjected to nucleofection without plasmid, are shown.

Infected T_{CD32}^{dim} cells expressing activating or inhibitory NK ligands are refractory to NK-mediated killing

The characterization of the cells resistant to NK-mediated killing is important for the design of new strategies to target them. To ascertain if differences in receptor-ligand interactions could be responsible for the impaired capacity of the NK cells to kill the T_{CD32}^{dim} subset, we studied the expression of MICA/B, ULBP-1, CD155, and HLA-E on the surface of HIV-infected cells after ex vivo infection. Of note, the impact of HIV infection on the expression of many of these ligands is not fully understood and seems to depend on the viral strain and the stage of the viral infection [419, 420]. Expression of the ligands was assessed by flow cytometry, and the gating strategy used for these analyses is shown in **Figure S6**. Overall, we observed that, despite HIV induced higher expression of MICA/B, ULBP-1, and CD155 in infected cells compared to uninfected cells, only a small proportion of infected cells expressed these activating ligands (**Figure 5A and B**). In contrast, the ligand HLA-E was found to be expressed in a significantly higher proportion of infected cells (median of 12.0% in HIV-infected cells vs. 9.4% in uninfected cells, $p=0.002$) (**Figure 5C and D**). By analyzing infected cells based on their expression of CD32, the same trend was observed for the receptors MICA/B, ULBP1, or CD155 (median 0.6%, 1.28%, 0.37% for infected T_{CD32}^{dim} vs. 0.26%, 0.09%, 0.26% for the infected T_{CD32}^{neg} fraction) (**Figure 5E and F**). Of note, when applying the ROUT method for detection of outliers with a $Q=1\%$, differences in **Figure 5E** were lost. However, HLA-E expression was 2-fold significantly higher in HIV-infected T_{CD32}^{dim} compared to infected T_{CD32}^{neg} cells (median of 22.2% and 11.0% respectively, $p<0.0001$) and differences in MFI were also detected (**Figure 5G and H**). Of note, in the absence of any viral infection, T_{CD32}^{dim} cells showed intrinsically higher HLA-E expression (**Figure S7**).

Next, we ought to determine the expression of activating and inhibitory ligands on the fraction of cells refractory to ADCC after ex vivo infection. We performed both NC and ADCC functional assays (in cells from patients #36, 40, 44, 45, 47-49, and 51, **Table S1**). The infected population ($p24^+$) expressing the ligand ULBP-1 was significantly eliminated by both mechanisms, NC and ADCC (**Figure 5I**), however infected cells expressing MICA/B and CD155 were only eliminated by NC (**Figure 5J and K**). Of note, as previously reported [405, 421], cells expressing the molecule HLA-E were particularly resistant to NK-mediated killing (**Figure 5L**). However, infected T_{CD32}^{dim} cells expressing any of the activating NK ligands were more refractory to both NK-mediated immune responses (**Figure 5M-P**). Overall, we observed that upon HIV infection, target cells expressing NK-activating ligands were susceptible to natural cytotoxicity mediated by NK cells. However, infected cells expressing HLA-E and, particularly, $CD32^{dim}$ cells expressing this molecule and/or the activating ligands MICA/B, ULBP-1, and CD155, were more resistant to NK-mediated killing.

Figure 5

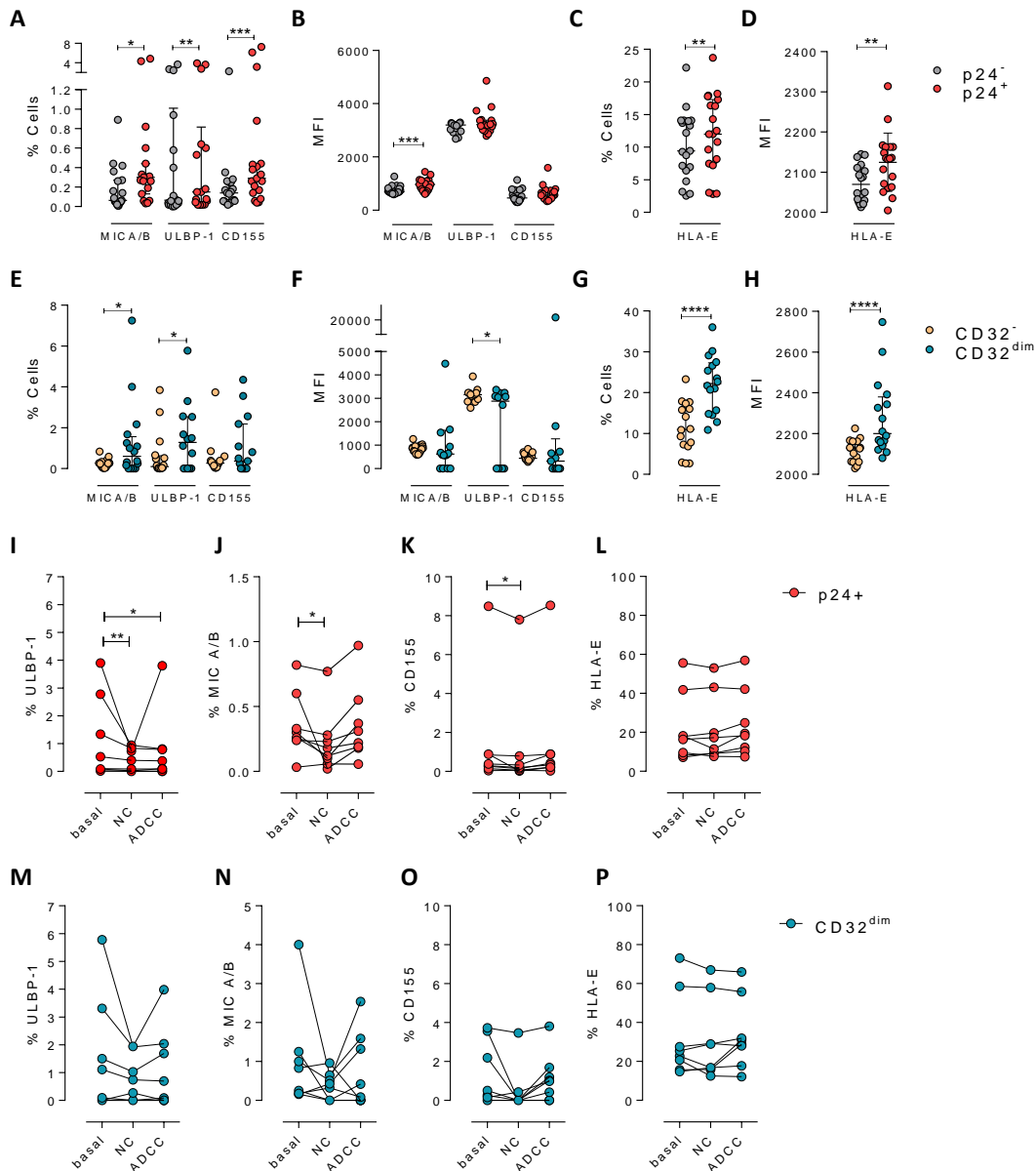


Figure 5. Expression of NK-ligands in cells resistant to NK-mediated killing. HIV-infected cells from healthy donors were subjected to NK-killing assays and the percentage of expression of different NK-ligands was measured by flow cytometry in different fractions (CD32⁻ and CD32^{dim}) of infected (p24⁺) or uninfected (p24⁻) cells. **A-H)** Expression of NK-ligands before performing the killing assays (n=19): **A)** Percentage of CD4⁺ T cells expressing MIC A/B, ULBP-1, and CD155. **B)** Mean Fluorescence Intensity (MFI) values for the expression of MIC A/B, ULBP-1, and CD155 on CD4⁺ T cells. **C)** Percentage of CD4⁺ T cells expressing the MHC molecule HLA-E. **D)** MFI values for HLA-E expression on CD4⁺ T cells. **E-H)** Same analyses as A-D but showing HIV-infected CD32^{dim} and CD32⁻ cells. **I-P)** Expression of NK-ligands on HIV-infected cells not killed by the different NK-killing mechanisms. Natural Cytotoxicity (NC) and Antibody-Dependent Cell Cytotoxicity (ADCC). **I-L)** Expression of NK-ligands on total infected CD4⁺ T cells before and after NK killing. **M-P)** Expression of NK-ligands on infected T_{CD32^{dim}} cells before and after NK killing. All graphs show median with interquartile range and the statistical comparisons were performed using the Wilcoxon matched-pairs signed rank test. *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001; ****p<0.0001.

Blockade of HLA-E or treatment with IFN- α or IL-15 does not enhance the killing of HIV-infected T_{CD32^{dim}} cells

Given the unique properties of T_{CD32^{dim}} cells, we further explored several strategies to potentiate its elimination by NK cells. We showed that T_{CD32^{dim}} cells had a remarkable enrichment of the NK-ligand HLA-E. Thus, using ex vivo infected cells, we performed functional assays blocking the interaction of HLA-E with its cognate receptors on NK cells by adding specific antibodies against HLA-E (patients #38, 44, and 46-51, **Table S1**). In general, the NC response was not enhanced after HLA-E blocking, either in the whole population of infected cells (p24⁺) or in the T_{CD32^{dim}} subpopulation (**Figure 6A and B**). However, we observed a more potent ADCC immune response after blocking HLA-E against all infected cells, including the infected T_{CD32^{dim}} pool (**Figure 6A and B**). Remarkably, the use of an isotype control antibody also significantly enhanced the killing of all infected cells (**Figure 6A and B**), evidencing the non-specificity of the anti-HLA-E antibody at enhancing ADCC. Thus, blocking the interaction of HLA-E with its receptors in NK cells did not reverse the intrinsic immune resistance of T_{CD32^{dim}} cells. In addition, we tried to directly reinvigorate NK cells from HIV-infected patients (#52-58, **Table S1**) culturing them with the cytokines IL-15 or IFN- α . As expected and previously reported [422], we observed an enhanced performance of NK cells against the total gp120-coated CD4⁺ T cell population when treated with IL-15, and to a lesser extent with IFN- α . However, neither IL-15 nor IFN- α were able to enhance the ADCC response against T_{CD32^{dim}} infected cells (**Figure 6C**).

Figure 6

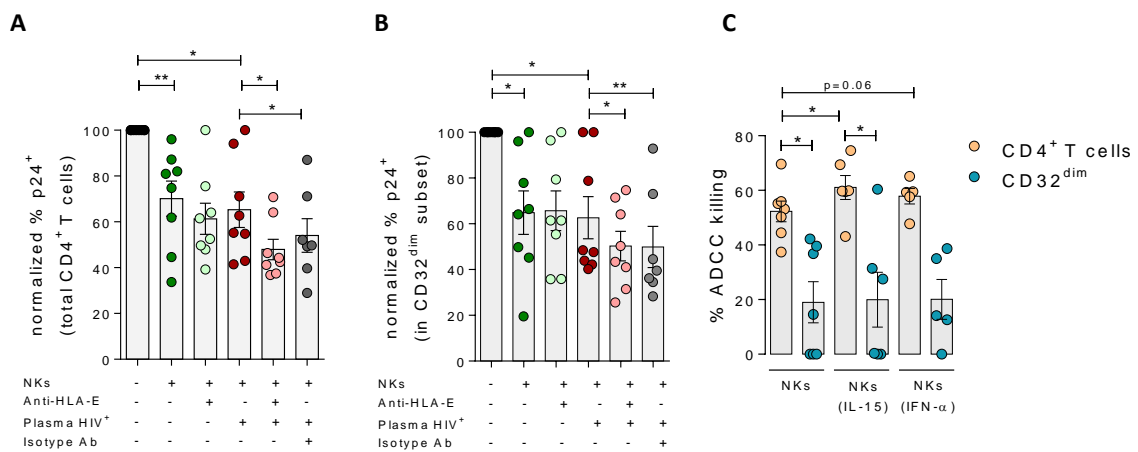


Figure 6. Neither anti-HLA-E antibodies nor IL-15 or IFN- α potentiate NK-mediated killing of T_{CD32^{dim}} cells. CD4⁺ T cells from ART-suppressed patients, either ex vivo infected with HIV_{NL4.3} (A and B) or coated with a gp120 recombinant protein (C), were subjected to NC (NK condition) and ADCC (NK + plasma) assays in the presence of blocking antibodies or cytokines known to enhance the NK function. **A-B**) Graphs showing the percentage of reduction in HIV-infected cells after using anti-HLA-E antibodies or isotype controls in NC and ADCC functional assays (n=8): **A**) in total CD4⁺ T cells and **B**) in T_{CD32^{dim}} cells. Mean with SEM is represented. Statistical comparisons consisted of the Wilcoxon matched-pairs signed rank test. **C**) Percentage of ADCC killing of HIVgp120-coated CD4⁺ T cells by autologous NK cells after treatment with IL-15 or IFN- α . Mean with SEM is represented. Statistical comparisons consisted of the Wilcoxon matched-pairs signed rank test. *p<0.05; **p<0.01.

Viral-reactivated cells expressing CD32 from ART-treated patients are resistant to NK cell-mediated cytotoxicity.

Last, to assess if NK cells from ART-treated patients were able to kill viral-reactivated CD32^{dim} cells, we first set up a primary latency model using unstimulated CD4⁺ T cells from ART-treated patients (**Figure S8A**). This assay allowed us to enrich the number of latently HIV-infected cells, which were then subjected to NK-cytotoxic and ADCC assays (patients #68-73, **Table S1**) (**Figure S8B**). We observed successful viral reactivation after treatment with the LRA ingenol, both in total CD4⁺ T cells (**Figure 7A**) and in the T_{CD32^{dim}} subset (**Figure 7B**), as well as a higher p24 expression within the T_{CD32^{dim}} cell fraction compared to the T_{CD32^{neg}} (median of 20.00% vs. 13.35%, respectively) (**Figure 7C**). Next, we performed NK cytotoxicity and ADCC assays after viral reactivation. NK cells were able to reduce the total pool of viral-reactivated cells by NC (median of 13.50% vs 3.40% for Ingenol and Ingenol+NK, respectively), and also by ADCC (median of 1.49% for Ingenol+NK+Plasma) (**Figure 7D**). Of note, the addition of plasma from an HIV⁺ patient in the absence of NK cells was highly toxic for viral-reactivated cells (**Figure 7D**). Conversely, the addition of plasma to primary lymphocytes (uncoated and gp120-coated) without any LRA did not compromise cell viability (**Figure S9**). The same toxic effect induced by the HIV⁺ plasma was observed in the viral-reactivated pool of cells expressing CD32^{dim} (**Figure 7E**). Ingenol is a protein kinase C (PKC) activator, a protein that plays a central role in mediating the signal transduction of extracellular stimuli and is involved in the regulation of cell proliferation, differentiation, cell survival, and apoptosis [423]. Thus, we speculate that ingenol treatment might sensitize cells to be more susceptible to certain plasma components. Besides, and differing from the vast majority of HIV-expressing cells (**Figure 7D**), the frequency of viral-reactivated CD32^{dim} cells increased with the presence of NK cells, both alone (NC condition) and to a lesser extent when plasma was added to the culture (ADCC condition) (**Figure 7E**). Noteworthy, the fraction of infected cells T_{CD32^{dim}} was more refractory to both NK-mediated immune mechanisms, NC and ADCC, in comparison to the negative T_{CD32^{neg}} fraction (**Figure 7 F-G**).

Next, we aimed to validate our results through the study of the in vivo natural latent reservoir after ex vivo viral reactivation. First, using samples from 9 ART-suppressed patients (patients #59-67, **Table S1**), we reactivated CD4⁺ T cells with different latency-reversing agents (LRA) and applied the Prime Flow RNA (FISH-flow) *in situ* hybridization (ISH) assay, which allows detecting at a single cell level cells expressing viral RNA, as described before [408]. The gating strategy is shown in **Figure S10A**. Of note, the results were in agreement with our primary model of HIV latency; we observed a higher increase of HIV-RNA⁺ cells in the T_{CD32^{dim}} fraction compared to T_{CD32^{neg}} cells in all conditions and, within T_{CD32^{dim}} cells, HIV-RNA⁺ cells were more frequent after LRA treatment compared to untreated cells (**Figure 7H**). Upregulation of CD32 expression upon LRA treatment was evidenced in total CD4⁺ T cells (**Figure S10B**). Furthermore, we performed functional NK assays using samples from 13 additional ART-suppressed patients after reactivation of the natural HIV reservoir (patients #74-86, **Table S1**). By using an intracellular p24 staining protocol, we successfully observed viral reactivation of dormant HIV in 9 samples (**Figure 7I**) out of the 13 tested (**Figure S10C**), with which we performed ADCC assays. An example of p24 detection using this functional assay is shown in **Figure S10D**. We observed the expression of CD32 after latency disruption, which constituted a significant fraction of the total pool of viral reactivated cells (**Figure 7J**). Also in line with our previous results, viral reactivated

cells were enriched for cells expressing CD32 (**Figure 7K**). In general, and as previously reported [424, 425], the NK cytotoxic response was variable among patients, and 7 out of 9 patients were capable of mediating NK cytotoxicity and 6 out of 9 ADCC (**Figure 7L**). Notably, ADCC assays were performed using autologous plasma from the same virologically-suppressed patients (mean time of undetectable viremia of 62 months [range 27-103]). This is noteworthy since ART treatment may decrease the number of antibodies mediating ADCC [336]. Moreover, using the samples from the 3 patients without detectable ADCC activity (#78, #79 and #83), we evaluated their NK activity by performing an ADCC assay using plasma containing ADCC-inducing antibodies from a viremic patient. While NK cells from patient #78 successfully mediated ADCC in these conditions, cells from #79 and #83 failed to induce ADCC (**Figure S10E**), indicating that the absence of ADCC activity in some ART-suppressed patients could also be related to factors extrinsic to the presence of ADCC-inducing antibodies. Last, we evaluated the population of viral-reactivated cells expressing CD32 in these patients. In general, this subpopulation was maintained, and even enriched in some cases, after the ADCC assay (condition with plasma) (**Figure 7M**). Concordantly with previous results, T_{CD32}^{dim} cells showed a higher pattern of ADCC resistance compared to the total HIV-reactivated cells (**Figure 7N**). Altogether, our results show that the latent HIV reservoir express CD32 upon viral reactivation with LRAs, and the resulting T_{CD32}^{dim} infected cells are more resistant to NK-mediated killing and, in particular, to ADCC activity, than the whole infected population. Importantly, antibodies endowed with ADCC-triggering capacity are still present in some ART-suppressed HIV-infected patients, yet the T_{CD32}^{dim} population might escape from this immune mechanism.

Figure 7

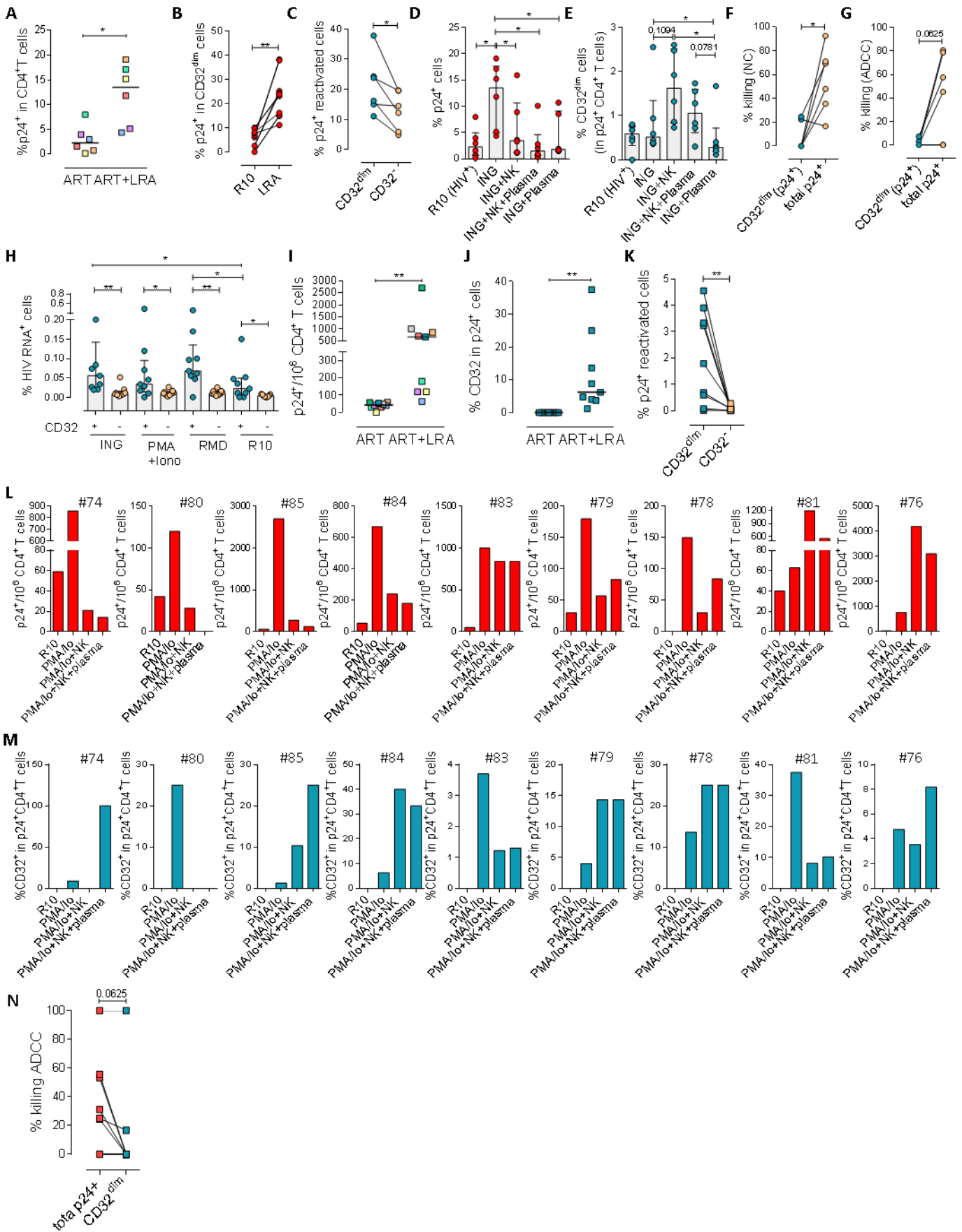


Figure 7. Expression of HIV in T_{CD32^{dim}} reservoir cells after latency disruption and susceptibility to NK immune responses. **A-G)** Shows data from a primary cell model of HIV-latency after viral reactivation with the LRA ingenol: **A)** Percentage of HIV reactivation measured as the percentage of p24⁺ cells after 20h treatment with the LRA. **B)** Percentage of HIV reactivation in T_{CD32^{dim}} subset. **C)** Percentage of viral reactivation within the T_{CD32^{dim}} and T_{CD32^{neg}} cells. **D)** NK killing assays against virally-reactivated cells. Percentage of HIV-infected cells are shown after 4h co-culture with NK cells or controls. **E)** NK killing assays against virally-reactivated cells expressing CD32. The frequency of T_{CD32^{dim}} cells in HIV-reactivated cells is shown after incubation with plasma HIV⁺ and/or NK cells. **F)** Percentage of NK-mediated killing by Natural Cytotoxicity (NC) of the T_{CD32^{dim}} subset and the total p24⁺ cells. Data were normalized to the control medium condition in the absence of NK cells. **G)** Percentage of NK-mediated killing by Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity (ADCC) of the T_{CD32^{dim}} and the total p24⁺ cells. The percentage of ADCC was calculated as the reduction of p24⁺ cells normalized to the condition with plasma alone. **H-N)** Shows data from the direct ex vivo reactivation of the natural HIV reservoir in ART-suppressed patients. **H)** Percentage of HIV-RNA expressing cells, measured by the RNA FISH-flow assay, within the T_{CD32^{dim}} and T_{CD32⁻} subsets after viral reactivation with Ingenol, PMA/ionomycin, or romidepsin (n=9). Median with interquartile range is represented. **I)** Percentage of p24⁺ cells after 18h viral reactivation with PMA/ionomycin. **J)** Percentage of CD32 expression within the total p24⁺ pool before and after HIV reactivation. **K)** Frequency of viral reactivation within the total pool of T_{CD32^{dim}} and T_{CD32⁻} cells. **L)** NK killing assays against viral reactivated cells. Number of p24⁺ cells per million CD4⁺ T cells after the addition of NK cells only or together with the autologous plasma is shown for the individual patients. **M)** Percentage of T_{CD32^{dim}} within p24⁺ cells after HIV reactivation and functional NK-mediated assays. **N)** Percentage of NK-mediated killing by ADCC of the reactivated T_{CD32^{dim}} or total p24⁺ cells (n=9). ADCC was calculated as the reduction of p24⁺ cells after the co-culture with NK and plasma and normalized to the condition with NK cells alone.

DISCUSSION

The presence of cellular and anatomical viral reservoirs, not susceptible to ART or antiviral immune responses, is the main barrier to cure the HIV infection. Thus, elucidating how these reservoirs are maintained for prolonged periods of time represents an important step towards the cure of HIV. Remarkably, we postulate a pivotal role of ADCC-NK in shaping the HIV reservoir during ART, being a novel route to avoid NK cell effector immunity by HIV-reservoir cells. We found that the expression of the molecule CD32 on productively HIV-infected cells confers intrinsic resistance to ADCC activity by NK cells. Furthermore, when infected *ex vivo*, these cells express higher levels of the molecule HLA-E, which also limits NK-mediated killing. Last, upon interaction with immune complexes, their capacity to bind to HIV-specific antibodies decreases, while gaining the potential to proliferate. Considering that a significant proportion of HIV-latently infected cells expressed CD32 upon viral reactivation, as shown here and reported before [276], these cells will indeed benefit from these reported NK immune evasion mechanisms. Altogether, these factors may greatly contribute to perpetuating the persistence of the cell reservoir.

One of the main obstacles in the HIV cure field has been the lack of reliable markers to uniquely identify persistently infected cells. Amongst proposed molecules, we find immune checkpoint inhibitors such as PD-1 [426], the B cell surface marker CD20 [107], CD30 [198], or, more recently, a combination of several receptors [397]. However, the Fc γ receptor CD32 is perhaps one of the most promising HIV reservoir markers, since it is expressed during latent [202, 203] and transcriptionally-active infection [201, 204, 205, 427]; it has been localized in main tissue reservoirs such as the cervical tissue [125], lymph nodes [201, 204] and the gastrointestinal tract [205] and, in some cases, it has been associated with a very prominent enrichment for HIV DNA [125, 202, 203]. This molecule is typically expressed on myeloid cells or platelets, in which its function has been extensively studied [200]. While CD32 expressed on CD4⁺ T cells is fully functional [417, 428], many questions remain unknown regarding the expression dynamics and function, in particular during HIV pathogenesis. In a recent study with SIV-infected non-human primates, CD32⁺CD4⁺ T cells were strongly increased in LNs, spleen, and intestine during SIV mac infection, were enriched in markers often expressed on HIV infected cells, and contained higher levels of actively transcribed SIV RNA [427]. Consistent with previous reports [201, 418], we detected dim levels of CD32 on CD4⁺ T cells from ART-suppressed patients, which increased upon *ex vivo* HIV infection or reactivation. This result is in line with a recent publication showing the ability of cells expressing CD32 to reactivate latent HIV [202]. Moreover, tissue-resident CD4⁺ T cells with expression of CD32 have been reported in cervical samples in the absence of infection. Importantly, this fraction of cells was intrinsically enriched for the expression of molecules related to HIV susceptibility and long-term maintenance [125]. In this sense, cell proliferation is one of the most important mechanisms of cell reservoir maintenance in long-term ART-suppressed patients [113, 239, 429]. Importantly, we show that CD32-expressing cells had a higher proliferative potential in response to IC. Inherent proliferative capacity of this subset has recently been reported in a study demonstrating CD4⁺ T cell activation upon CD32 ligation with antibodies or aggregated IgG [417]. Thus, understanding the mechanisms by which HIV-infected cells expressing CD32 are maintained in the human body could significantly advance the search for an HIV cure.

NK cells are key players in the defense against many pathogens, including HIV, being not only one of the first lines of protection but also essential modulators of the adaptive immune responses. Therefore, the acquisition of resistance mechanisms to any of the NK effector functions may contribute to pathogen survival and, in the case of HIV, favor conditions for viral persistence. In this sense, it has been reported that NK cell immune pressure leads to viral sequence evolution [430], and HLA-mediated immune resistance mechanisms have been previously identified in productively HIV-infected cells [431, 432]. Moreover, resistance of reservoir cells to HIV-specific cytotoxic T cells has also been reported [244, 266], suggesting that viral persistence might be facilitated not only by cell proliferation mechanisms in the absence of viral antigen expression, but also by avoiding immune-mediated killing. Here, we show that the increased expression of CD32 on HIV-infected cells may be partially influenced by the HIV protein *Nef*, particularly on cells at the latest stages of infection, which are marked by the downregulation of the CD4 molecule. This result suggests that upregulation of CD32 may be due to a mixture of factors, including cell activation induced by HIV infection, as previously reported [400]. Importantly, *Nef* has been previously implicated in several immune strategies to evade both NK [335] and CD8⁺ T cell-mediated responses [431, 433].

NK cells recognize IgG–viral protein complexes, namely immune complexes, on infected cells via FcγRs to mediate ADCC, which is a potent mechanism to eliminate virally infected cells [48]. However, HIV has developed several strategies to evade this immune response. For example, *Vpu* reduces the presence of viral antigens susceptible to recognition by antibodies on the surface of infected cells [434]. This accessory protein is responsible for the decreased expression of tetherin, a cellular host restriction factor that retains HIV virions on the cell surface, and therefore diminishes ADCC responses [434]. Moreover, *Vpu* and *Nef* downregulate CD4 expression on infected cells, preventing its interaction with Env trimers, which subsequently impedes the binding of ADCC-antibodies [435]. Overall, a proper antibody-induced immune synapse with NK cells is required to elicit a potent ADCC immune response, which depends on many factors, such as spatial configuration, valence of the antibody-epitope binding, antibody conformation, and the resulting size of the immune complex [436]. In our study, we show that the interaction of T_{CD32}^{dim} cells with IC present in plasma leads to suboptimal binding of HIV-specific antibodies, limiting ADCC. These results suggest that Igs, and likely other immune mediators such as pentraxins [415], might contribute to maintaining HIV-reservoir cells through the interaction with the CD32 receptor, conferring resistance to ADCC activity, which intrinsically requires the presence of immune complexes. This is not the first non-desirable effect of Igs identified in the context of an infectious disease; an antibody-dependent enhancement of infection has been extensively reported for Dengue infection [437]. The intrinsic nature of antibodies, with an antigen-binding fragment (Fab) and a crystallizable fragment (Fc) as separate functional domains, adds complexity to the multiple functions and interactions that ultimately contribute to modulate immunity [438]. Importantly, increased knowledge on the Fc effector functions of IgG antibodies is greatly contributing to the design of new therapeutic strategies based on Fc-optimized monoclonal antibodies to promote effective Fc effector activities [439]. In fact, a major line of research in the field currently focuses on the potential use of broadly neutralizing antibodies (bNAbs) as a therapeutic or prophylactic treatment for HIV infection, relying on the efficient blocking of the virus and the triggering of potent immune effector responses, for example, through FcγR interactions [356, 379]. Since the fraction of HIV-infected

cells expressing CD32 may remain untargeted in those settings, our findings imply a challenge that should be considered in any strategy aiming at the passive transfer of HIV-specific antibodies or their elicitation through vaccines.

Furthermore, as previously reported by others, HIV infection maintains or even increases the expression of the non-classical HLA-E molecule, which may contribute to the inhibition of the NK cytotoxic response [421, 440]. Interestingly, we found enrichment of HLA-E expression in the pool of HIV-infected cells expressing CD32, which could tilt the balance towards NK inhibition, therefore, conferring an additional advantage to survive. HLA-E can interact with NK cells through two receptors: NKG2A (inhibitory) and NKG2C (activating) [441]. Of note, the affinity of the NKG2A protein for HLA-E is higher than that of NKG2C [442]. Further, NKG2A⁺ NK cells do not typically express NKG2C, thus representing a pool of NK cells that can potentially be restricted by HLA-E [443]. The effect of HLA-E suppressing immune responses has been shown in several settings, including in the context of senescence or tumors, where blocking its interaction reinvigorated effector functions [404, 405]. In addition, HLA-E has been shown to impair ADCC against HIV-expressing cells, while impeding its interaction with NK cells improved the elimination of target cells [421]. Our results showed only a modest enhancement of NK-mediated killing of CD32^{dim} HIV-infected cells by ADCC when HLA-E was blocked. However, this potentiation was not specific, since the isotype control induced a similar effect. The killing of aberrant cells mediated by NKs is determined by a complex balance of signaling received through their multiple receptors which interact with molecules on the surface of undesired cells [402]. Thus, other molecules expressed by T_{CD32^{dim}} cells may be contributing to elevating the threshold for NK activation needed to eliminate this cell subpopulation in these patients.

In recent years, major efforts have focused on the identification of compounds to reactivate persistent HIV from its dormant state, with the ultimate goal to eliminate viral infection. However, it has become clear that the stimulation of the immune system is also a mandatory step for the elimination of persistent HIV [444]. These approaches, known as *shock and kill*, have shown little efficacy in several clinical trials in terms of HIV reservoir reactivation and the reduction of its size [445]. This failure has been attributed to both, a poor capacity of the different LRAs to reactivate all latent HIV [276], together with the dysfunction of the immune cells to kill viral reactivated cells [258]. Our results show that the magnitude of the killing also depended on the potency of the NK cells, where NK cells from ART-suppressed patients with higher total HIV reservoir size were functionally impaired. These results are in agreement with previous reports showing that HIV chronic infection has a deleterious effect on NK cell function, which is not completely restored despite ART [263, 264]. To reinvigorate NK function in these patients we treated NK cells with the cytokines IL-15 or IFN- α . Despite a clear immune effect on the total infected population, we did not increase the killing of T_{CD32^{dim}} cells. A plausible explanation would be the upregulation of NKG2A on NK cells mediated by these cytokines [446, 447], which would further limit the killing of cells already expressing high levels of HLA-E, such as T_{CD32^{dim}} cells.

A potential limitation of our study is the decline of HIV-specific antibody levels in ART-treated patients [336, 448]. Despite this decline, functional ADCC activity mediated by NK cells remains detectable in long-term virally-suppressed individuals [336]. Of relevance, we show here the existence of functional ADCC activity using plasma samples from virologically-suppressed

patients. These antibodies induced significant NK-mediated elimination of the total pool of reactivated latently infected cells in some patients, although the subpopulation expressing CD32 was more resistant. Thus, our results suggest that, after viral reactivation, levels of HIV antigen expression susceptible to recognition by immune cells such as NK may be induced. Also, that ADCC could play a significant role in HIV persistence, highlighting the need for new strategies directed to impact resistant reservoir cells such as T_{CD32}^{dim} cells. However, the limited number of these cells observed in vivo in ART-treated patients restrains their study. In this sense, the few viral-reactivated cells detected after LRA treatment from the natural latent reservoir impede an extensive assessment of infected cells expressing CD32. Further, it is unclear which is the dynamic of CD32 expression on individual cells after viral reactivation and if changes on its expression would affect ADCC activity. Last, it is possible that infected T_{CD32}^{dim} cells are susceptible to cytotoxic $CD8^+$ T lymphocytes. Further research on these aspects are warranted. However, based on our results, we may speculate that this sort of immune resilient infected cells in vivo could certainly contribute to the source of viral rebound when ART is interrupted, or they could initiate a low level of viral replication in tissues where drugs are not able to fully penetrate. Moreover, their proliferative capacity in response to IC situates these cells as candidates for cells supporting cellular proliferation, one of the main mechanisms that perpetuate HIV reservoirs in vivo [49, 250].

SUPPLEMENTARY DATA

Table S1. Clinical data of HIV-infected 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 ART- VL-suppressed (months)	ART régime
1 (EC)	287	1170	52.8	<50	-	UNT
2 (EC)	11	840	23.7	<50	-	UNT
3 (EC)	51	1030	36.0	<50	-	UNT
4 (EC)	104	1610	46.0	<50	-	UNT
5 (EC)	59	890	NA	<50	-	UNT
6 (EC)	321	490	20.4	<50	-	UNT
7 (EC)	189	410	23.2	<50	-	UNT
8	221	1240	40.1	<50	158	EFV+TDF+3TC
9	373	960	33.7	<50	113	COB+DRV
10	301	1050	27.0	<50	142	COB+DRV
11	102	1040	37.0	<50	61	DRV+RTV+3TC
12	128	760	28.1	<50	59	3TC+ABV+RPV
13	73	660	40.4	<50	67	3TC+ABV+NVP
14	333	670	24.1	<50	86	RPV+COB+DRV
15	67	830	28.6	<50	62	3TC+ABV+RPV
16	142	630	36.0	<50	85	FTC+RPV+TDF
17	213	1000	42.4	<50	76	FTC+RPV+TDF
18	107	600	31.0	<50	105	FTC+RPV+TDF
19	161	1150	36.5	<50	85	FTC+NVP+TDF
20	90	710	38.3	<50	85	FTC+TDF+COB+ATV
21	136	810	44.3	<50	90	3TC+ABV+EFV
22	86	1000	37.0	<50	66	FTC+RPV+TDF
23	319	689	24.5	<50	115	ETV+RTG+RTV+DRV
24	54	530	24.0	<50	51	RTG+3TC+ABV
25	119	750	27.9	<50	97	3TC+ABV+DTG
26	95	660	49.5	<50	69	ETV+FTC++TDF
27	323	2090	46.0	<50	43	3TC+ABV+DTG
28	240	NA	25.6	<50	71	TDF+COB+DRV
29	76	540	25.0	<50	56	RPV+FTC+TDF
30	65	570	26.2	<50	62	3TC+ABV+RTG
31	248	1050	32.0	<50	84	COB+DRV
32	293	560	24.4	<50	80	RTG+COB+DRV
33	113	600	38.7	<50	95	EFV+FTC+TDF
34	267	570	18.1	<50	98	RTG+FTC+TAF
35	134	870	48.7	<50	97	COB+DRV+DTG
36	98	680	54.0	<50	86	3TC+ABV+RPV
37	54	350	24.0	<50	48	RTV+FTC+TDF
38	121	850	35.6	<50	88	3TC+ABV+DTG
39	286	1060	30.3	<50	82	3TC+ABV+DTG

III. Resultados

40	99	930	46.0	<50	79	RPV+FTC+TDF
41	94	1160	31.0	<50	73	3TC+ABV+DTG
42	73	310	13.3	<50	67	3TC+ABV+RPV
43	99	450	25.0	<50	96	3TC+ABV+RPV
44	89	690	35.2	<50	85	RPV+FTC+TDF
45	98	800	40.2	<50	89	FTC+RTV+TAF
46	63	660	29.8	<50	24	BIC+FTC+TAF
47	116	550	38.4	<50	92	FTC+RPV+TDF
48	169	1040	37.4	<50	101	3TC+ABV+NVP
49	146	860	37.4	<50	54	RPV+FTC+TDF
50	60	890	34.5	<50	55	3TC+ABV+DTG
51	40	570	27.4	<50	28	3TC+ABV+DTG
52	214	890	37.0	<50	99	EFV+FTC+TDF
53	135	790	27.5	<50	90	RPV+FTC+TDF
54	90	640	24.2	<50	62	DRV+FTC+TDF+RTV
55	193	890	34.1	<50	85	EFV+FTC+TDF
56	80	500	28.6	<50	72	RPV+FTC+TDF
57	178	850	39.5	<50	81	EFV+FTC+TDF
58	103	1170	44.0	<50	58	RPV+FTC+TDF
59	72	800	23.1	<50	18	ABV/3TC+DTG
60	33	490	21.0	<50	28	TDF/FTC+EVG/c
61	31	560	27.9	<50	11	TDF/FTC+EVG/c
62	49	1070	38.1	<50	39	TDF+FTC+EFV
63	31	810	34.7	<50	22	ABV/3TC+DTG
64	42	1150	37.0	<50	37	ABV/3TC+RPV
65	13	1760	57.7	<50	>13	TDF/FTC+EVG/c
66	55	970	NA	<50	45	ABV/3TC+DGT
67	168	540	NA	<50	54	TDF/FTC+EVG/c
68	92	1200	49.8	<50	81	BIC+FTC+TAF
69	307	1150	45.2	<50	103	3TC+ABV+RPV
70	80	670	35.6	<50	66	NVP+3TC+ABV
71	121	1400	39.0	<50	107	3TC+ABV+RPV
72	47	370	33.9	<50	45	3TC+ABV+DTG
73	230	560	58.2	<50	58	BIC+FTC+TAF
74	38	920	39.8	<50	27	COB+FTC+TAF+EVG
75	83	730	34.2	<50	25	COB+FTC+TAF+EVG
76	44	360	31.0	<50	35	RTG+3TC+ABV
77	116	590	23.0	<50	96	RPV+FTC+TDF
78	72	930	44.8	50	60	3TC+DTG
79	106	580	28.3	<50	34	BIC+FTC+TAF
80	97	640	29.0	<50	63	FTC+RPV+TAF
81	96	540	35.0	50	74	RPV+FTC+TDF
82	121	810	38.4	<50	45	BIC+FTC+TAF
83	169	650	35.7	<50	92	3TC+ABV+DTG
84	163	600	29.3	<50	70	FTC+RPV+TDF
85	105	670	32.1	<50	103	FTC+RPV+TDF

86	156	700	48.5	<50	118	COB+DRV+DTG
----	-----	-----	------	-----	-----	-------------

EC, Elite Controller; FTC, emtricitabine; TDF, tenofovir; NVP, nevirapine; ATV, atazanavir; 3TC, lamivudine; EFV, efavirenz; ABV, abacavir; RAL, raltegravir; EVG, elvitegravir; DTG, dolutegravir; DRV, darunavir; RPV, Rilpivirine; TAF, tenofovir alafenamida; BIC, Bictegravir; LPV, Lopinavir; /r, boosted with ritonavir; /c, boosted with cobicistat; UNT, untreated; NA: Not Available.

Figure S1

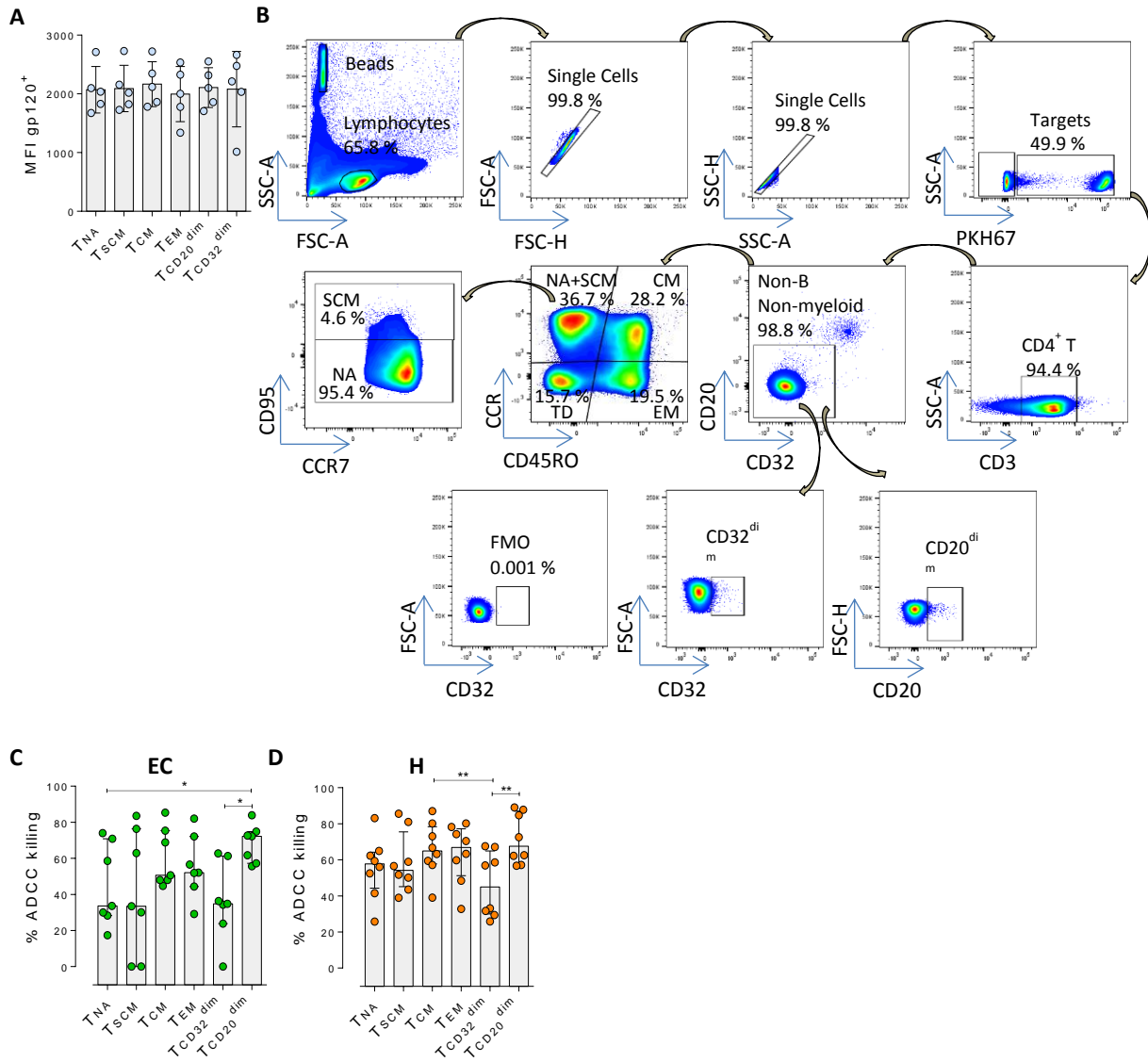


Figure S1. Gp120 cell coating efficiency, gating strategy for the NK-killing assays, and percentages of ADCC killing in elite controllers (EC), and healthy donors (HD). A Cell coating with recombinant gp120 HIV protein. Detection was performed by flow cytometry using the anti-gp120 antibody A32, and a FITC-labelled anti-human secondary antibody. Mean Fluorescence Intensity (MFI) values are shown. **B**) Gating strategy used to identify cell killing after the ADCC assay in the different cell subsets. Cell doublets were excluded by forward and side scatter signals and B and myeloid cells discarded based on their high expression of CD20 and CD32. Beads for absolute cell counting were included to calculate ADCC killing by measuring the disappearance of cells in each cell subset. **C-D**) Intrinsic susceptibility to NK-mediated ADCC of Naïve (T_{NA}), Stem Cell Memory (T_{SCM}), Central Memory (T_{CM}), Effector Memory (T_{EM}), T_{CD32^{dim}} and T_{CD20^{dim}}

subsets in **C)** EC, and **D)** HD. Median with interquartile range is shown. Statistical comparisons were performed using the ANOVA Friedman test. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

Figure S2

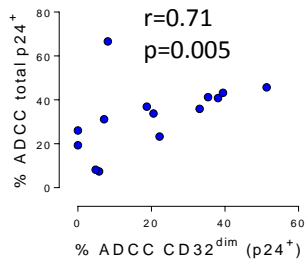


Figure S2. Spearman correlation between the percentage of ADCC-killing of the total HIV-infected CD4⁺ T cells and the percentage of ADCC-killing of the T_{CD32}^{dim} subset is shown.

Figure S3

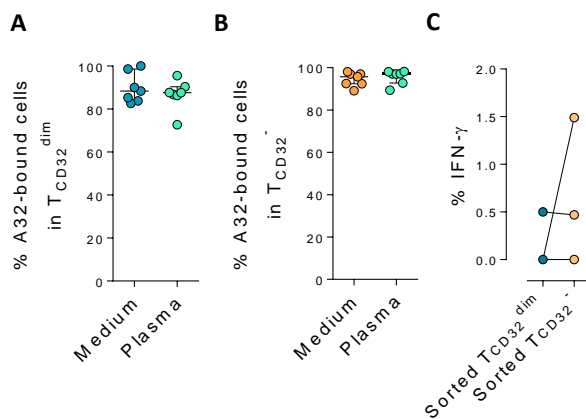


Figure S3. Binding of A32 to T cells and percentage of IFN- γ in cell conjugates. The binding capability of the A32 HIV-specific antibody (APC-labeled) to gp120-coated T_{CD32}^{dim} and T_{CD32}⁻ before and after incubation with plasma containing non-HIV specific IgGs, was measured by flow cytometry. **A)** Percentage of A32⁺ T_{CD32}^{dim} cells. **B)** Percentage of A32⁺ T_{CD32}⁻ cells. **C)** Percentage of IFN- γ ⁺ NK cells in cell conjugates with sorted T_{CD32}^{dim} and T_{CD32}⁻ cells after ADCC assays. Statistical comparisons were performed using the Wilcoxon matched-pairs signed rank test. * $p < 0.05$.

Figure S4

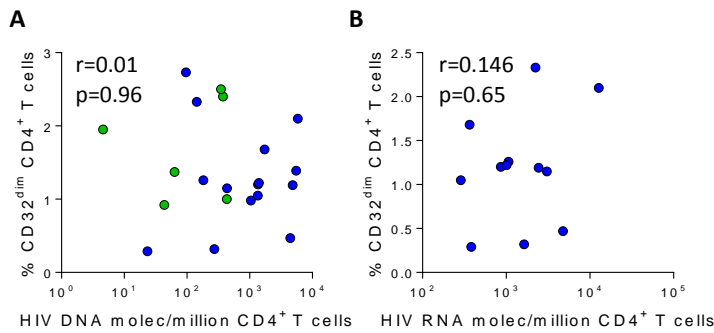


Figure S4. Correlations of the HIV-reservoir size and CD32 expression. Spearman correlations are shown in samples from HIV-infected patients. ART-treated and EC are shown in blue and green dots, respectively. **A)** Correlation between the total HIV DNA reservoir size and the frequency of expression of CD32 in CD4⁺ T cells. **B)** Correlation between HIV RNA levels in CD4⁺ T cells and the frequency of expression of CD32 in CD4⁺ T cells.

Figure S5

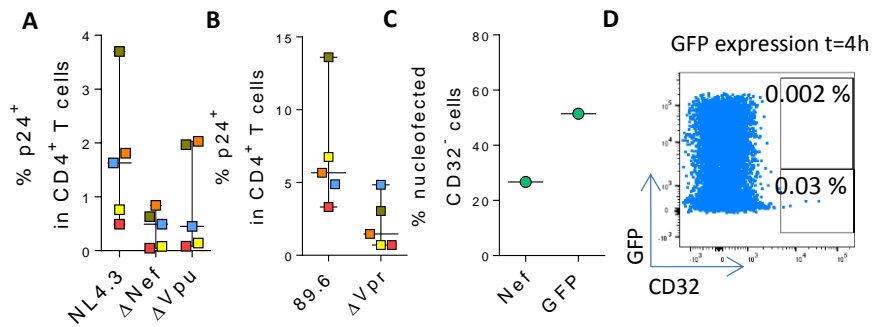


Figure S5. Effect of Accessory HIV proteins. **A-B)** Levels of viral infection measured as the percentage of p24⁺ cells by flow cytometry and after infection with parental or *nef*, *vpu*, or *vpr* defective viral constructs. **C)** Percentage of HA⁺ or GFP⁺ cells at 4h and 19h post-transfection after nucleofection of sorted CD4⁺T CD32⁻ cells with a plasmid encoding the *Nef*-HA protein or GFP. **D)** Flow cytometry plots showing the percentage of CD32 expression at 4h after nucleofection with a GFP encoding plasmid.

Figure S6

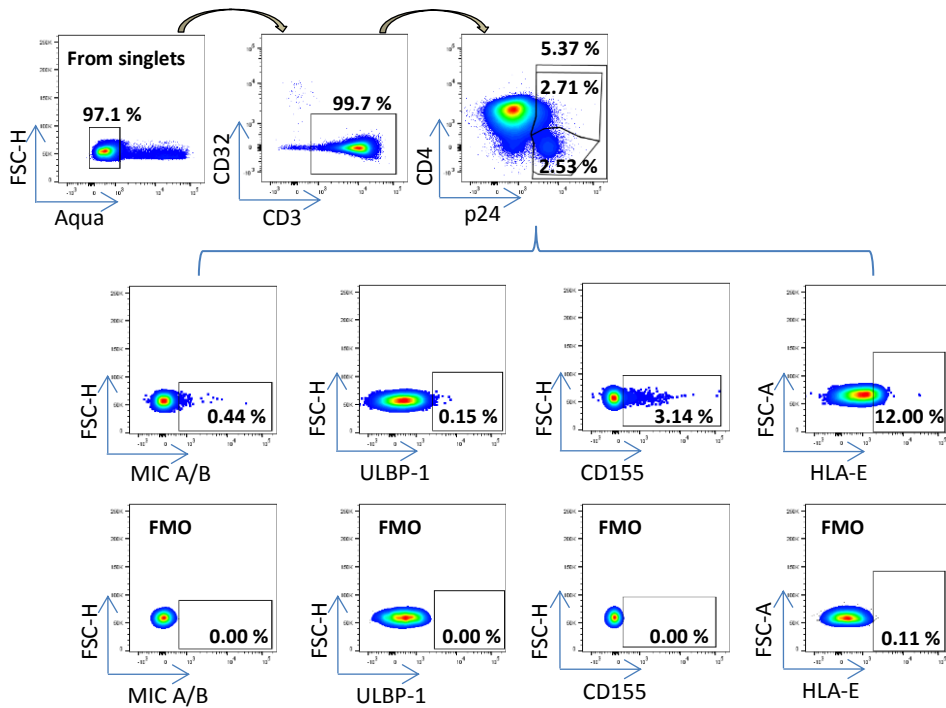


Figure S6. NK-ligands on HIV-infected cells. Representative flow cytometry gating strategy used to quantify the expression of MIC A/B, ULBP-1, CD155, and HLA-E ligands on HIV-infected cells after ex vivo infection. FMO controls are also shown.

Figure S7

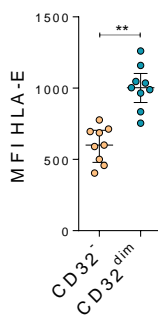
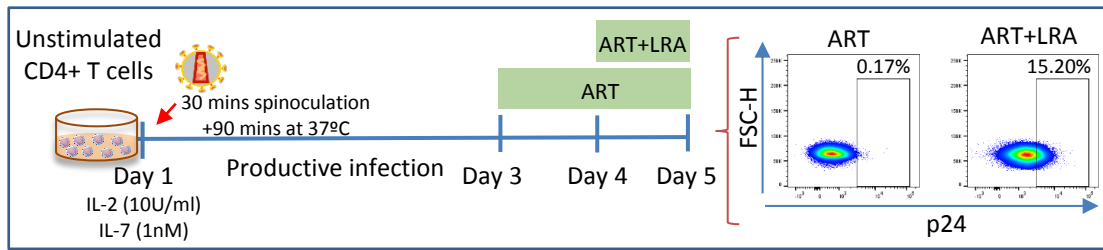


Figure S7. Mean Fluorescence Intensity (MFI) values of HLA-E expression on CD4⁺ T cells in the absence of HIV infection. Median with interquartile range is shown. Statistical comparison consisted of the Wilcoxon matched-pairs signed rank test. **p<0.01.

Figure S8

A



B

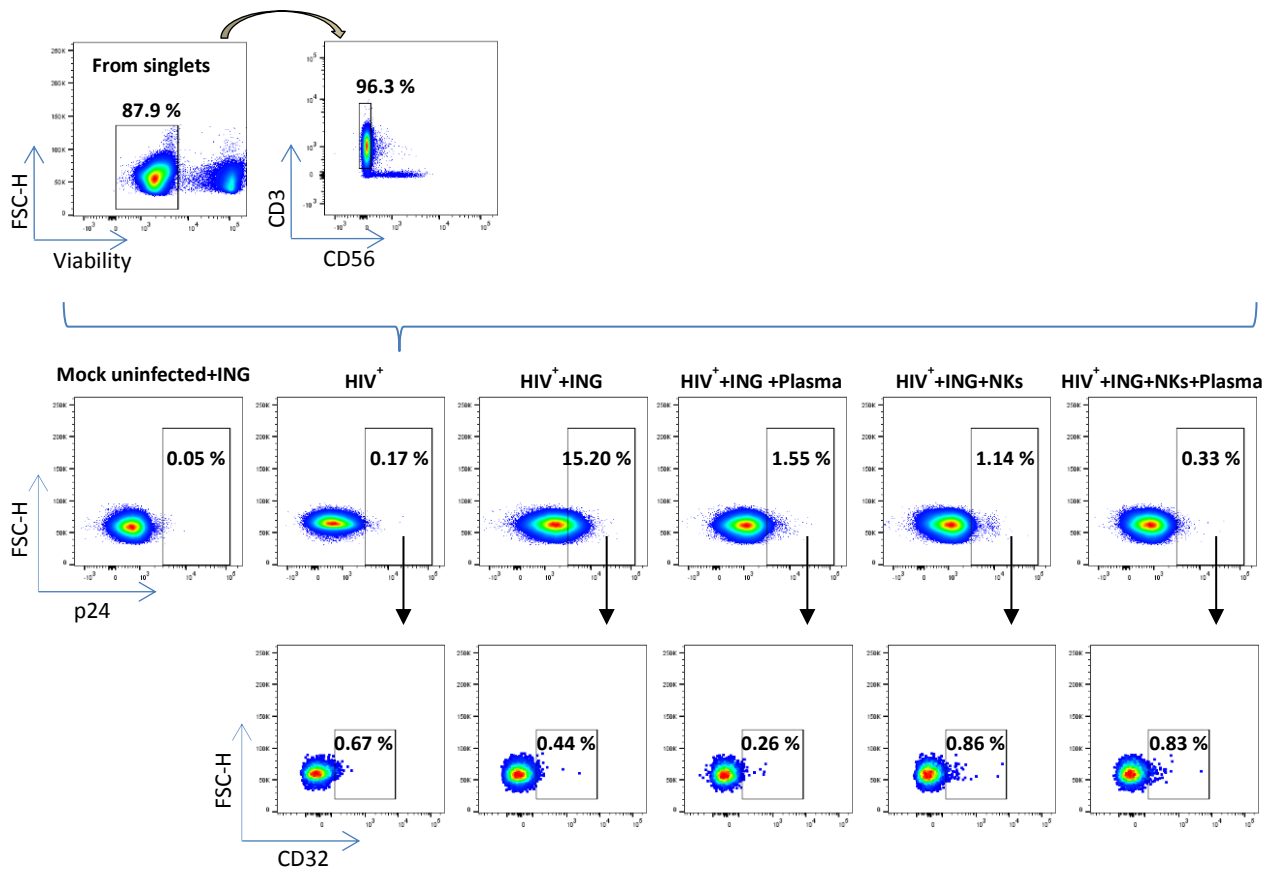


Figure S8. Primary cell model of HIV latency. Flow gating strategy used for the identification of HIV-infected cells (p24⁺) expressing CD32. A) Schematic representation of the protocol used to generate latent cells and representative flow cytometry plots showing p24 expression levels after viral reactivation. B) A representative experiment of functional assays of viral reactivation under different conditions is shown. Ingelol (ING) was used as an LRA.

Figure S9

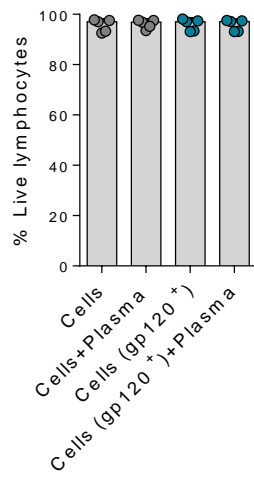


Figure S9. Percentage of viable primary lymphocytes after cell incubation with HIV⁺ plasma from a viremic patient. When indicated, cells were coated with gp120 recombinant protein as described in the material and methods section.

Figure S10

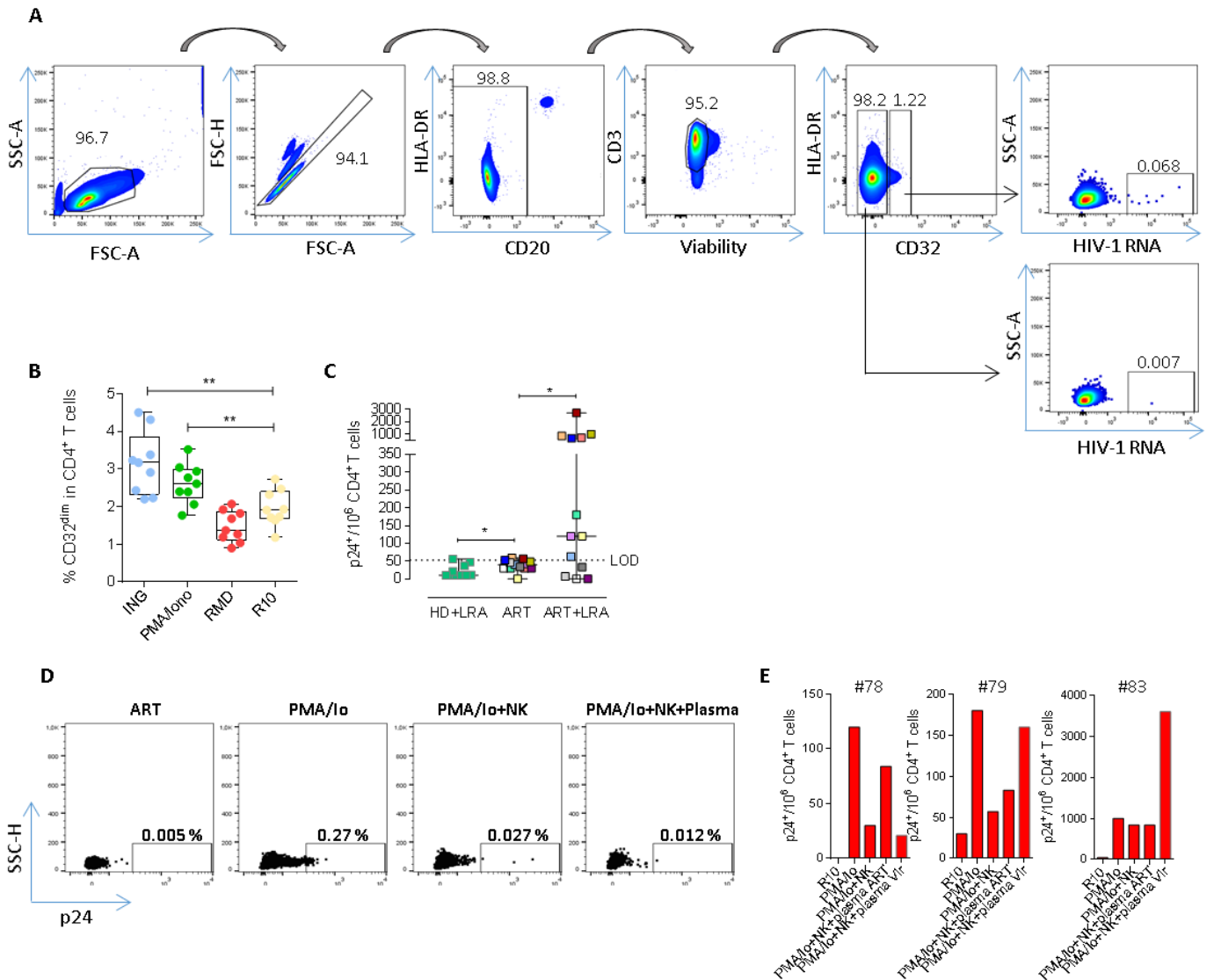


Figure S10. Expression of HIV-RNA and viral protein p24 in $T_{CD32^{dim}}$ reservoir cells after viral reactivation.
A) Flow cytometry gating strategy used for the identification of $T_{CD32^{dim}}$ cells expressing HIV-RNA after the RNA FISH-flow protocol. **B)** Percentage of $CD32^{dim}$ expression within the total $CD4^+$ T cells before and after LRA treatment, using samples from ART-suppressed HIV infected patients subjected to RNA FISH-flow assay. Statistical comparisons consisted of the Wilcoxon matched-pairs signed-rank test. ** $p < 0.01$. **C)** $p24^+$ cells in samples from ART-suppressed patients at baseline and after viral reactivation with PMA/ionomycin (LRA). The limit of detection is set up at 53 copies/million cells calculated by the formula $3 \times SD$ of the mean percentage of $p24^+$ cells detected in healthy donor (HD) samples. **D)** Representative flow cytometry plots of viral reactivation levels (measured as $p24^+$ cells) after LRA treatment and NK functional assays. **E)** NK killing assays against viral reactivated cells. Number of $p24^+$ cells per million $CD4^+$ T cells after the addition of NK cells from patients #78, #79 and #83, using autologous plasma (ART) and plasma from a viremic HIV-infected patient containing a high titer of HIV-specific immunoglobulins (plasma Vir).

CAPÍTULO 2

Título

CONJUGACIÓN DE NANOPARTÍCULAS Y ANTICUERPOS MEDIANTE ADSORCIÓN COOPERATIVA Y SU EXPLOTACIÓN PARA FORZAR LA ELIMINACIÓN MEDIADA POR CÉLULAS NATURAL KILLER DE CÉLULAS INFECTADAS POR VIH

ANTIBODY COOPERATIVE ADSORPTION ONTO AUNPS AND ITS EXPLOITATION TO FORCE NATURAL KILLER CELLS TO KILL HIV-INFECTED T CELLS

Resumen

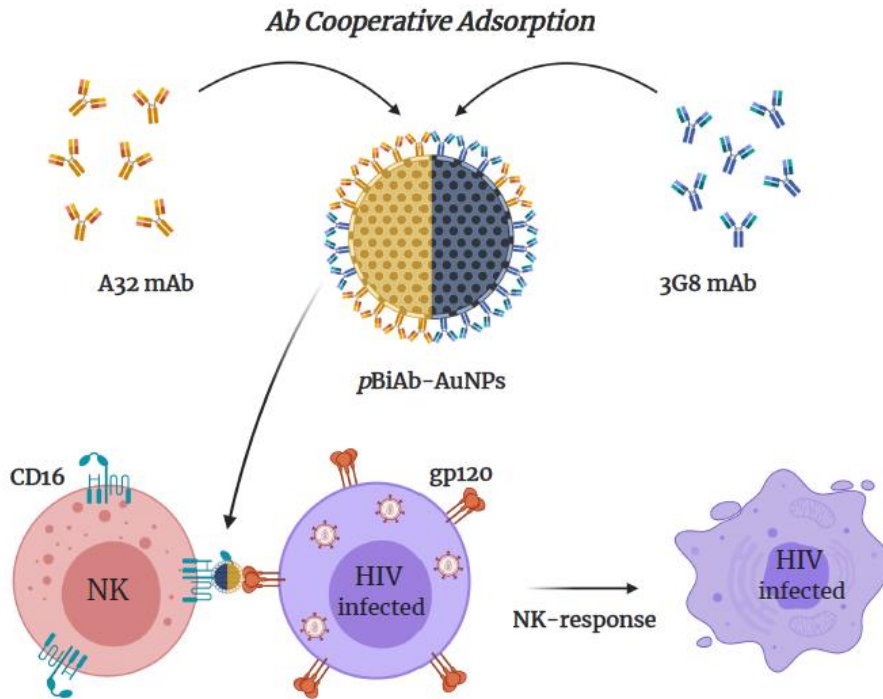
El VIH establece una infección persistente que altera el sistema inmunitario. Nuevas herramientas dirigidas a revertir este impacto en distintas poblaciones inmunes, son necesarias para combatir la infección viral. En este capítulo, se presentarán los resultados referentes al desarrollo de una nueva nanoherramienta diseñada para la mejora específica de la respuesta inmune mediada por células NK y dirigirla hacia las células T infectadas. Nanopartículas de oro biespecíficas, de aquí en adelante denominadas BiAb-AuNPs, dualmente conjugadas con anticuerpos dirigidos a la proteína gp120 del VIH y al receptor CD16 ampliamente expresado en células NK, se han generado mediante un nuevo método que promueve la distribución ordenada y segregación de los anticuerpos en dominios sobre la nanopartícula. Los anticuerpos conjugados mediante este método de adsorción cooperativa mantienen sus propiedades de reconocimiento específico de antígeno y mejoran el contacto específico entre células infectadas y células NK. Además, las BiAb-AuNPs han mostrado la capacidad de desencadenar potentes respuestas citotóxicas en las células NK tanto en sangre como en cultivos de tejido procedente de amígdala, y de reducir la infección latente tras la reactivación viral mediante fármacos en un modelo de latencia usando células primarias. Esta nueva nanoherramienta molecularmente dirigida para estimular el sistema inmune, representa una innovadora aproximación con potencial en otros contextos patológicos además de la infección por VIH.

Abstract

HIV represents a persistent infection which negatively alters the immune system. New tools to reinvigorate different immune cell populations to impact HIV are needed. Herein, a novel nanotool for the specific enhancement of the natural killer (NK) immune response towards HIV-infected T-cells has been developed. Bispecific Au nanoparticles (BiAb-AuNPs), dually conjugated with IgG anti-HIVgp120 and IgG anti-human CD16 antibodies, were generated by a new controlled, linker-free and cooperative conjugation method promoting the ordered distribution and segregation of antibodies in domains. The cooperatively-adsorbed antibodies fully retained the capabilities to recognize their cognate antigen and were able to significantly enhance cell-to-cell contact between HIV-expressing cells and NK cells. As a consequence, the BiAb-AuNPs triggered a potent cytotoxic response against HIV-infected cells in blood and human tonsil explants. Remarkably, the BiAb-AuNPs were able to significantly reduce latent HIV

infection after viral reactivation in a primary cell model of HIV latency. This novel molecularly-targeted strategy using a bispecific nanotool to enhance the immune system represents a new approximation with potential applications beyond HIV.

Graphical abstract



The results from this **CHAPTER 2** have been published in the journal Nano Today under DOI: <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2020.101056>. Intellectual property regarding the procedure to obtain polarized bispecific nanoparticles and applications has been protected (patent WO 2021/023649 A1).

Introduction

The augmentation of the effector immune responses towards specific targets, such as virally-infected or cancerous cells, is positioning itself as a new promising therapeutic intervention [449]. Indeed, an efficient immunological synapse between immune effectors and aberrant cells is a key factor to promote an effective immune-mediated killing of such undesired cells. In this context, cell-to-cell contact is required for natural killer (NK) cells, lymphocytes of the innate immune system that eliminate abnormal cells through several sophisticated biological mechanisms, including antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC), to accomplish their mission [343, 348, 450]. Unfortunately, in the context of a persistent viral infection, like the one established by the human immunodeficiency virus (HIV), the virus integrates into the genome of host cells and is able to escape from the immune response, therefore perpetuating the infection [110]. In turn, chronic infection leads to a persistent immune activation that promotes the appearance of dysfunctional NK cells with diminished capacity to kill infected cells [451], further impairing immune defences. Importantly, this functionality is not completely restored with the current antiretroviral therapy, and discontinuation of the treatment leads to a rapid viral rebound [452]. Thus, new targeted interventions are needed to help the immune system of HIV-infected patients to control the virus. In this regard, novel therapeutic strategies focused on the re-direction, potentiation and/or promotion of an efficient immunological synapse between NK and infected T-cells are highly desirable to efficiently combat such persistent viral infections.

Nano-based approaches with a dual capacity of recognition are emerging as promising bispecific formats to engage cell-to-cell contacts and potentiate antiviral and antitumor immunity [453]. Such nanotools based on nanoparticles (NPs) displaying mixtures of antibodies showed significant advantages over the more conventional bispecific antibodies, such as the possibility to regulate biological processes in a size-dependent manner, their capacity to penetrate into some tissues and cells and their enhanced potency mediated by their multivalent properties [454-456].

The interaction of proteins, including antibodies, onto inorganic surfaces, such as gold, has been a subject of intense studies in the field of biochemistry and medicine since implants were developed. These studies on the adsorption of proteins at surfaces, a phenomenon ubiquitous in nature, have shown two models: Random Sequential (disordered) vs Clustering (cooperative) adsorption [457]. The first indications on the mode in which IgGs adsorb onto AuNPs is the kinetics of the adsorption process that already points towards a cooperative mode: proteins at the NPs surface evolve from forming a transient corona to become permanent with time, known as *soft* and *hard* NP-Protein Corona (PC) respectively [458]. As it has been well described, when NPs are dispersed in protein solutions, these rapidly form a soft protein corona around the NP, formed of loosely bound proteins, in equilibrium with free proteins in solution. With time, this PC evolves, due to rearrangements and crowding effects, towards a permanent corona since protein-dense clusters are more stable at the NP surface than single proteins. Indeed, cooperative adsorption implies that a protein adsorbed to a surface binds more strongly to it if it is surrounded by similar proteins thanks to the possibility of build compact arrangements with identical building blocks, increasing coating stability (cooperative effect) as the protein domain grows. This evolves towards the formation of a complete *hard corona* of proteins permanently

attached to the NP surface that remains associated to the NP even after NP precipitation and resuspension into protein-free media [458, 459], thus conferring biological identity to the NP [460]. In these conditions, similar proteins pack better than those which are different, favoring thus the formation of homogeneous coating domains from a mix of coating molecules [461]. This evolution towards a more stable state, an expression of the Vroman effect on the surface of NPs [462], is what allows to explore *enthalpy-driven*, rather than *entropy-driven* states, which implies macromolecular ordering and domain segregation [463]. Thus, by controlling the principal parameters affecting the NP-protein interactions, such as relative concentrations and affinity, incubation time, pH, temperature, media ionic composition and solubility, it is possible to find the optimal conditions to promote the *cooperative adsorption* of proteins onto the NP [459] and consequently the formation of highly polarized NP conjugates [457, 464, 465].

Here, with the purpose to enhance the NK immune response towards HIV-expressing cells we have constructed bispecific nanoparticles following a novel cooperative adsorption conjugation protocol of a mixture of antibodies, inducing their domain segregation at the NP surface and resulting in a certain degree of NP functionality polarization. This novel molecularly-targeted approach uses the antibodies A32 (IgG anti-HIVgp120), which recognizes the protein gp120 expressed on the membrane of HIV-infected cells, and the 3G8 (IgG anti-human CD16, clone 3G8) that recognizes the CD16 receptor expressed on NK cells, conjugated to a 40 nm AuNP. This novel nanotool appears very promising for the targeting and immune-mediated elimination of HIV-infected cells.

Materials and methods

Ethics statement

PBMCs from healthy donors were obtained from the Blood and Tissue Bank, Barcelona, Spain. The study protocol was approved by the Comitè d'Ètica d'Investigació Clínica (Institutional Review Board number PR(AG)350/2017) of the Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Spain. Samples were obtained from adults, who all provided written informed consent, and were prospectively collected and cryopreserved in the Biobanc (register number C.0003590). All samples received were totally anonymous and untraceable. PBMCs from HIV-1-infected patients were also obtained from the HIV unit of the Hospital Universitari Vall d'Hebron (Institutional Review Board number PR(AG)350/2017). In addition, tonsil tissue was obtained from eight individuals 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.

Cells, antibodies and reagents

We used the cell lines CEM.NK^R CCR5⁺ and ACH-2 (obtained through the NIH AIDS Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH, from Dr. Alexandra Trkola [466, 467] and Dr. Thomas Folks [468, 469], respectively). PBMCs were isolated by Ficoll-Paque density gradient centrifugation and cryopreserved in liquid nitrogen. Cells were cultured 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.) (R10; control medium), and maintained at 37°C in a 5% CO₂ incubator. The A32 antibody was obtained through the AIDS Research and Reference Program, NIAID, NIH (Cat#11438) from Dr. James E. Robinson [407, 470]. The anti-CD16 clone 3G8 was purchased from Stemcell. BaL gp120 recombinant protein was also obtained through the NIH AIDS Reagent Program. Polyclonal IgG mouse and IgG rat were purchased from Sigma-Aldrich. IL-2 was obtained from the Vall d'Hebron Hospital pharmacy.

Synthesis of gold nanoparticles and conjugation with antibodies

Chemicals. Sodium citrate tribasic dihydrate (≥99%), gold (III) chloride trihydrate H₂AuCl₄ • 3H₂O (99.9% purity) and sodium tetraborate decahydrate were purchased from Sigma-Aldrich. All reagents were used as received without further purification and all glass material was sterilized and dehydrogenated in an oven prior to use. Mili-Q water was used in the preparation of all solutions.

Nanoparticle Synthesis. Aqueous solutions of sterile endotoxin free ~40 nm citrate-stabilized AuNPs were synthesized according to previously developed seeded-growth method following a citrate reduction protocol as previously described [471]. AuNPs were obtained after different sequential steps of growing, yielding 5*10¹⁰ NPs/ml (33 µg/ml). After purification by centrifugation, to discard by-products and contaminants, NPs were resuspended in a solution of 2.2 mM sodium citrate (SC) and stored at 4°C in the dark. All the particles were used within 20 days after their synthesis.

Nanoparticle Conjugation. Following our protocol, antibodies were dispersed in the conjugating media, consisting in a 4 mM borate 2.2 mM SC solution. The initial antibody concentrations were 3 µg/ml of the anti-HIVgp120 (A32), and 20 µg/ml of the anti-CD16 (clone 3G8). Then, the solution of AuNPs 2.2 mM was added drop-wise (volume ratio antibodies solution:NP solution of 1:1). The mixture was incubated for 48 hours (h) at 4 °C under mild agitation conditions (without magnet). Finally, we removed the conjugates from the unbound antibodies by centrifugation at 5000g for 40 mins. The difference in the antibody concentration used for each antibody is directly related to their different affinity for the AuNP surface, as demonstrated in the isothermal adsorption curves (**Figure 1b-c**). We optimized our protocol of conjugation by exploring different mixtures of ions to increase the stability of the process and the conjugates. We found that 3-10 mM range of borate and 2.2 mM SC solution conferred high stability to both antibodies and the nanoparticles (data not shown), allowing a soft interaction between them. In addition, it is well known that a slow and controlled addition of nanoparticles to a ion-optimized solution of diluted antibody (protein), and long-term incubation of the mixture at 4 °C under mild agitation conditions, lead to an ordered disposition of the different antibodies into segregated domains, forming polarized nanoparticles [458]. This cooperative adsorption phenomenon, facilitated by a weak perturbation of the conjugation system, translates the mixture to a new equilibrium, leading to polarized NPs [457, 464].

In addition, we reproduced a previously reported antibody-adsorption conjugation protocol to generate bispecific gold nanoparticles [472]. This protocol leads to a random disposition of the antibodies on the surface of gold nanoparticles (non-polarized). Briefly, 133 µl of 15 mM borate buffer pH 8.7 was added to 1 mL of AuNPs. 3 µg/ml of A32 antibody and 20 µg/ml of 3G8 were added and allowed to react under agitation for 30 mins. Afterwards, sucrose was incorporated to a final concentration of 5% and incubated for 30 mins. Then, 160 µL of 3% bovine serum albumin (BSA) were added and shaken for 10 mins. Thereafter, we centrifuged the sample (7,500g for 30 mins) to remove unbound antibodies and AuNPs were re-suspended in 1 mL of 2 mM borate buffer pH 8.7 containing 5% sucrose, 2% glycerol, 0.5% BSA, and 0.01% Tween. The washing step was repeated and the conjugate was re-suspended in 100 µL of the mentioned borate buffer.

Physicochemical characterization of BiAb-AuNPs

Physicochemical characteristics of the synthesized nanoparticles were assessed by different methodologies, such as electron microscopy. To characterize the different conjugates, we evaluated samples by UV-Vis spectrophotometry (Cary 60 UV-Vis Spectrophotometer, Agilent), Dynamic Light Scattering (DLS) and Zeta potential experiments. DLS and Zeta potential experiments were conducted in a Zetasizer Nano series instrument (Malvern). The particles size and Zeta potential were measured simultaneously three times. Previously to the characterization experiments, samples were centrifuged to remove the unbound antibodies.

TEM - SEM analysis. Transmission Electron Microscopy. Gold nanoparticles and Gold nanoparticles – antibody complexes were visualized using FEI MAGELLAN 400L XHR SEM. This microscope allows for images acquisition in the high energy (15-30 kV) SEM and STEM mode. The ultrathin Formvar-coated 200-mesh copper grid (Ted-pella, Inc.) were directly dipped in the sample solution and left to dry in air overnight. TEM images of the prepared colloidal AuNP were

used for the size distribution measurements. For each sample, the size of at least 100 particles was measured and the average size and the standard distribution were obtained. TEM and SEM images of the prepared AuNP – antibody complexes were used for the analysis of surface contact between AuNPs in the case of total antibody surface passivation or partial antibody surface passivation. The charging effect observable on the edge of the NPs visualized by SEM is associated to the presence of the organic layer. This effect provides information on the degree of NP surface passivation by the antibody.

UV-Visible Absorption Spectroscopy. UV-Visible absorption (UV-Vis) spectra were acquired on an Agilent Cary 60 UV-Vis Spectrophotometer. A total volume of 1 ml of the analysed sample was placed in a plastic cell and the spectral analysis was performed between 300 nm and 800 nm at room temperature. Cary WinUV software by Agilent has been used to collect the spectrophotometer output.

DLS and Zeta potential measurements. The hydrodynamic diameter and the surface charge of the colloids were measured by Dynamic Light Scattering (DLS) and Zeta Potential on a Malvern Zetasizer Nano ZS90 which incorporates a Z-potential analyser (Malvern Instruments Ltd, Worcestershire, UK).

Bioconjugates analysis by TEM-SEM

For conjugation, 50nm AuNPs were used at final concentration 4×10^{10} NP/ml (total surface area approximately 2×10^{14} nm²/ml). AuNPs were exposed to IgG molecules at two different final protein concentration, corresponding to i) a situation in which the number of IgG molecules theoretically cover the 60% of the total NPs surface, and ii) a situation in which IgG molecules theoretically cover the total NP surface with a 100x excess of antibody molecules. The total NP surface was calculated knowing the surface area of the 50nm AuNPs (7.85×10^3 nm² per particle). The IgG surface area used to estimate the theoretical number of IgG molecules in solutions, and consequently, the total NP surface coverage was calculated according to the relation with molecular weight specific for globular proteins [473] and approximating the IgG molecules to a sphere. IgG was adsorbed onto AuNPs by incubating the AuNPs with IgG in 10mM Borate Buffer pH 8.5 for a total time of 48h at 4°C under mild agitation (650 RPM). After 48 hours of incubation time, IgG-conjugated NPs were analyzed without further purification.

Bioconjugation to Nivolumab

50 nm AuNPs were conjugated to Nivolumab antibody. To perform bioconjugation, we calculated the theoretical number of biomolecules required to cover the whole NP surface knowing the surface area of the 50nm AuNPs (7.85×10^3 nm² per particle) and the surface coverage of Nivolumab molecule. For Nivolumab, we estimated the number of antibodies molecules needed to cover the NP surface according to the relation with molecular weight specific for globular proteins [473]. Incubation was performed in 10 mM Phosphate Buffer, pH 7.4 at Room Temperature, by directly diluting the AuNP in the protein solution in the presence of a 100x Nivolumab excess, in order to ensure complete surface coverage.

Distribution of antibodies on cooperatively-conjugated AuNPs by TEM

With the aim to directly observe if the optimized conjugation method leads to the segregation of a mix of antibodies in two different domains (polarization), we performed a straight forward experiment. On the one hand, AuNPs of ~ 60 nm were doubly conjugated with rabbit anti-HSA IgG (18 $\mu\text{g/ml}$) and rabbit anti-BSA IgG (18 $\mu\text{g/ml}$). On the other hand, we conjugated smaller AuNPs as labels: AuNPs of 25 nm were functionalized with BSA (5 μM) and of 15 nm functionalized with HSA (5 μM). The bispecific conjugates were incubated with the AuNPs functionalized with BSA and the AuNPs functionalized with HSA for 24h. Then, the sample containing the three types of AuNPs was purified from the excess of smaller AuNPs by decantation and after that, the TEM grids were prepared by dipping, by directly immersing the grids in the AuNPs solution and letting them dry in an open atmosphere overnight. Finally, the sample was analyzed by TEM, using an 80-keV TEM JEOL 1010 equipped with an Orius (Gatan) CCD Camera. TEM grids consisted on an ultrathin-formvar coated 200 mesh copper grid covered with a layer of carbon (Ted-Pella). The TEM images of 232 AuNPs of 60 nm were randomly obtained and classified depending on the apparent polarization formed by the specific recognition between 25 nm and 15 nm label AuNPs.

Thermogravimetric assay

Thermogravimetric analyses (TGA) were carried out on a Pyris TGA 8000 under N₂ flow with a temperature range from 30 °C to 600 °C at a heating rate of 5 °C·min⁻¹. Considering that the limit of detection is a loss in mass of 5 μg of antibody, a total volume of 417 μl of AuNPs was conjugated with mouse IgG producing 0.269 mg of bioconjugates. The purified bioconjugates were deposited in a ceramic crucible, allowing the excess of water to evaporate during 24h in a laminar flow cabinet.

Simulation model

Coarse-grained (CG) models were employed to extract the relevant characteristics for the studied processes [474]. In our model, one bead comprises three heavy atoms. The bead interaction parameters, topology and composition are chosen to mimic the inherent chemistry for the atoms. The employed model is *Dissipative Particle Dynamics (DPD)* [475], a stochastic CG simulation model that has been used to study soft matter [476], complex fluids and biomolecular systems, such as self-assembling amphiphilic micelles and bilayers, polymers, proteins, nanoparticles [463, 477] and colloidal systems [478].

The cooperative adsorption of immunoglobulins onto AuNPs is studied by DPD-MC hybrid model. All the simulations are performed in a NPT ensemble (constant number of particles N, pressure P and temperature, T) using a dimensionless units system. For our parameterization, $\rho=3$, $m=3$ and $V^w=30\text{\AA}$ and the friction constant (λ) necessary for evaluating the dissipative force is set equal to 4.5. For each system, the length of the simulation is normally 300000 cycles, equivalent to 1350 ns if using 0.03τ as time step. The working temperature use throughout the simulations is $K_b T=0.42$ [479, 480].

All experiments are performed in a cubic box water of $L_x \times L_y \times L_z = 30 \times 30 \times 30 d_0^3$. Simulations contain 80000 beads of water (equivalent to 240000 molecules of water), 3000 beads of gold (equivalent to 9000 gold atoms) that form a unique AuNP and 100 molecules of each biological ligand. All compounds are randomly distributed along the box.

Cell targeting assays

We assessed the binding capabilities of conjugated A32 (anti-HIVgp120) and 3G8 (anti-CD16) antibodies to their targets by flow cytometry. Briefly, for evaluation of A32-monoconjugates we used the CEM.NK^R CCR5⁺ cell line. Cells were coated with 1 µg of the HIV-1 BaL gp120 recombinant protein during 1h at room temperature (RT). After incubation, cells were extensively washed in ice-cold R10 medium and staining buffer (PBS containing 3% FBS). Thereafter, cells were incubated for 20 mins at RT in R10 medium containing naked AuNPs, AuNPs conjugated with A32 or free A32, and stained with an anti-human FITC-labelled secondary antibody (dil 1:100) (Thermo Fisher) for A32 detection (20 mins at RT). To assess the targeting capacity of 3G8 monoconjugates, NK cells were obtained from PBMCs of healthy donors by negative isolation using magnetic beads (MagniSort™ Human NK cell Enrichment Kit, eBioscience). Then, NK cells were incubated in medium containing naked AuNPs, AuNPs conjugated with 3G8 or free 3G8. For detection of 3G8 by flow cytometry, we used an anti-mouse AF647-labelled secondary antibody (dil 1:200) (Invitrogen). R10 media controls were included for both conjugates. Cells were then fixed with paraformaldehyde solution (PFA; Affymetrix) (2%) and acquired in an LSR Fortessa flow cytometer (Becton Dickinson). Results were analyzed with FlowJo v10 software (Tree Star).

Cell-to-cell contact assays

CD4⁺ T cells and NK cells were isolated from cryopreserved PBMCs of healthy donors by commercial kits (MagniSort Human CD4⁺ T Cell Enrichment; Affymetrix, and MagniSort™ Human NK cell Enrichment; eBioscience). CD4⁺ T cells were coated with 1 µg of recombinant gp120 protein during 1h at RT. After extensive washes, CD4⁺ T cells were mixed with NK cells in a 1:1 ratio and stained with anti-CD56 (PE; Becton Dickinson) and anti-CD3 (PE-Cy7; Becton Dickinson) antibodies for detection of NK cells and CD4 T cells, respectively. After washing, we added naked AuNPs or BiAb-AuNPs at two different doses (2.5 µg/ml and 10 µg/ml of total antibody). After 20 mins incubation at RT, cells were washed and fixed with PFA (2%). Samples were then acquired on a LSR Fortessa flow cytometer (Becton Dickinson) and data were analyzed using FlowJo V10 software.

Confocal Microscopy

Attachment of BiAb-AuNPs to their targets and subsequently promotion of dual cell conjugates were assessed by confocal microscopy. First, CEM.NK^R CCR5⁺ cells were stained with 2 µM of the membrane lipid marker PKH67 (Sigma-Aldrich) according to the manufacturer instructions. These cells were also coated with 1 µg of HIV-1 BaL gp120 recombinant protein for 1h at RT. Then, NK cells isolated from PBMCs of healthy donors were obtained as described above. NKs and PKH67-labelled CEM.NK^R CCR5⁺ cells were mixed at 1:1 ratio and incubated for 20 mins at RT with pBiAb-AuNPs (2.5 µg/ml of total antibody burden), then attached to coverslips (by centrifugation at 800*g for 5 mins) previously coated with 0.1 mg/ml of poly-L-lysine (Sigma-Aldrich) and fixed with PFA (4%) for 15 mins at RT. Cells were finally stained with DAPI (1:5,000 dilution) (Thermo Fisher) and mounted with Fluoromount G (eBioscience). Preparations were imaged with an Olympus Spectral Confocal Microscope FV1000. ImageJ software was used for image compositions. A total of 20 images were counted, containing 1,650 cells. Note that AuNPs of 40 nm do not reflect or diffract light because they are below the visible

light resolution limit, but they are good at dispersing light, especially if aggregated. Thus, the light scattering/dispersion can be observed with a confocal microscope [481].

NK cell activation and functional activity assays

The activation and cytotoxicity phenotype of NK cells after stimulation with *p*BiAb-AuNPs was evaluated. Cytotoxicity was assessed by the measurement of CD107a and IFN- γ . Briefly, PBMCs were cultured in R10 medium with 10 μ g/ml *p*BiAb-AuNPs, 10 μ g/ml *Irre*-AuNPs, 5 μ g/ml of A32, 5 μ g/ml of 3G8 or 10 ng/ml PMA plus 1 μ M ionomycin (positive control) for 4.5h in a 96-well plate at 37°C and 5% CO₂. CD107a-PE-Cy5 (H4A3; Beckton Dickinson), BD GolgiPlug Protein Transport Inhibitor (Beckton Dickinson) and BD GolgiStop Protein Transport Inhibitor containing monensin (Beckton Dickinson) were also added to each well at the recommended concentrations. Cells were then washed and stained with a viability dye (LIVE/DEAD Fixable Violet dead cell stain; Thermo Fisher). To measure the activation marker HLA-DR, cells were stained with anti-CD56-FITC (B159; Beckton Dickinson), anti-CD3-PE-Cy7 (SK7; Beckton Dickinson) and anti-HLA-DR-SB600 (LN3; eBioscience) antibodies for 20 mins at RT. Cells were then fixed and permeabilized with Fixation/Permeabilization Solution (Beckton Dickinson) for 20 mins at 4°C, washed with BD Perm/Wash buffer and stained with anti-IFN- γ -AF700 (Life technologies) for 30 mins at 4°C. After washing, cells were fixed with PFA (2%) and acquired on an LSR Fortessa flow cytometer (Becton Dickinson). Data were analyzed using FlowJo V10 software.

Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) assay

The ADCC assay was performed as described by others with some modifications [410]. Briefly, CEM-NK^R.CCR5 cells were used as target cells after being double-stained with PKH67 (Sigma-Aldrich) and eF670 (Labclinics) dyes following manufacturer's instructions. Then, cells were coated with 1 μ g of the HIV-1 BaL gp120 recombinant protein for 1h at RT and extensively washed in ice-cold R10 medium. Target cells were dispensed in U-bottom 96-well plates (5,000 cells/well) and incubated for 15 mins with 5 μ g/ml of free A32, 5 μ g/ml of free 3G8, *Irre*-AuNPs or BiAb-AuNPs (10 μ g/ml antibody burden), and plasma (1:1,000 dilution) from a viremic (high viral load in blood) HIV⁺ patient as a positive control. After incubation, NK effector cells isolated from PBMCs of healthy donors or antiretroviral therapy (ART) suppressed HIV⁺ patients were added at 1:10 target/effector ratio. Plates were centrifuged and incubated for 4h at 37°C and 5% CO₂. Finally, cells were washed, fixed with PFA (2%), acquired on a LSR Fortessa flow cytometer (Becton Dickinson) and analyzed using FlowJo software. Flow cytometry count beads (AccuCount Blank Particles, Cytognos) are used to normalize cell collection to a constant number of particles (1,000 events). Target cells were identified in a PKH67-versus side scatter (SSC) plot. Loss of the eF670 marker was used to determine the percentage of killing in an eF670 versus PKH67 plot. ADCC on virally-reactivated cells was performed as follows; the latently-infected cell line ACH-2 was stimulated to produce HIV by the addition of 10 μ g/ml PHA (Phytohemagglutinin; Fisher Scientific) and 10 nM PMA (phorbolmyristate acetate; Abcam) during 17h at 37°C. Then, cells were subjected to the ADCC assay as described above. ADCC of viral-reactivated cells was calculated as the fraction of cells that disappeared within the target population after the addition of *p*BiAb-AuNPs in comparison to the control condition with targets and NK cells, but lacking the nanoparticles. To assess the absolute number of cells killed by ADCC, we added to

each well flow cytometry particles for absolute cell counting ($5 \times 10^4/\text{ml}$) (AccuCount Blank 5.0-5.9 μm , Cytognos).

Tonsillar tissue processing and infection

Tonsils from healthy children were obtained and processed as previously described [482]. Briefly, the tissue was processed within the first 2h following surgery. We dissected the tissue into uniform blocks of approximately 2 mm x 2 mm x 1 mm, after discarding all cauterized, bloody or necrotic areas. Ten blocks per condition were placed on top of a piece of sponge (Absorbable gelatin Surgispon; AEGIS LIFESCIENCES) suspended in RPMI1640 medium supplemented with 20% FBS (R20) and 100 U/ml penicillin and 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin in a 6-well plate. Then, for viral infection experiments, 5 μl of HIV_{Bal} virus (457 TCID₅₀) were added on top of each tissue block. Some pieces were not infected as a control. After 15 mins incubation, we added 5 μl of *pBiAb-AuNPs* or *Irre-AuNPs* at 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of total antibody burden on each block and placed the plate in the incubator (37 °C 5% CO₂). We performed two different assays with the tonsillar blocks. First, after one day incubation with the nanoparticles, we digested the blocks as previously described [482] and performed the staining with LIVE/DEAD Far Red viability (Thermo Fisher) to identify dead cells for 30 mins at RT. After washing with PBS, we stained the digested cells with the following labeled antibodies: anti-CD45-FITC (HI30; Biolegend), anti-CD3-PerCP (SK7; Becton Dickinson), anti-CD8-APC (RPA-T8; Becton Dickinson) and anti-CD16-PE (3G8; Biolegend), for 20 mins at RT. Then, cells were washed and fixed with PFA (2%). Second, we assessed HIV infection at day 6 of tonsil culture by tissue digestion and staining with LIVE/DEAD Far Red viability, anti-CD45-FITC, anti-CD3-PerCP and anti-CD8-APC as described. After the surface staining, cells were fixed and permeabilized with Fixation/Permeabilization Solution (Beckton Dickinson) for 20 mins at 4°C, washed with BD Perm/Wash buffer and stained with anti-p24-PE (Beckman Coulter) for 20 mins on ice and 20 mins at RT. Finally, cells were washed and fixed with PFA (2%). Samples were acquired in a FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson) and analyzed with FlowJo V10 software.

Generation of latency model, viral reactivation and cytotoxicity assays

PBMCs from healthy donors or HIV-infected patients were thawed. Then, CD4⁺ T cells were isolated using a commercial kit (MagneSort Human CD4⁺ T Cell Enrichment; Affymetrix) and infected with HIV (350,000 TDCI₅₀/million cells) with NL4.3 viral strain for 4h at 37°C 5% CO₂ or by spinoculation at 1200*g and 37°C for 2h. Cells were washed twice with PBS and cultured in R10 with IL-2 (10 U/ml) and IL-7 (1 nM) (Bio-Techne R&D Systems). After 2 days of infection, Raltegravir (1 μM), Darunavir (1 μM) and Nevirapin (1 μM) were added to the cell culture to prevent new rounds of viral infection. Next day, cells were incubated with Q-VD (10 μM) for 2h at 37°C and 5% CO₂, in R10 medium containing IL-2, IL-7, Raltegravir, Darunavir and Nevirapin at the indicated concentrations, and then latent viral infection was reactivated during 22h with Ingenol (100 nM) and subjected to the cytotoxic NK assay. NK cells were added at ratio 1:1 in the presence or absence of *pBiAb-AuNPs* or irrelevant AuNPs (2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ total antibody burden), for 22h at 37°C and 5% CO₂. In some cases, we included as a negative control AuNPs conjugated with the antibody Palivizumab. The cytotoxic assays were performed in round bottom 96 wells plates, at a cellular concentration of 2.5 M cells/ml. Finally, cells were stained with LIVE/DEAD violet viability (Thermo Fisher) for 20 mins at RT. After washing once with staining buffer, cells

were stained with anti-CD3-AF700 (SK7; Biolegend) and anti-CD56-FITC (B159; Becton Dickinson) antibodies for 20 mins at RT. Cells were then fixed and permeabilized with Fixation/Permeabilization Solution (Beckton Dickinson) for 20 mins at 4 °C, washed with BD Perm/Wash buffer and stained with anti-p24-PE (Beckman Coulter) for 20 mins on ice and 20 mins at RT. After washing, cells were fixed with PFA (2%). Samples were acquired on an LSR Fortessa flow cytometer (Becton Dickinson) and data analyzed using FlowJo V10 software.

Cell toxicity of *pBiAb*-AuNPs and *Irre*-AuNPs was measured using the primary cell line CEM-NK^R and ex-vivo infected primary CD4⁺ T cells. Cells were incubated with the different nanoconjugates for 4 and 48 h. Then, cell viability was determined by staining with a LIVE/DEAD viability dye and measured by flow cytometry.

Statistical analysis

Analysis were performed with GraphPad Prism v6 and statistical tests are reported within each figure legend. P values <0.05 were considered statistically significant.

Results

Generation of functionalized bispecific nanoparticles

Our goal was to develop multivalent bispecific NPs after a cooperative adsorption of the antibodies at their surface. For that, we carefully studied the conjugation medium and the conditions to achieve a cooperative adsorption protocol and we validated the approach. First, we generated monoconjugates with the antibodies A32 and 3G8 separately and studied the impact of the conjugation process on the capacity of these antibodies to still recognizing their cognate antigens. In order to assess the affinity of the different antibodies for the AuNP surface, we performed Langmuir-type isothermal adsorption curves to identify the concentration needed to obtain surface-saturated monoconjugates. AuNPs of 42 ± 6 nm (**Figure 1a**) with a surface charge of -44 mV, colloidally stable in a 2.2 mM sodium citrate (SC) at $5 \cdot 10^{10}$ NPs/ml concentration and with an UV-Vis Spectroscopy absorption peak at 532 nm, were exposed to the different antibodies dispersed in a 2.2 mM-4 mM SC-Borate selected conjugating medium at different concentrations. From the adsorption curves, 5 $\mu\text{g/ml}$ and 20 $\mu\text{g/ml}$ were identified as the antibody saturation concentrations needed for A32 and 3G8, respectively (**Figure 1b-c**). The specific cell-surface binding abilities of both monoconjugates were evaluated by flow cytometry. We found that A32-AuNPs retained the same binding capability than the free antibody and recognized the entire population of HIV⁺ cells, indicating that the conjugation process did not alter its targeting capacity (median 98.6% for the conjugate and 99.60% for free A32) (**Supplementary Figure 1a**). Similarly, 3G8-AuNPs were able to recognize the CD16 molecules expressed on NK cells in a similar manner as the non-conjugated free antibody (median 58.60% for the conjugate vs. 51.30% for free 3G8) (**Supplementary Figure 1b**), indicating that antibody adsorption did not result in any decrease in its ability to recognize the cognate antigen.

Next, we generated the polarized bispecific nanoparticles (*p*BiAb-AuNPs) by mixing equal volumes of the AuNPs solution with the mix of antibodies in solution for 48 hours at 4°C carefully controlling the conjugating medium. By mildly destabilizing ~ 40 nm AuNPs in a mix of A32 and 3G8 antibodies, we observed how the system slowly evolved towards a new equilibrium state where NPs got fully coated by the two antibodies (*vide infra*). In a close-up, A32 and 3G8 present differences in their fine structure and physicochemical properties, that enabled its segregation when adsorbed at the NP surface. For instance, A32 has a reported isoelectric point (pI) of 8.8 [483] and a surface charge of ≈ -15 mV, meanwhile the 3G8 antibody has an estimated pI of 8.2 (according to its sequence) and a more negative measured surface charge. The aim was to work under conditions where antibodies and NPs were rather stable and therefore slowly conjugated, allowing them to explore their minimum energy positions which correspond with clustering and crystallization.

The ratio of each antibody in the solution was chosen according to the saturation curves and their different relative affinities for the AuNP surface. In order to obtain an approximate 50:50 proportion of each antibody at the NP surface, a ratio of 100:60 for 3G8 and A32 respectively was finally chosen. After conjugation, polarized bispecific nanoparticles (*p*BiAb-AuNPs) presented a redshift in the UV-VIS spectra of 4 nm (**Figure 1d**), consistent with a full coating of the NP surface with proteins [484]. The surface charge of the *p*BiAb-AuNPs was also

characterized (**Figure 1e**), reporting a lower negative value (-31.4 mV), corresponding to half way between the values of the two homoconjugates (**Supplementary Table 1**) indicating the presence of a 50% mixture of antibodies in the fully coated surface of AuNPs [485]. The DLS (Dynamic Light Scattering) hydrodynamic radius signal also increased upon conjugation (about 10 nm), correlating well with the UV-Vis spectroscopy measurements and attributed to the formation of a dense antibody monolayer on top of the AuNP (**Figure 1f**). No further shifts of the UV-VIS post conjugation were observed after a month (**Figure 1g**), indicating the high stability of the formed conjugates. Note that if antibodies were denaturalized as a consequence of the interaction with the AuNP surface, they would inevitably lead to antibody aggregation and detectable NP cross-linking [486]. Importantly, the characteristic width of the measured peaks after conjugation remained similar to the measurements before conjugation, further confirming the formation of homogeneous antibody coronas [481]. Otherwise, if a dispersion in the conjugation process would occur leading to NPs with different degrees or types of antibody coatings, UV-VIS, DLS and Z-potential peaks would become broader than in the case of non-conjugated NPs, integrating the dispersion of both, the NP core and the NP coating.

Using a theoretical approximation of 150 nm² per antibody on dense antibody coatings [487], we estimated that 32 antibodies were displayed on the surface of our ρ BiAb-AuNPs (**Supplementary Note 1**). Moreover, thermogravimetric analysis (TGA) of the conjugates, considering a density of 1.35 and 19.3 g/ml for an antibody and the Au, respectively, led to similar results. In this case, the evaporation at 450 °C of a 10 nm corona of antibodies in a ~40 nm diameter of solid AuNP accounted for about 10% of the total weight loss (**Supplementary Figure 2**).

Figure 1

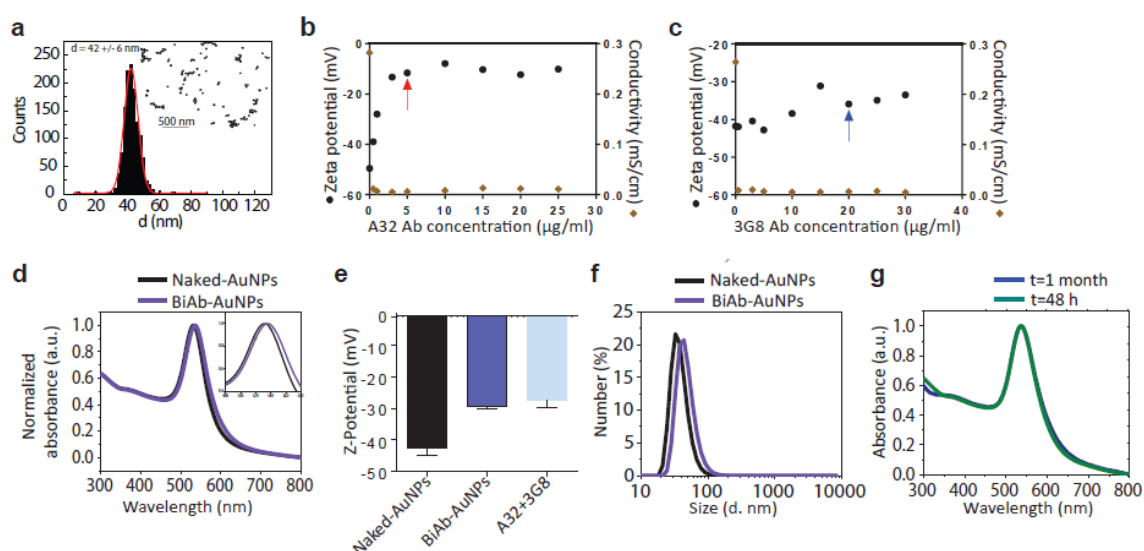


Figure 1. Characterization of the bispecific gold nanoparticles (BiAb-AuNPs). **a**) Representative TEM image of the ~40 nm AuNPs. **b**) A32-AuNPs saturation curve. Zeta potential (mV) versus the antibody concentration is plotted. The red arrow indicates the saturating concentration for the A32 antibody. **c**) 3G8-AuNPs saturation curve. The blue arrow indicates the saturating concentration for the 3G8 antibody.

d) Representative UV-Vis spectra of the BiAb-AuNPs compared to naked AuNPs. **e)** Z-potential measurements of BiAb-AuNPs, naked AuNPs, and the single antibodies A32 and 3G8 (n=3, mean with SD). **f)** Representative *Dynamic light scattering* (DLS) characterization of the BiAb-AuNPs compared to naked nanoparticles. **g)** Representative UV-Vis spectra of the BiAb-AuNPs at 48h and 1 month after antibody conjugation.

Polarization assessment after following the cooperative adsorption conjugation protocol

Molecular mixtures on a NP surface are difficult to characterize [488], especially in their working environment. In the early 1990s, studies suggested that two alkanethiols of different chain length segregate on a gold surface, forming microscopic islands, despite the strong bond between thiols groups and Au [461]. Since then, other mixtures of alkanethiols [464], organic molecules as MUA and PEG [489] and also peptides did show a tendency to segregate onto the NP surface, and this effect was discussed not without controversy [464, 490-492]. This tendency to grow domains was described to occur during the self-assembly process onto the NP surface, and not when the molecules were free in solution [493]. Simulations performed mimicking our experimental conditions showed the tendency of cooperative adsorption of antibodies onto the NP surface when enough time was allowed to the antibodies to organize themselves onto the AuNP surface. Similarly, once few clusters had nucleated onto the NP surface, these grew until the whole surface was densely covered (**Figure 2a-d**).

Describing the organization of molecules at the NP surface is challenging. Despite the literature is full with examples of functionalized nanoparticles generally illustrated with inspiring schemes, the actual distribution and conformation of molecules at the NP surface is still unknown and often remain poorly characterized. We obtained the first evidence for the formation of antibody domains on top of the AuNPs from the antibody loading curves and geometrical considerations. The progressive coating of the antibodies on the NPs can be observed in the UV-VIS, DLS and Z-potential measurements after purification as a function of incubation time. If the adsorbed proteins were distributed purely at random, those NPs with just above the 50% of coverage should be resistant to aggregation during the purification process (that forces NPs together). In a perfect random distribution, after loading more than 50%, the remaining grooves would not be large enough to efficiently fit another protein (carrying an attached NP), nor the two AuNP surfaces could be in contact (**see schema in Supplementary Figure 3**). In our experiments, NPs aggregated during purification up to surface coverages close to the 80%, well away from the theoretical 50% suggesting cooperative growth of the antibody coating (**Supplementary Figure 4a-b**). This time-dependent hardening of the protein corona was also confirmed by the analysis of the evolution of the surface charges. A minimum of 24 hours of antibody exposure was needed for the formation of a stable antibody layer (**Supplementary Figure 4c**). This time point for conjugation (24h) was associated to an 80% of surface coverage (**Supplementary Figure 4d**). Note that in a langmuire-like isothermal adsorption behavior, the observed shift of the characteristic plasmonic peak position between zero and saturation is directly proportional to the degree of coating [489]. We used this information to prepare partially and fully antibody-coated AuNPs, and gain further insight into the growth regimen of the antibody layer under our protocol conditions by visualizing the prepared conjugates through transmission electron microscopy (TEM) and scanning electron microscopy (SEM). We cannot

distinguish by TEM different antibodies on top of the NP, but we can observe if before saturation, the distribution of proteins is random or if the coating grows cooperatively onto the AuNP. In **Figure 2e**, representative TEM and SEM images of partially (at the 60%) and fully antibody coated AuNPs are shown. In the TEM images (**Figure 2e upper panel**) we observe how in case of saturation, AuNPs do not touch each other, while for the unsaturated samples the AuNP-AuNP direct contact is more evident. In the SEM images (**Figure 2e lower panel**), the charging effects of the organic layer on the edge of the NPs can be clearly seen, and it can be observed how the coating is complete in the case of antibody saturated samples while only one side of the partially coated AuNP appears to wear it.

In addition, to directly analyze the distribution of antibodies per NP following our conjugation protocol, we used doubly functionalized AuNPs with anti-HSA and anti-BSA IgGs. We then used 25 nm AuNPs functionalized with BSA and 15 nm AuNPs functionalized with HSA, as labels to directly observe the presence and distribution of the two antibodies at the AuNP surface. This experiment was not performed with the A32 and 3G8 antibodies because their cognate antigens are embedded at the cell surface, and therefore, it will require the use of recombinant gp120 and CD16 to functionalize the label nanoparticles. Moreover, anti-human secondary antibodies could not be used because it does recognize not only the A32 but also the 3G8 antibody, providing a high unspecific background signal and preventing the real discrimination between the A32 and 3G8 domains. After conjugation, the three functionalized AuNPs were incubated together and analyzed using TEM. The cooperative adsorption approach was confirmed by the observation of NPs with a hemispherical distribution of the labels (**Figure 2f-g**). After fully characterization, 50% of the sample presented non- or mono- conjugated NPs (identified by the absence of labels or by only one type of the secondary labels), 26% of the multiconjugated NPs showed some polarity, while 24% of them seemed to present stochastic orientation of the antibodies. All in all showing the tendency of proteins to grow forming domains in these conditions. A gallery of TEM images representing different structures indicating the cooperative adsorption of the antibodies is shown in **Supplementary Information 1**.

Figure 2

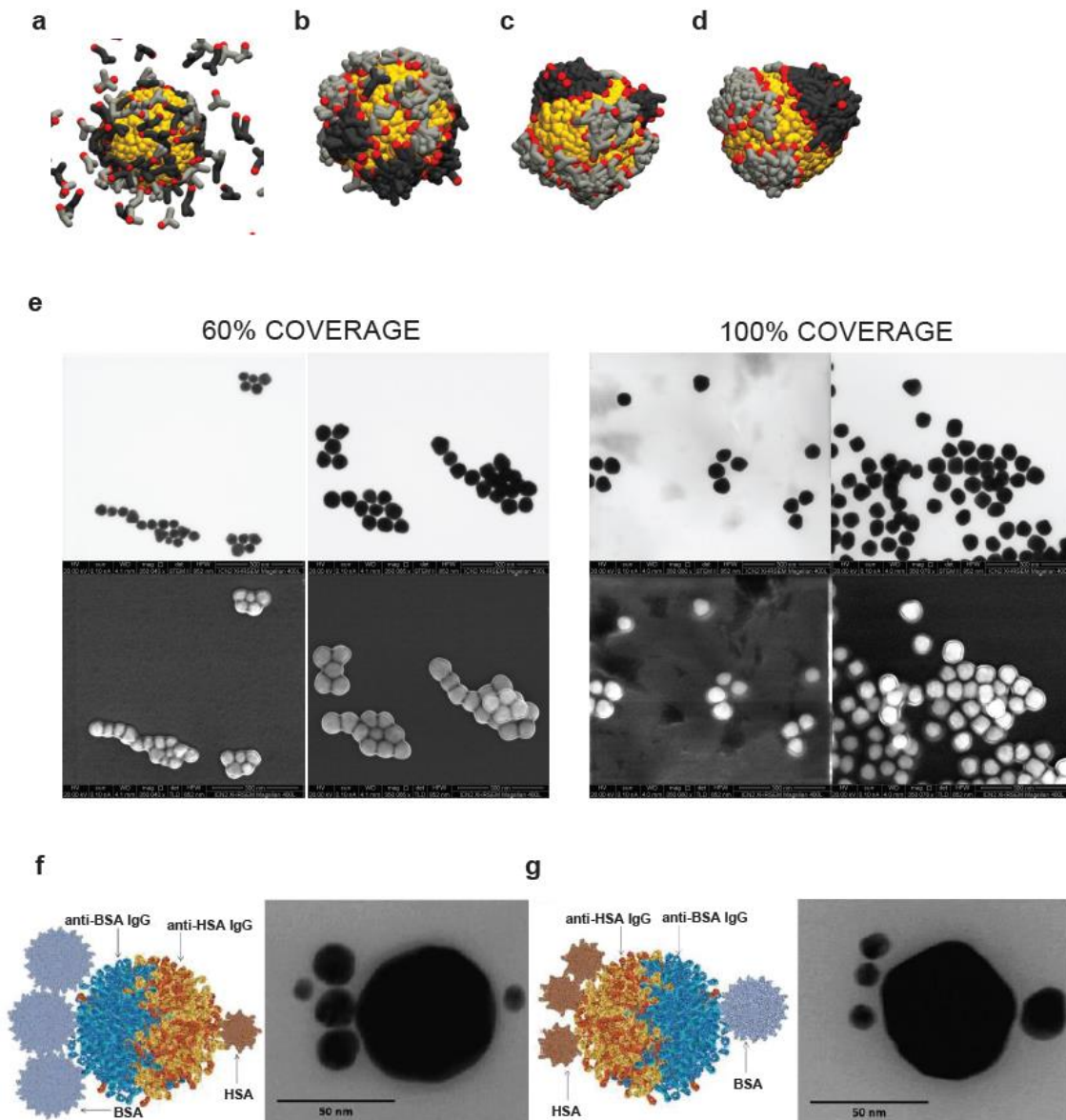


Figure 2. Simulations and Transmission electron microscopy (TEM) and scanning electron microscopy (SEM) analysis of conjugates following the cooperative adsorption protocol. Four snapshots of the resultant simulations are shown (a-b-c-d). From the left to the right, the water-antibodies bead interacting parameters are increased from 24 to 50. **a)** The adsorption of these proteins starts to be observed but without any preferences. **b), c)** and **d)** All the antibodies are adsorbed onto AuNP for minimizing their interaction with water. Note that, the higher is the repulsion with water, the closer will be the antibodies. Polarized AuNPs are observed when water-antibodies repulsion is bigger than its own interaction. **e)** In the upper panel TEM images of partially-coated (60% surface cover) and fully-coated Au conjugates can be seen. In the lower panel SEM images are shown. **f)** AuNPs functionalized following cooperative adsorption with anti-BSA IgG and anti-HSA IgG, and exposed to smaller conjugates as labels (AuNPs of 25 nm functionalized with BSA and of 15 nm with HSA), are shown. It can be observed a hemispherical distribution of the labels, with three BSA-AuNPs distributed in one side of the bispecific AuNP and one HSA-AuNP in the opposite side. **g)** The same can be observed in this panel but with an inverted proportion of the labels, further confirming polarity.

BiAb-AuNPs promote specific cell-to-cell contact between CD4-expressing HIV and NK cells.

Once the *p*BiAb-AuNPs presenting A32 and 3G8 antibodies were characterized, we investigated their potential to bring closer cytotoxic NK cells (characterized by dim expression of the marker CD56 and high levels of the CD16 molecule) and primary CD4⁺ T cells coated with the viral protein gp120. We performed cell-to-cell contact experiments by culturing both cell types in the presence of different bioconjugates. As control, irrelevant bispecific AuNPs (*Irre*-AuNPs) coated with polyclonal IgG mouse and polyclonal IgG rat antibodies, were similarly prepared. In addition, we prepared 10:100 and 40:100 A32:3G8 ratio conjugates. The conjugation ratio 100:10 A32:3G8 was also prepared but it rapidly led to the irreversible aggregation of the AuNPs precluding its further use. Besides, we also compared our *p*BiAb-AuNPs generated using the cooperative approach, with an already well described conjugation protocol expected to yield randomly antibody-coated NPs (*r*BiAb-AuNPs) [472]. Results for the employed conjugates are shown in **Supplementary Table 1**. No direct toxicity in ex-vivo HIV-infected CD4⁺ T cells was associated with the presence of any *p*BiAb-AuNPs or *Irre*-AuNPs in culture after 4 hours incubation (mean percentage 95.83±6.56 and 90.10±7.78 for *p*BiAb-AuNPs and *Irre*-AuNPs, respectively). Longer incubation times (48h) did not significantly affect cell viability either (91.2 and 86.67% cell viability, for *p*BiAb-AuNPs and *Irre*-AuNPs, respectively). We observed that 60 and 100% of the saturating concentration for each antibody (A32 and 3G8, respectively) produced the highest number of NK-HIV⁺ CD4⁺ T doublets, with a 2.5-fold increase compared with controls (median % doublets of 5.66 compared to 2.23, 3.30 and 4.65% for control medium, 10:100 and 40:100 ratios, respectively) (**Figure 3a-b**). Thus, 60 and 100% of the saturating concentration for A32 and 3G8 were selected as the optimized concentrations for the generation of the *p*BiAb-AuNPs. Importantly, a dose-dependent response was observed, and the addition of the *p*BiAb-AuNPs coated with 10 µg/ml of antibodies significantly increased the mean of cell doublets by over 7-fold ($p=0.01$) (**Figure 3a-b**). Of note, the *r*BiAb-AuNPs with a random (non-polarized) disposition of the A32 and 3G8 antibodies at their surface, were not efficient at performing cell-to-cell engagement (**Figure 3b**). These results position our *p*BiAb-AuNPs as better candidates to achieve such biological effects. In addition, we performed a different analysis and assessed the composition of the cell doublets in the absence and presence of *p*BiAb-AuNPs and *r*BiAb-AuNPs. First, we observed that our *p*BiAb-AuNPs were better nanoconjugates at inducing the formation of cell-doublets (**Figure 3c** upper panel), and within these cell doublets, we observed an increase in the specific CD4-NK doublets and formed less homodoublets CD4-CD4 compared to the medium control (**Figure 3c** lower panel and **3d**), further supporting their polarized nature. Besides, *r*BiAb-AuNPs generated significantly less cell doublets, with increased percentages of NK-NK doublets (**Figure 3d**). Note that in the absence of AuNP polarization, one would expect also an increase of homodoublets (NK-NK or CD4-CD4) due to the random distribution of both antibodies on the surface of the NPs. This is consistent with results observed for *r*BiAb-AuNPs which increased NK-NK doublets (**Figure 3d**). After the precise quantification by flow cytometry, we imaged the preparation by confocal microscopy, since the very low dielectric constant of AuNPs scatters light very efficiently [494] and therefore the ~40 nm AuNPs can be observed in the confocal microscope, especially if they form any kind of aggregates. Direct contact of NK and HIV⁺ cells zipped by the *p*BiAb-AuNPs, which appear in red, can be observed (**Figure 3e**).

Figure 3

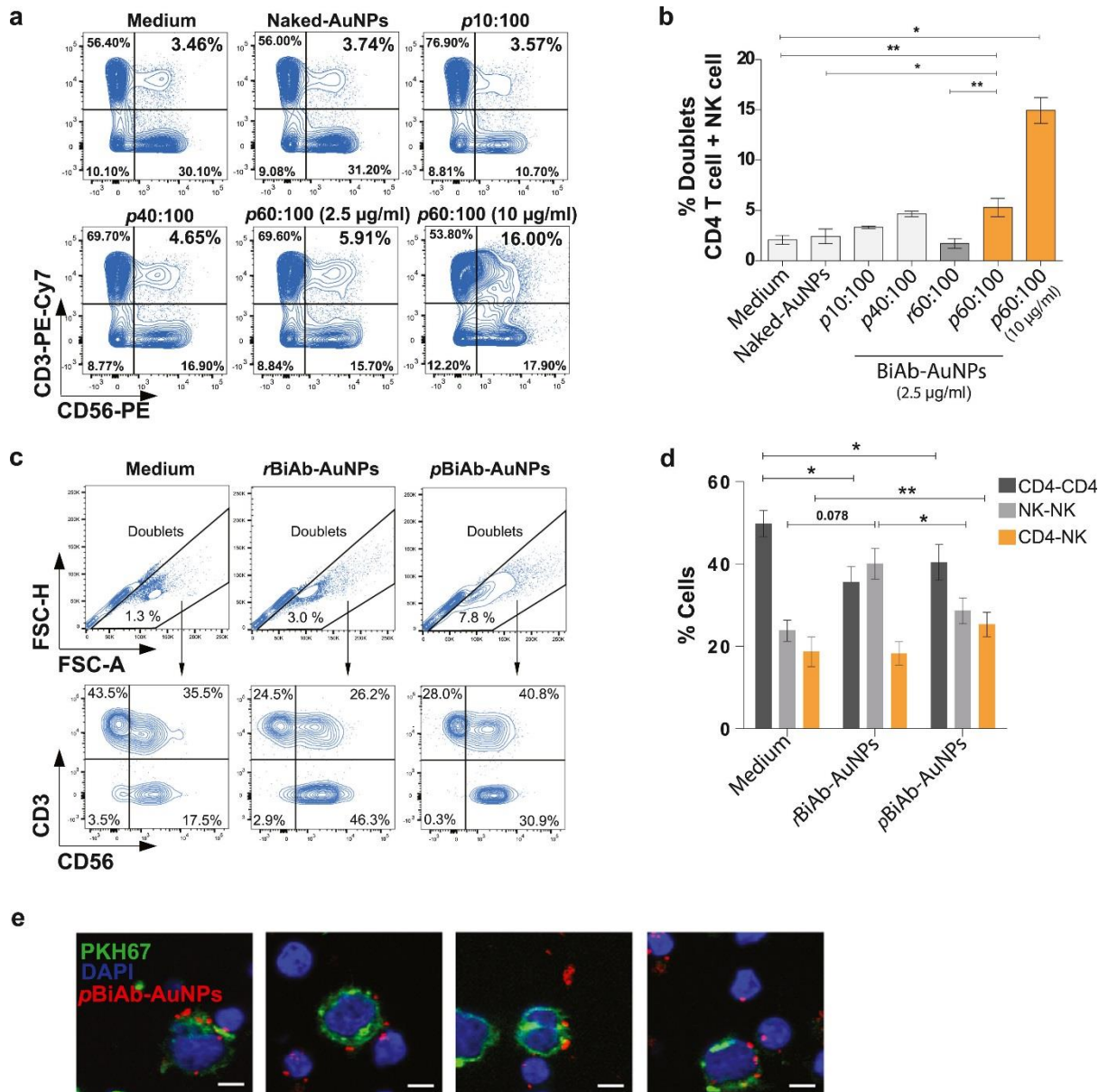


Figure 3. The pBiAb-AuNPs induce cell-to-cell contact between HIV-expressing cells and NK cells. a) Representative flow cytometry plots showing cell doublets corresponding to primary CD4⁺ T cells coated with gp120 (CD3⁺) and primary NK cells (CD56⁺) after 20 minutes co-culture in the presence of the different nanoconjugates. Double positive cells for the markers CD3 and CD56 denote pairs of cells formed by CD4-HIV⁺ and NK cells. Controls corresponding to medium alone and non-conjugated (naked) nanoparticles are shown. Different ratios for the generation of BiAb-AuNPs and different total antibody concentrations on the nanoparticles (2.5 µg/ml for all conjugates and an additional dose of 10 µg/ml for 60:100 ratio) are shown. **b)** Summary graph for the induction of cell-to-cell contacts in the presence of different nanoconjugates. Mean with SEM for the experimental replicates are shown. Statistical analysis consisted on a paired t test. *p<0.05. **c)** Representative example of the gating strategy to identify cell doublets using the FSC-H and FSH-A signals, and the subsequent analysis of the frequency of different types of cell pairs using the cell markers CD3 and CD56. **d)** Distribution of the cell doublets. Cell doublets were identified by flow cytometry using the FSH-H and FSH-A plot. The total cell doublets were distributed in T-T cells (CD3⁺CD3⁺), NK-NK (CD56⁺CD56⁺) or T-NK (CD3⁺CD56⁺) doublets and the percentages are plotted. Data shows mean with SEM of n=6 independent experiments. Statistical comparisons were performed using Wilcoxon matched-pairs signed rank test. **e)** Representative confocal micrographs of HIV-

expressing cells (CEM.NK^R CCR5⁺ coated with HIV gp120 recombinant protein and stained with PKH67 in green, and DAPI nuclei staining in blue) and primary NK cells (DAPI nuclei staining). Both cell types were co-cultured at 1:1 ratio for 20 minutes in the presence of the *p*BiAb-AuNPs. *p*BiAb-AuNPs are visualized in red. Scale bar represents 5 μ m.

***p*BiAb-AuNPs induce a potent cytotoxic response against primary CD4⁺ T cells from HIV-infected patients and against ex vivo human infected tonsillar explants**

Next, in order to evaluate the ADCC-like activity of NK cells towards HIV-expressing cells in the presence of the *p*BiAb-AuNPs, we performed the corresponding functional assays. CEM NK^R CCR5 cells coated with gp120 were co-cultured with NK cells during 4 hours in the presence of different nanoconjugates. Cells non-coated with gp120 were included as a control. Cell killing was measured by the loss of the marker eFluor670 by flow cytometry. A representative example and gating strategy are shown in **Figure 4a** and **Supplementary Figure 5**, respectively. As a positive control we used plasma from a viremic HIV⁺ patient containing a pool of antibodies targeting the gp120 viral protein. Values were normalized to this positive control which is considered the maximum ADCC response that could be achieved for the individual samples. First, we tested NK cells from healthy donors and we observed that *p*BiAb-AuNPs were able to promote a highly potent and specific ADCC-like response (**Figure 4b**). The effect of the *p*BiAb-AuNPs was significantly better than the cytotoxicity reached by the addition of *Irre*AuNPs or the free A32 antibody, which is described in the literature as one of the most potent non-neutralizing antibodies [495]. Value for the *p*BiAb-AuNPs was close to 100 % of the maximum NK immune effector response (median 97.04% vs. 44.09, 37.37 and 18.63% for A32, *Irre*-AuNPs and the combination of A32 and 3G8 unconjugated antibodies, respectively) (**Figure 4b**). Note that the addition of both 3G8 and A32 antibodies to the culture decreased the ADCC levels compared to A32 alone. 3G8 is commonly used to block Fc receptors (through the interaction with the variable fraction) at concentrations near 5 μ g/ml, thus when presented in a non-conjugated form it may block part of the ADCC response promoted by A32. Next, we assessed the capacity of the *p*BiAb-AuNPs to restore the functional activity of NK cells from HIV⁺ patients, since it is well known that HIV infection impairs their effector immune responses [451]. These patients presented a median CD4⁺ T cell count in blood of 590 cells/ μ l and a median time under suppressive antiretroviral treatment of 69 months (plasma viral load <50 copies/ml). Using the A32 antibody we observed, as expected, that NK cells from HIV-infected patients had a diminished capacity to kill by ADCC in comparison to healthy donors (**Figure 4c**). Importantly, after the addition of the polarized *p*BiAb-AuNPs, the functionality of NK cells was significantly restored (**Figure 4d**). Of note, polarization of the antibodies at the AuNPs surface was a requisite for the enhancement of the NK cell immune response, since we found that non-polarized *r*BiAb-AuNPs could not strongly potentiate the NK cytotoxic response (**Figure 4d**).

As the triggering through the CD16 receptor can be a potent activating signal, we addressed the possibility of direct NK activation by our *p*BiAb-AuNPs. Human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were cultured with the *p*BiAb-AuNPs for 4.5h and the different activation and cytotoxicity markers were measured by flow cytometry. We observed that after incubation with the *p*BiAb-AuNPs, primary NK cells (CD3⁻ CD56⁺) produced IFN- γ (**Supplementary Figure 6a**). Accordingly, 3G8 free antibody and *Irre*AuNPs also increased IFN- γ production in NK

cells, showing that in general, targeting Fc receptors could also stimulate NK cells to produce IFN- γ , as previously reported [496]. By contrast, the *p*BiAb-AuNPs not always induced the expression of CD107a (a degranulation marker) (**Supplementary Figure 6b**), nor significantly affected cell activation, measured by the expression of HLA-DR (**Supplementary Figure 6c**).

We also used a human tissue histoculture model [497] to assess the penetrability of the *p*BiAb-AuNPs in blocks of lymphoid tissue and the NK immune effector function during ex-vivo HIV infection (**Supplementary Figure 7**). Note that the only valuable animal model to study the NK biology in tissues during HIV disease are exclusively non-human primates. Tissue blocks were infected with HIV, and after 15 minutes *p*BiAb-AuNPs were added to the culture. After 24h incubation, we checked the penetrability of the *p*BiAb-AuNPs by detection of the CD16 marker in NK cells. 6 days later, the infection was measured by intracellular staining of the HIV p24 viral protein. We observed that *p*BiAb-AuNPs were able to penetrate these cultured tonsil blocks, as demonstrated by the specific loss in the detection of the CD16 marker by flow cytometry in the presence of the *p*BiAb-AuNPs (**Figures 4e-f**). This reduction of CD16 expression is attributed to the blockage of CD16 by the 3G8 antibody present in the *p*BiAb-AuNPs after tissue penetration. In addition, the *p*BiAb-AuNPs significantly decreased HIV infection in this lymphoid tissue, reaching up to 50% reduction in some cases (**Figures 4g-h**). This is noteworthy, since the majority of the persistent HIV infection in antiretroviral treated individuals reside in secondary lymphoid tissue such as lymph nodes and the gut-associated lymphoid tissue (GALT), being the main barrier to reach a cure [498]. Interestingly, NPs are being extensively studied as drug carriers and targeting vehicles for their ability to target some of these tissue compartments [499].

Figure 4

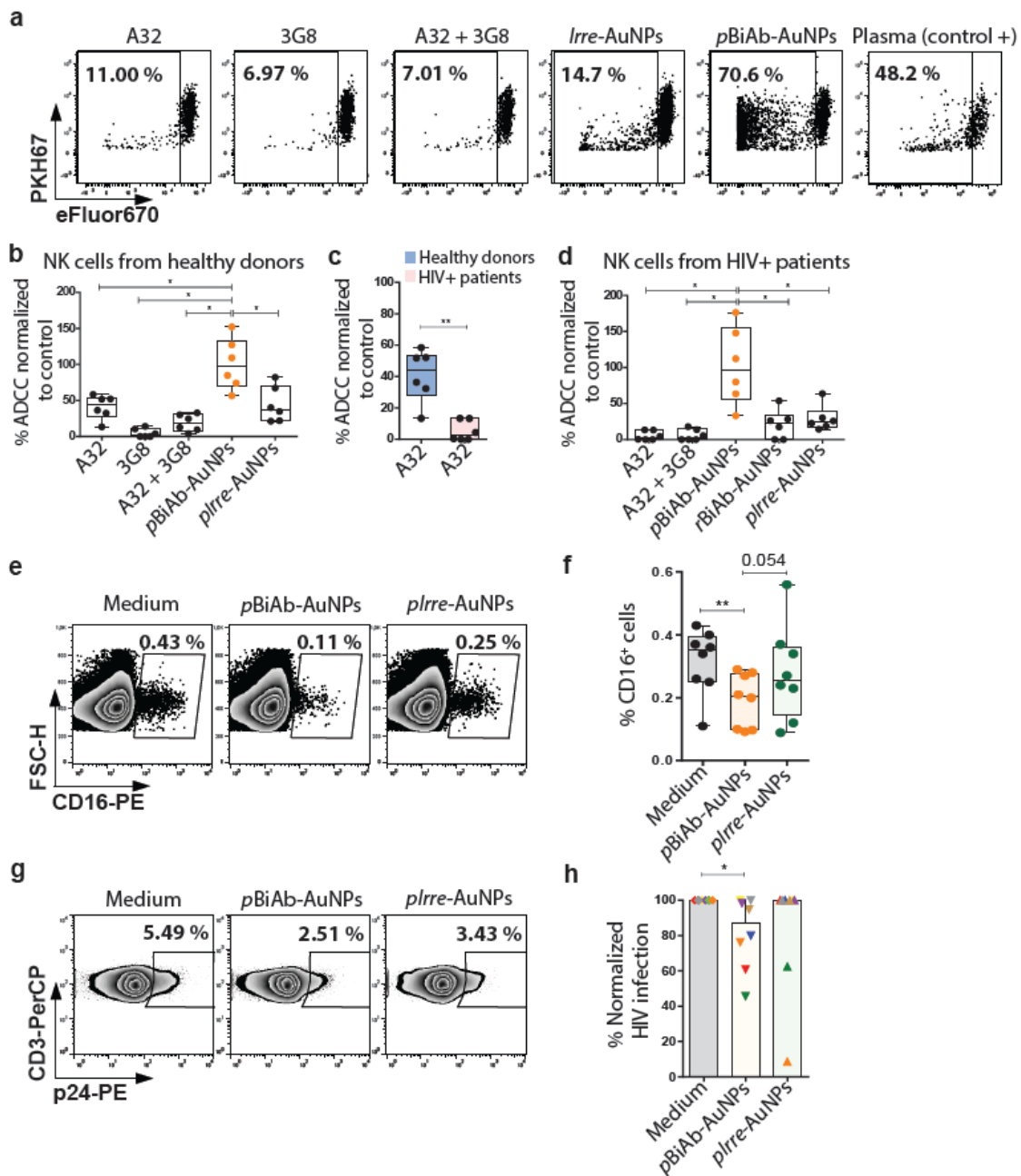


Figure 4. NK-mediated cytotoxic response against HIV-expressing cells promoted by the pBiAb-AuNPs. **a)** Representative flow cytometry plots for NK-mediated cytotoxicity assays. CEM-NK^R.CCR5⁺ cells were double-stained with PKH67 and eF670, and coated with the HIV_{Bal} gp120 recombinant protein. Cells were co-cultured with primary NK for 4h at 1:10 target/effector ratio and in the presence of different nanoconjugates at the following antibody doses: 10 µg/ml for *plrre*-AuNPs, 10 µg/ml for *pBiAb*-AuNPs and 5 µg/ml for each free antibody. Loss of the eF670 marker was used to determine the percentage of dead cells in an eF670 versus PKH67 plot. **b)** Summary graph (n=6) of the ADCC activity mediated by NK cells from healthy donors in the presence of different nanoconjugates at the following antibody doses: 10 µg/ml for irrelevant AuNPs, 10 µg/ml for *pBiAb*-AuNPs and 5 µg/ml for each free antibody. Represented data is normalized to the positive control condition (plasma from a viremic HIV⁺ patient). Statistical comparisons were performed using Wilcoxon matched-pairs signed rank test. Median with range (min-max) are shown. *p<0.05. **c)** Graph comparing the ADCC NK-mediated response between healthy donors and treated HIV-infected patients in the presence of the anti-gp120 antibody A32. Statistical comparisons

were performed using Mann-Whitney test. Median with range (min-max) are shown. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. **d)** Summary graph ($n=6$) of the ADCC activity mediated by NK cells from treated HIV-infected patients in the presence of different nanoconjugates at the following antibody doses: 10 $\mu\text{g/ml}$ for irrelevant AuNPs, 10 $\mu\text{g/ml}$ for *p*BiAb-AuNPs and non-polarized *r*BiAb-AuNPs, and 5 $\mu\text{g/ml}$ for each free antibody. Represented data is normalized to the positive control condition (plasma from a viremic HIV⁺ patient). Statistical comparisons were performed using Wilcoxon matched-pairs signed rank test. Median with range (min-max) are shown. * $p < 0.05$. **e)** Representative flow cytometry plots showing CD16-expressing cells in digested cells after 24h of tonsil histoculture in the presence of the *p*BiAb-AuNPs or *Irre*-AuNPs (5 $\mu\text{g/ml}$ of antibody burden dose). **f)** Summary graph showing CD16-expressing cells after different tissue culture conditions (basal condition, 24 hours incubation with 5 μl of *p*BiAb-AuNPs at 5 $\mu\text{g/ml}$ dose or 5 μl of *Irre*-AuNPs at 5 $\mu\text{g/ml}$ dose per block) in $n=8$ histocultures. Median and ranges (min-max) are shown. Statistical comparisons were performed using Wilcoxon matched-pairs one tailed signed rank test. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. **g)** Representative flow cytometry plots showing reduction in HIV infection (by detection of the viral protein p24) after 6 days of infection of the tonsil histocultures, in the presence of the *p*BiAb-AuNPs or *Irre*-AuNPs (5 μl of the 5 $\mu\text{g/ml}$ dose per tonsil block). **h)** Graph summarizing the results of the HIV inhibition assays (measured at day 6 of HIV infection by detecting the p24 antigen expression by flow cytometry) in tonsil histocultures in the presence of the *p*BiAb-AuNPs or *Irre*-AuNPs (5 μl of the 5 $\mu\text{g/ml}$ dose per tonsil block) ($n=8$). Median with ranges are represented. Statistical comparisons were performed using Wilcoxon matched-pairs signed rank test. * $p < 0.05$.

***p*BiAb-AuNPs strongly enhance the NK-mediated killing of latent HIV-infected cells after viral reactivation**

Reducing or eliminating the persistent reservoir is the main challenge in HIV research field. Recently, therapeutic strategies named “shock and kill” are being designed and tested to clear the HIV reservoir. This approach tries to induce the expression of dormant HIV viruses with latency reversal agents (LRAs), relying on achieving also a potent immune response able to eliminate the HIV-infected cells. For assessing the suitability of the *p*BiAb-AuNPs to be used in the context of a shock and kill strategy, we tested their capacity to induce a cytotoxic response on viral reactivated HIV-infected cells with LRAs, first on the latently infected cell line ACH-2 and then on a primary cell model of HIV latency. When *p*BiAb-AuNPs were added to ACH-2 cells and subjected to viral reactivation, we consistently observed a highly potent response against HIV⁺ cells, inducing a median of 80% of cell death in 4 hours (**Figure 5a**). This potent response was also reproduced with NK cells when *p*BiAb-AuNPs were added to the primary cell model of HIV latency after viral reactivation; in the absence of nanoparticles, NK cells were able to reduce the pool of reactivated cells by a median of 23.08% (**Figure 5b**). However, this killing was highly enhanced when cells were cultured in the presence of the *p*BiAb-AuNPs, further reducing the pool of viral reactivated CD4⁺ T cells by a median of 58.0% (in comparison to median of 23.2% achieved by the control *Irre*-AuNPs) (**Figure 5c**). Therefore, the properties of our *p*BiAb-AuNPs make them also highly valuable in the context of emerging *shock and kill* clinical strategies.

Figure 5

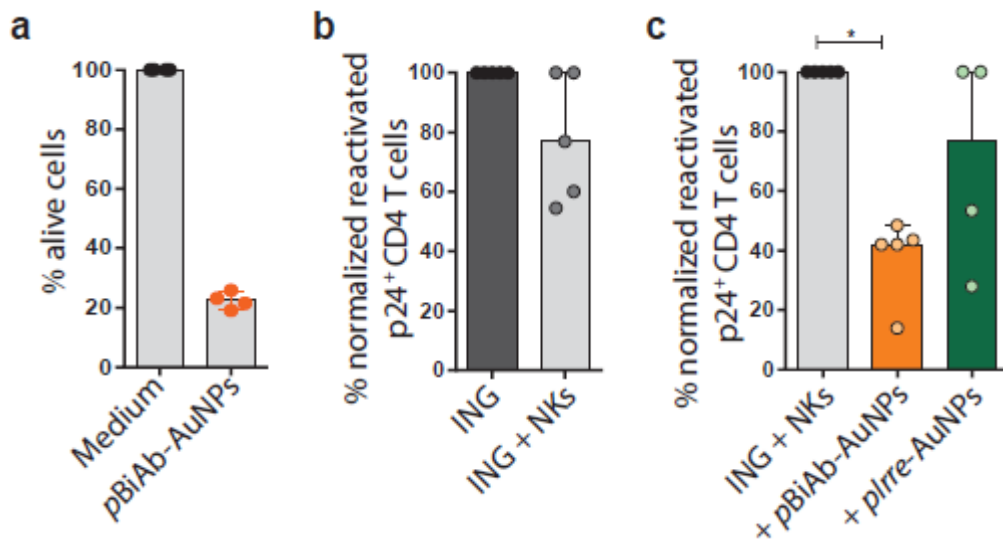


Figure 5. The pBiAb-AuNPs enhance the killing of the latently HIV-infected cells after viral reactivation.

a) Cytotoxic response against latently-infected ACH-2 cells after viral reactivation. PHA and PMA-reactivated ACH-2 cells were cultured with primary NK cells at ratio 1:10 target/effector for 4h in the presence or absence of the pBiAb-AuNPs at 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Cytotoxicity was calculated as the disappearance of ACH-2 target cells using flow cytometry count beads. Data is normalized to the control condition in absence of the pBiAb-AuNPs. Mean with SD of 4 independent experiments is shown. **b)** Graph representing the cytotoxic response mediated by NK cells in a primary cell model of HIV latency and after viral reactivation with Ingenol (ING) (100 nM) (ratio reactivated cells:NK cells 1:1) in the absence of pBiAb-AuNPs. Median with range of n=5 experiments is represented. **c)** Summary graph of the enhancement of the NK-mediated cytotoxic response against viral reactivated CD4⁺ T cells induced by the presence of the pBiAb-AuNPs or Irre-AuNPs (2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ total antibody burden) (n=5). Median with range is represented. Statistical comparisons were performed using the one sample t test. *p<0.05.

Discussion

The development of novel therapeutic strategies to target persistent HIV in patients treated with antiretroviral therapy represents a current priority in the search for an HIV cure [500, 501]. Here, with the aim to generate a potent immune-based approach to specifically target and deplete productively HIV-infected and reactivated latently-infected cells, we have constructed novel targeted and polarized bispecific nanoparticles. For that, we have optimized and developed a linker-free method for promoting cooperative antibody conjugation, generating AuNPs with 2 specificities; on the one hand the A32 antibody recognizes the HIV protein gp120 displayed in the cell membrane of productively or viral-reactivated HIV-infected cells, and on the other hand, the anti-CD16 monoclonal antibody (3G8) recognizes the molecule CD16 mainly expressed on the cytotoxic subset of NK cells (CD56^{dim} NK cells). Using this novel conjugation strategy, antibodies were attached to the AuNPs surface forming ordered domains and fully retaining their antigen specificity. Thus, *p*BiAb-AuNPs were able to significantly enhance the generation of desired cell doublets, and activate NK cells which induced a potent cytotoxic response against both, cultured HIV-expressing cells and infected lymphoid tissue cells. Importantly, and supporting its application in “shock-and-kill” approaches, the *p*BiAb-AuNPs efficiently reduced the pool of latent HIV-infected cells after pharmacological reactivation.

The results presented here support not only the beneficial effects of the *p*BiAb-AuNPs bispecific platform to eliminate HIV-infected cells, but also the importance of developing polarizing antibody conjugation methods to construct bispecific nanotools in order to achieve better biological results. Herein, we carefully studied the conjugation medium and the process to obtain bispecific hard protein coronas, driven by a cooperative adsorption of the mix of antibodies, leading to their organization in domains at the AuNP surface. In the case of non-conjugated non-neutralizing anti-HIV antibodies, such as free A32, indirectly recruit NK cells through their Fc portion and promote ADCC activity. The potency of the ADCC immune response depends on many factors, such as the valence of the antibody-epitope binding, the antibody orientation on the bounded antigen and the resulting size of the immune complex [502-504]. Interestingly, *p*BiAb-AuNPs multivalency (they held about 32 antibodies at their surface) favored all these conditions to take place and triggered a potent anti-HIV NK-mediated cytotoxic response, which was also facilitated by their specific cell engaging capacity.

NK cells express a broad variety of inhibitory and activating cell receptors, and only a specific balance between the expressions of these receptors triggers a cytotoxic immune response [402]. However, CD16, the cognate antigen of 3G8 antibody, has been reported as the only receptor able to activate cytotoxicity and cytokine secretion without the need of additional signals [505]. We proved that direct CD16 engagement by *p*BiAb-AuNPs helped to achieve a potent anti-HIV cytotoxic response mediated by the stimulation of NK cells and the enhanced contact with cell targets. Free 3G8 antibody and *Irre*AuNPs slightly increased the percentage of NK cells producing IFN- γ , showing that in general, targeting Fc receptors could stimulate NK cells to produce this cytokine, as previously reported [496]. These irrelevant nanoparticles (*Irre*AuNPs), used as an unspecific control, are composed of polyclonal IgG mouse and polyclonal IgG rat antibodies, which can bind Fc receptors expressed on NK cells, such as CD16, and provide unspecific cell activation. Of note, it is uncertain the exact orientation of the antibodies on top of the AuNPs. The cell targeting results indicate that the variable chain of the antibodies remains available for

antigen recognition. However, it is also possible that the Fc portion stills accesible and might stimulate NK cells through Fc receptors. Both scenarios are likely possible if antibodies are adsorbed laterally on AuNPs. This would explain the results obtained in the cytotoxic assays, both against cultured gp120-coated cells and HIV-infected tonsillar tissue cells, in which control *Irre*-AuNPs showed certain effect. In the mentioned cytotoxicity assays, *pBiAb*-AuNPs efficiently eliminated gp120-coated cells, providing better response than *Irre*-AuNPs and the A32 free antibody, a non-neutralizing antibody highly potent at performing ADCC [495]. Besides, the combination of unconjugated A32 and 3G8 resulted in a weak cytotoxic response, further supporting that their combination and confinement in a polarized and multivalent AuNP platform is essential to mediate potent anti-HIV effect.

Furthermore, *pBiAb*-AuNPs were able to rescue NK cells from HIV-infected patients, triggering a cytotoxic response similar to the one provided by the positive control. This is noteworthy, since HIV persistent infection leads to the appearance of dysfunctional NK cells with diminished capacity to kill cell targets [451], and this NK cell exhaustion persists despite the antiretroviral treatment [264, 506, 507]. Thus, all these properties place *pBiAb*-AuNPs as an attractive molecularly-targeted nanotool to redirect and potentiate the NK cell response to combat persistent HIV infection. Other nano-based approaches trying to boost anti-viral immunity have been previously developed [508, 509].

To our knowledge, the *pBiAb*-AuNPs are the first nanotool described engaging NK cells with HIV-infected cells. Bispecific AuNPs have been previously developed to target malignant B cells [510]. However, such dual-affinity AuNPs were generated attaching both antibodies via a linker in a randomly-distributed manner, which consequently also attached cells of a similar type. In a similar manner, several bispecific antibody derivatives targeting NK cells through CD16 have been explored for cancer therapy [511, 512], showing CD16 engagement as a powerful way for tilting the balance in favor of NK activation.

Importantly, the *pBiAb*-AuNPs were able to penetrate and greatly reduce the HIV infection in tonsillar lymphoid human tissue. This is of relevance since the majority of the persistent HIV infection in antiretroviral treated individuals, which hinders the eradication of the HIV [396], reside in secondary lymphoid tissue such as the lymph nodes and the GALT [498]. The histocultures assays performed here are highly valuable as evidence for in vivo performance, since the only animal models that fully recapitulate NK cell function are non-human primates [513].

Finally, we tested the potential of the *pBiAb*-AuNPs to promote a NK-mediated clearance of the HIV-latently infected cells after viral reactivation, mimicking “shock and kill” assays. Latently HIV-infected cells are supposed to be efficiently killed by the immune system after the pharmacologically reactivation of dormant viruses. However, reactivation of viral expression alone has appeared not sufficient to eradicate cell reservoirs [271, 514, 515]. Thus, the appropriate potentiation of the immune system is essential to fully eliminate the latent reservoir. NK cells could help to completely clear viral-reactivated cells [343, 344, 353]. The A32 antibody is a good candidate for targeting latently infected cells in the setting of viral reactivation for several reasons; it broadly reacts against *envelopes* from all HIV-1 clades [516], A32-like epitope residues are highly conserved [517], there is no evidence of epitope escape

mutations [518], and it targets the earliest known epitope expressed post-infection [495]. Importantly, *p*BiAb-AuNPs extensively reduced the pool of reactivated latently infected cells by triggering a potent NK immune response. This is very relevant since viral-reactivated cells have been reported to be partially resistant to the well-studied CD8 cell-mediated immune responses, and therefore novel strategies are urgently needed [258].

SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary Table 1

Sample	Hydrodynamic diameter (nm)	Zeta potential (mV)
Naked-AuNPs	33.90 ± 2.45	-44.00 ± 1.94
A32-AuNPs	42.51 ± 5.21	-24.40 ± 3.76
3G8-AuNPs	39.82 ± 2.11	-35.90 ± 4.60
pBiAb-AuNPs	50.71 ± 3.88	-31.40 ± 1.96
plrre-AuNPs	64.57 ± 3.49	-22.00 ± 0.07
rBiAb-AuNPs	50.14 ± 4.60	-25.60 ± 0.68

Supplementary Table 1. Physical-chemical characterization of different nanoconjugates. Data shows mean ± standard deviation of n=3 independent experiments.

Supplementary Note 1

The theoretical calculation of the number of antibody molecules bond to the spherical AuNP has been done assuming that the functionalized AuNP can be approximated by a perfect sphere, and that the factor of occupation of antibodies on top of the AuNPs can be considered 0.8. Regarding this, AuNPs of approximately 40 nm were used at concentration $5 \cdot 10^{10}$ NPs/ml. Therefore, by applying equation number 1, the obtained total available surface for functionalization was $5026.55 \text{ nm}^2/\text{NP}$, which multiplied by the total number of nanoparticles gave $2.51 \cdot 10^{14} \text{ nm}^2$.

$$A (\text{sphere}) = 4 \times \pi \times R_{AuNP}^2 \quad (1)$$

On the other hand, considering one antibody having a diameter of 14 nm, the fingerprint was calculated using equation 2, obtaining $153.94 \text{ nm}^2/\text{antibody}$.

$$A (\text{circle}) = \pi \times R_{Ab}^2 \quad (2)$$

Therefore, by dividing the total available AuNPs surface by the space occupied by one antibody, a space for $1.63 \cdot 10^{12}$ antibodies was found. As the number of nanoparticles was known, it was calculated that each nanoparticle could theoretically be coated by 32 antibodies.

However, different factors such as steric hindrance, efficiency at packing and certain degree of functionality loss can have an impact on the conjugation, being loaded a lower number of antibodies. According to these criteria and supporting results from TGA experiment (**Supplementary Figure 2**) the different doses were selected to be employed in the assays.

Supplementary note 1. Theoretical calculation of maximum load of antibodies onto the surface of 40 nm diameter nanoparticles.

Supplementary Information 1: Microscopy analysis of multimeric AuNP constructs

In this work, we have promoted the cooperative adsorption of two different antibodies onto a finite AuNP surface to construct bispecific nanoparticles with antibodies of the same class highly ordered in domains. Before the bifunctionalization, we promoted the formation of homogeneous antibody-antigen coating. For that, both 60 nm AuNPs were functionalized with anti-HSA IgG, and 25 nm AuNPs were functionalized with HSA, and then incubated together. Similarly, 60 nm AuNPs functionalized with anti-BSA IgG were incubated with 25 nm AuNPs functionalized with BSA. Both systems (with all of the conjugates showing surface saturation) were observed by TEM microscopy (**Figure 1**).

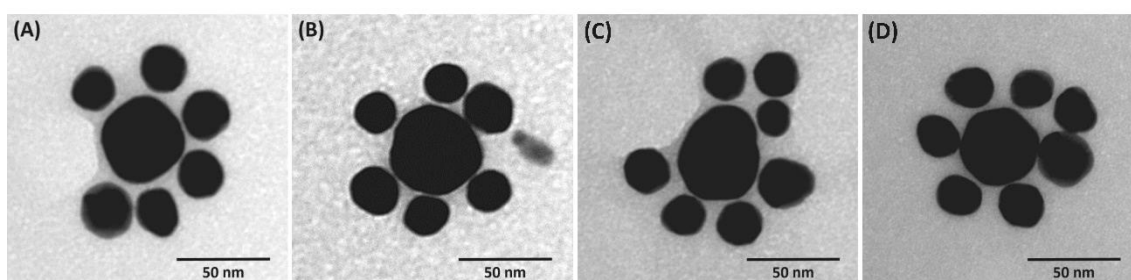


Figure 1. TEM images showing the recognition between AuNPs of 60 nm functionalized with anti-HSA IgG and AuNPs of 25 nm functionalized with HSA (**A** and **B**) and anti-BSA IgG and BSA (**C** and **D**).

Then, we constructed bispecific AuNPs, doubly conjugated with anti-HSA IgG, and anti-BSA IgG. To analyze the distribution of both antibodies at the surface of the bispecific AuNPs after being conjugated following our cooperative adsorption protocol, we used smaller AuNPs as labels. The bispecific conjugates were incubated with the labels for 24h and visualized by TEM. The break of isotropy could be observed, being observed in different multimeric AuNPs configurations which indicate polarization. Of note, antibody-antigen hybridization was not optimized in this experiment. Still, even thus, it is clear the occurrence of a break of isotropy in the distribution of the smaller NPs in the TEM projection images (shown below).

A gallery of images of the formed anisotropic multimeric structures and satellites is provided. While the exposure of the different AuNP conjugates has been at higher concentration, the TEM grids have to be prepared at low concentration to isolate the NPs biologically bound from unspecific NP aggregation during evaporation of the solvent. Otherwise, the identification of multimeric NPs is not possible (**Figure 2**). There are many unbound NPs observable in the undiluted samples, indicating that, probably, incubating times were too short (**Figure 3**). The most frequent event is one small (either 5 or 20 nm) NP attached to the 60 nm NP (**Figure 4**) consistent with a low concentration and limited time for conjugation. There are also a number of events where two small NPs, either 5 nm or 20 nm, are attached to the AuNP but this does not allow to discern any degree of anisotropy (**Figure 5**). Notably, a number of constructs that appear clearly anisotropic (**Figure 6**), never observed before, were visualized, indicating the subjacent cooperative antibody adsorption and polar functionalization, not perfect, but clearly to a certain degree that boosts its biological work. More random distributions were also observed, which are not incompatible with cooperative adsorption but results in little polarization (**Figure 7**).

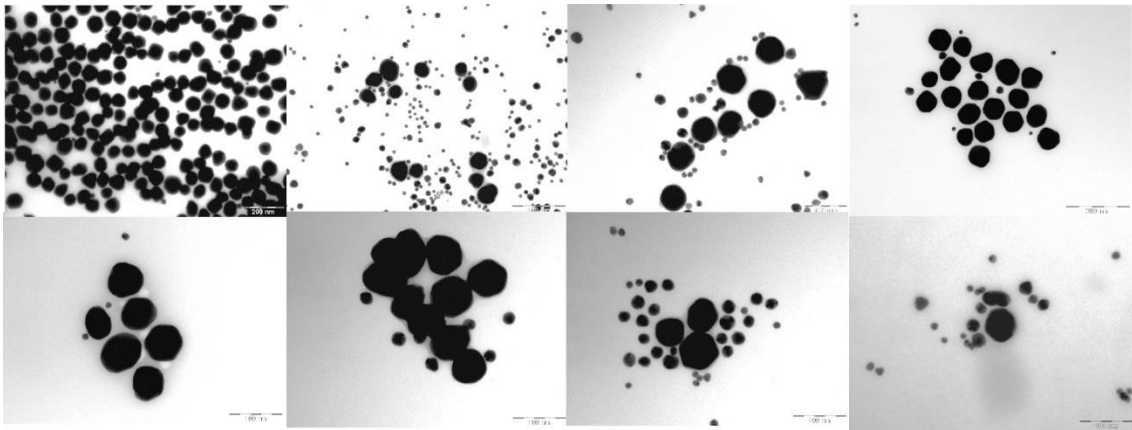


Figure 2. Bright Field TEM images of 2 replicas incubating different sized AuNPs with anti-BSA IgG and anti-HSA coated 60 nm, and BSA and HSA, 20 nm and 5 nm NPs, respectively.

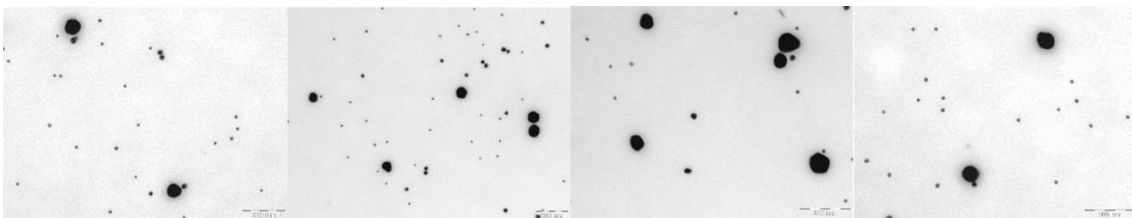


Figure 3. Bright Field TEM images of 2 replicas incubating different sized AuNPs with anti-BSA IgG and anti-HSA coated 60 nm, and BSA and HSA, 20 nm and 5 nm NPs, respectively.

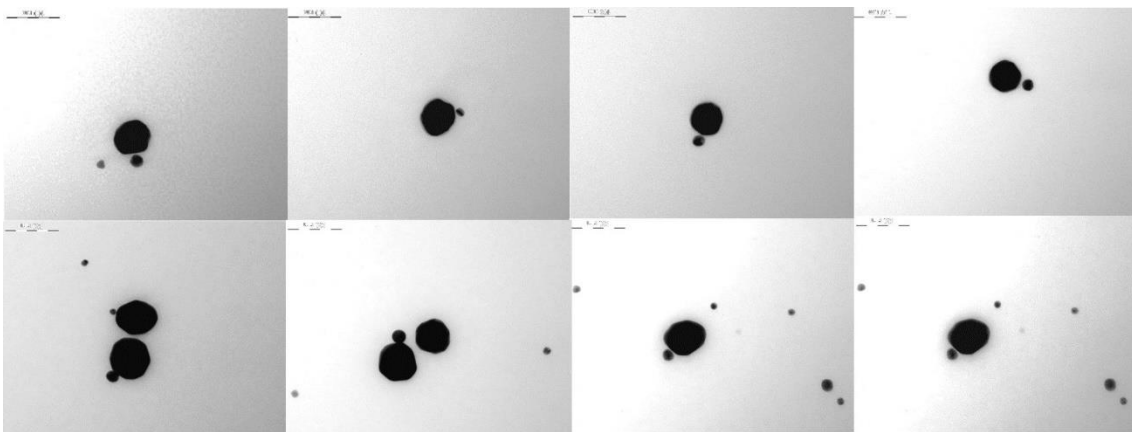


Figure 4. Bright Field TEM images of 2 replicas incubating different sized AuNPs with anti-BSA IgG and anti-HSA coated 60 nm, and BSA and HSA, 20 nm and 5 nm NPs, respectively.

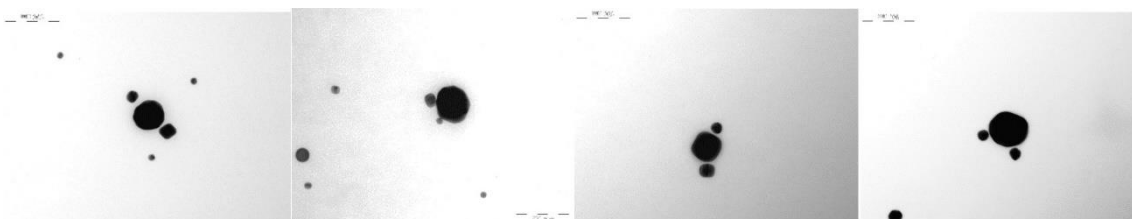


Figure 5. Bright Field TEM images of 2 replicas incubating different sized AuNPs with anti-BSA IgG and anti-HSA coated 60 nm, and BSA and HSA, 20 nm and 5 nm NPs, respectively.

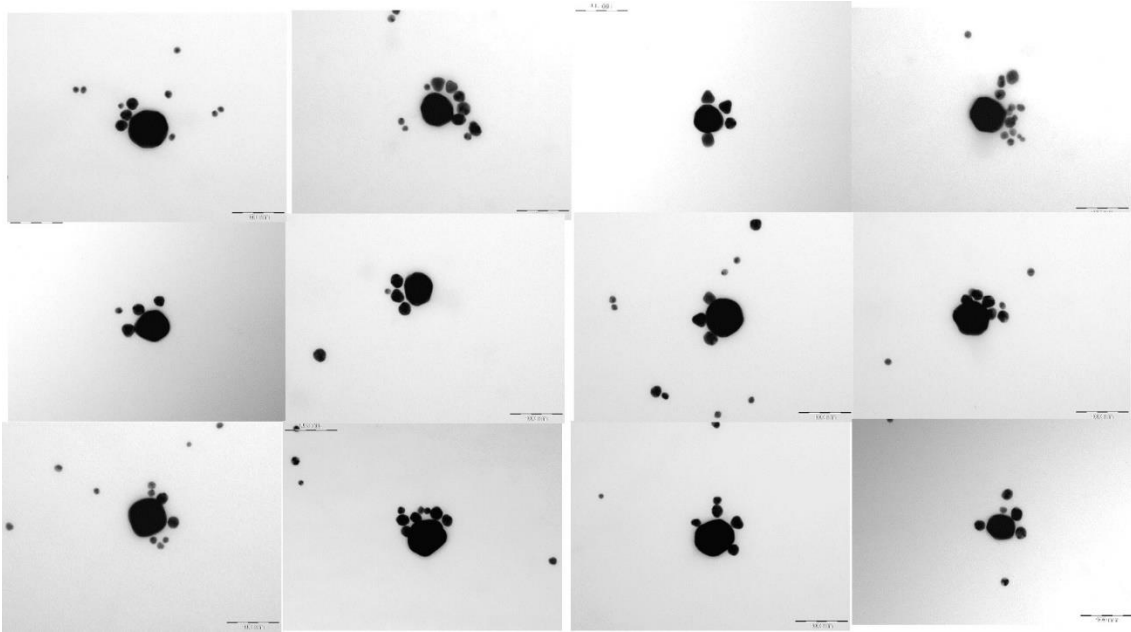


Figure 6. Bright Field TEM images of 2 replicas incubating different sized AuNPs with anti-BSA IgG and anti-HSA coated 60 nm, and BSA and HSA, 20 nm and 5 nm NPs, respectively.

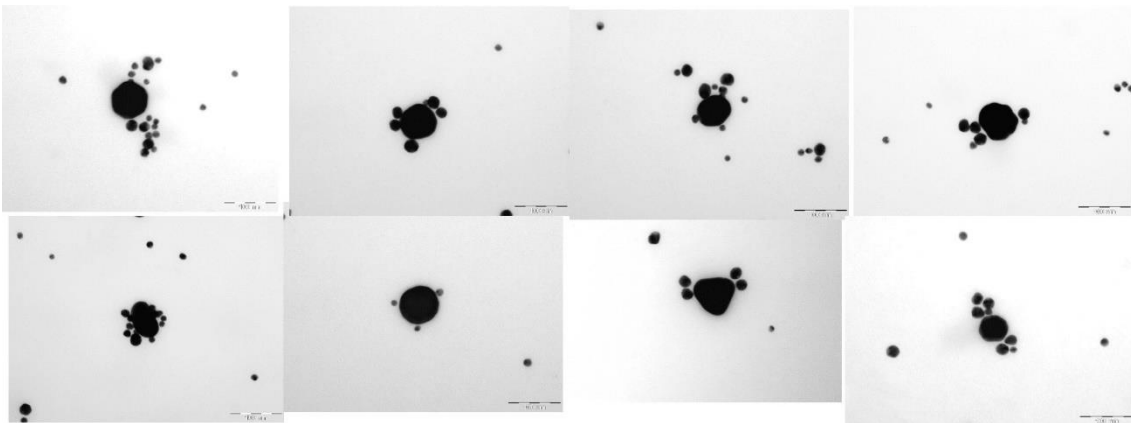


Figure 7. Bright Field TEM images of 2 replicas incubating different sized AuNPs with anti-BSA IgG and anti-HSA coated 60 nm, and BSA and HSA, 20 nm and 5 nm NPs, respectively.

This collection represents, not the abundance, but the different type of observed structures. The images are taken from two identical experiments and the results are indiscernible. The statistics of the image analysis are provided below.

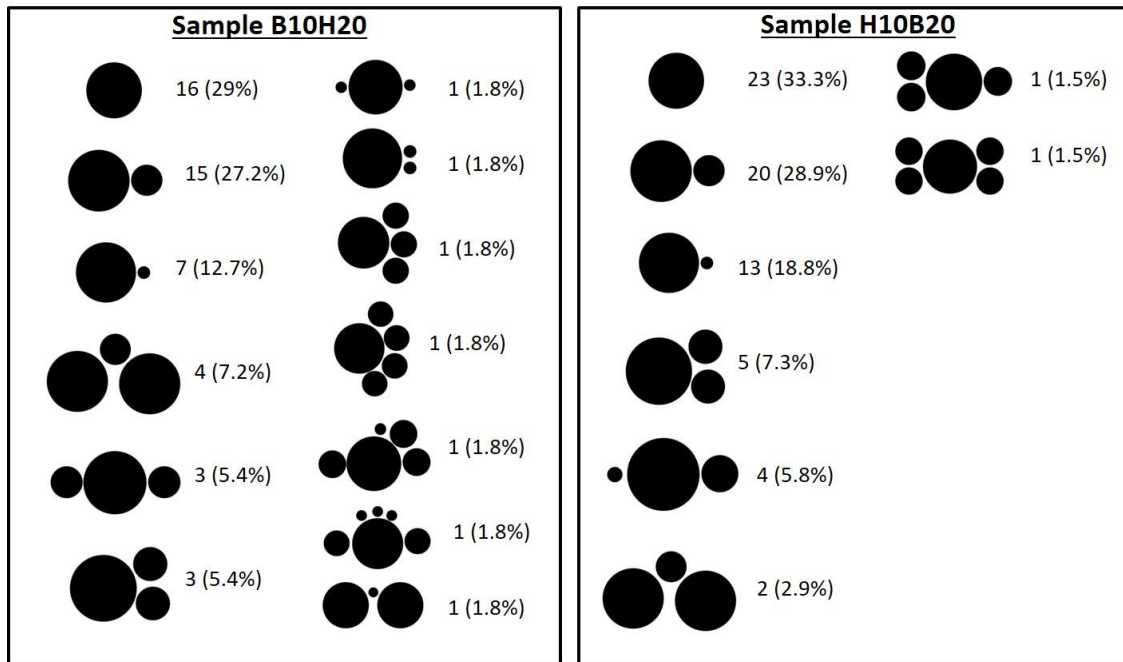
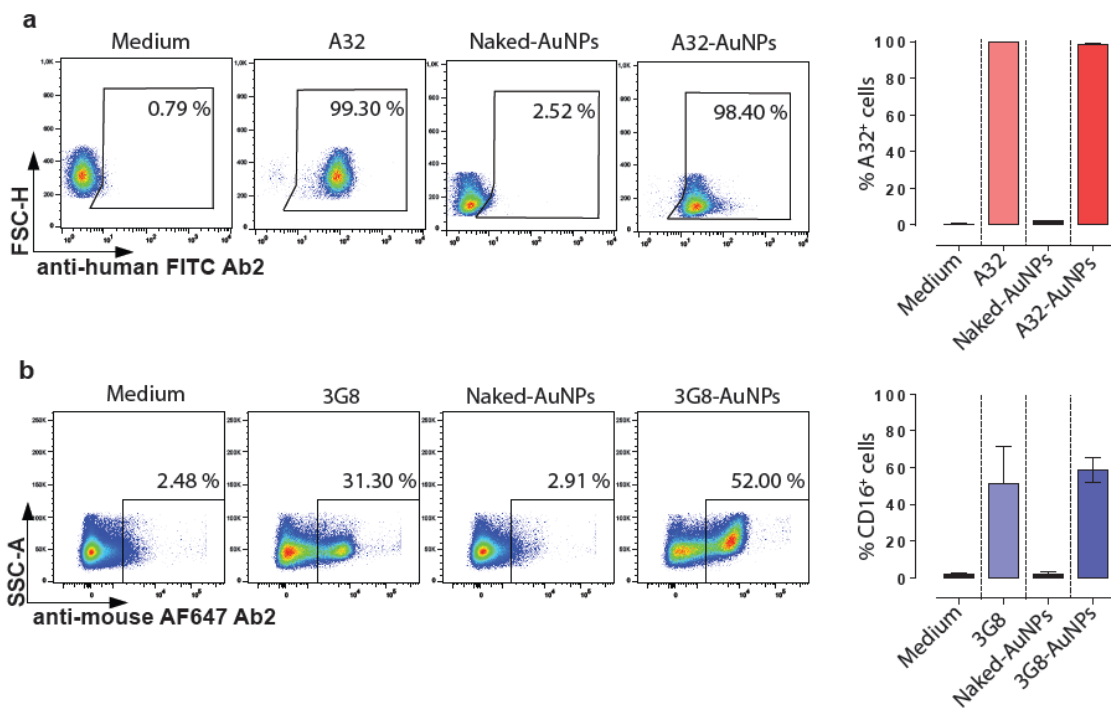


Image analysis of events distribution I. The TEM images of 232 events were randomly selected and classified according to their apparent structural order between 25 nm and 15 nm AuNPs around 60 nm AuNPs in diluted samples.

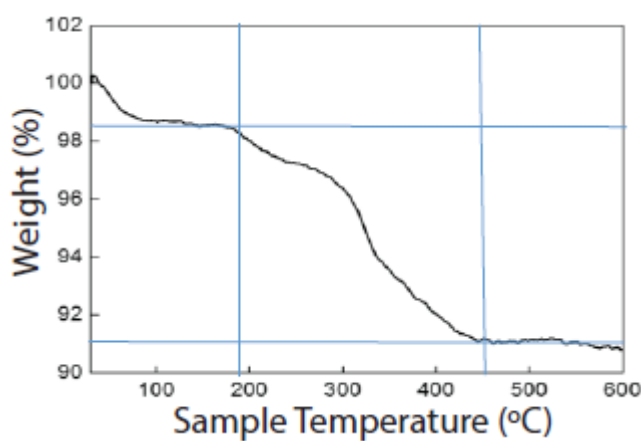
Supplementary Figure 1



Supplementary Figure 1. Targeting capabilities of the A32-monoconjugated and the 3G8-monoconjugated AuNPs. Cells were cultured with the nanoconjugates for 20 minutes and the binding capacity of the conjugated nanoparticles were assessed by flow cytometry. **a)** CEM.NK^R CCR5⁺ cells coated with the HIV-1 BaL gp120 recombinant protein were cultured in different conditions, including free

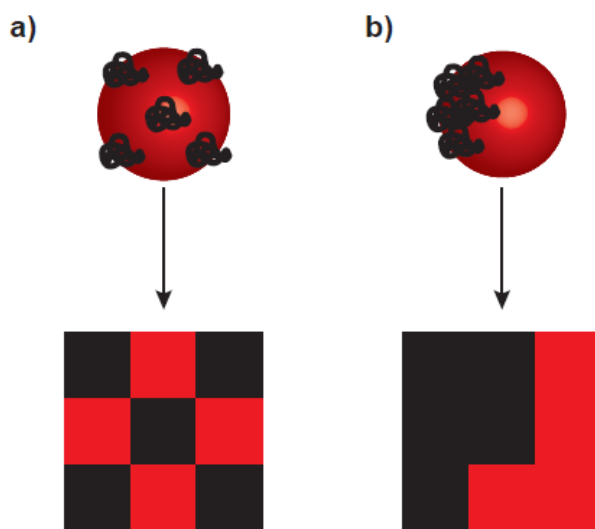
antibody A32, naked nanoparticles and monoconjugated A32-AuNPs. The capacity of the A32-AuNPs to recognize its cognate antigen was assessed using an anti-human secondary antibody that detects the A32 antibody. **b)** Primary isolated NK cells were cultured in different conditions, including free antibody 3G8, naked nanoparticles and monoconjugated 3G8-AuNPs. The capacity of the 3G8-AuNPs to recognize its cognate antigen was assessed using an anti-mouse secondary antibody that recognize the 3G8 antibody. Results from two independent experiments are displayed.

Supplementary Figure 2



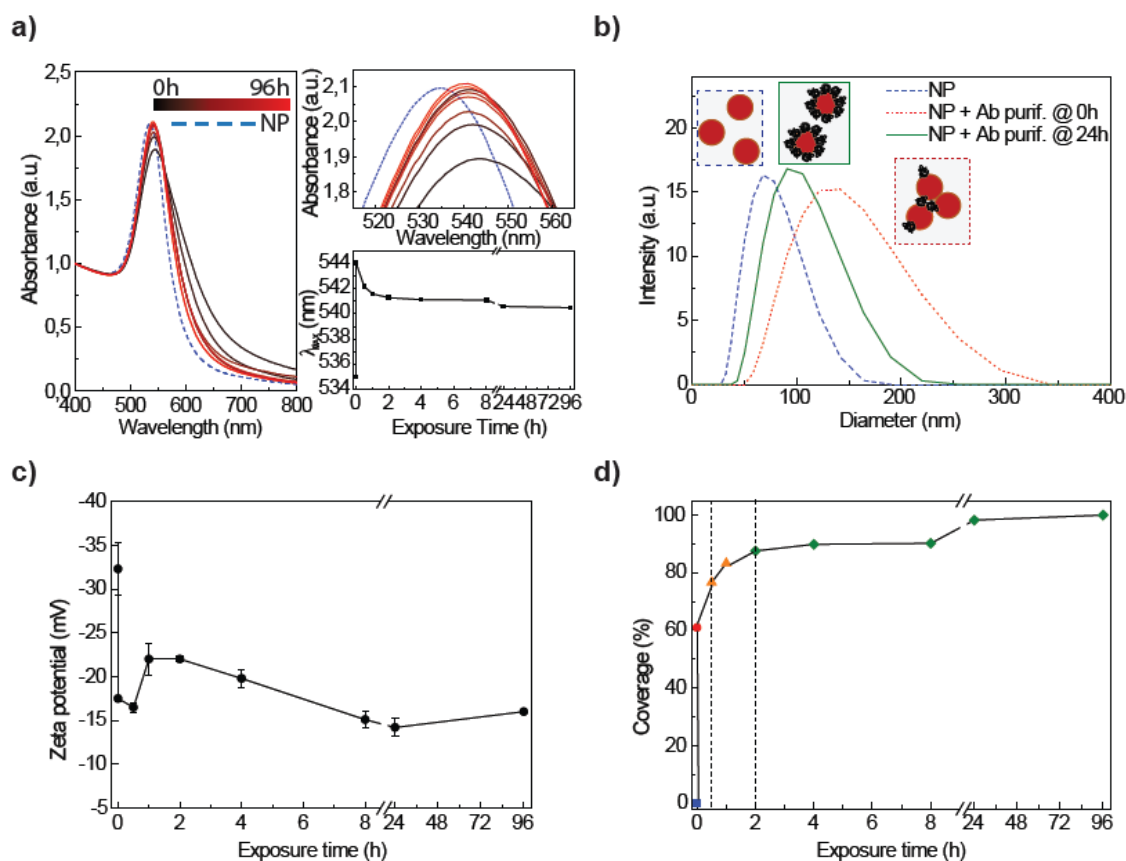
Supplementary Figure 2. Weight loss reported by TGA, from 30°C to 600°C, in an antibody coated (mouse IgG) 50 nm AuNP, reporting a decrease in mass of about a 10% of the total weight. The loss of mass between 200 and 450°C has been previously attributed to antibody sublimating from an AuNP surface. The anisotropy of the recorded signal with respect to free antibodies is likely due to the different thermal degradation of the antibody fractions on direct contact with the NP surface.

Supplementary Figure 3



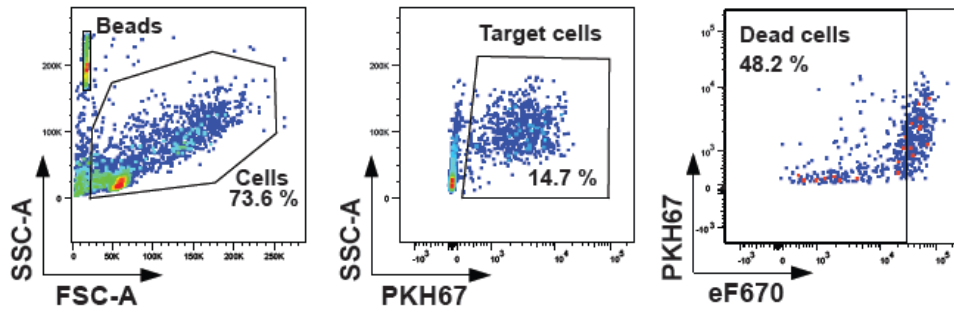
Supplementary Figure 3. Spatial organization in 3D and 2D of the protein on the surface of the NPs following **a)** the random adsorption model or **b)** the cluster adsorption model.

Supplementary Figure 4



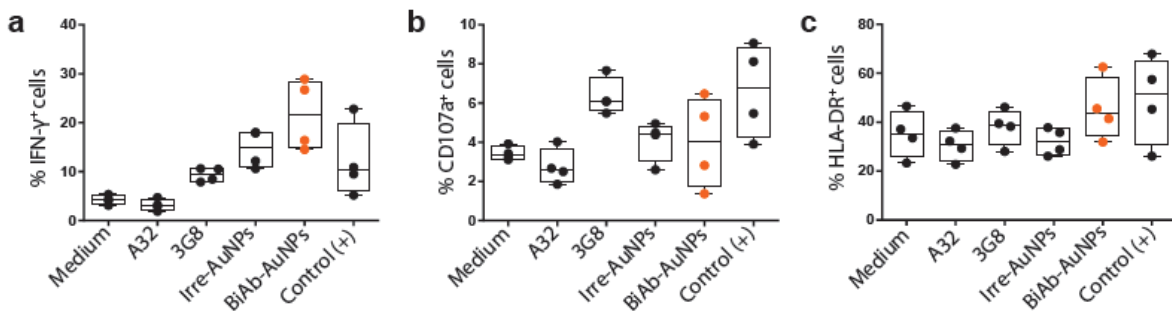
Supplementary Figure 4. Studies on the formation of the protein corona. **a)** UV-Vis characterization over time of purified AuNPs exposed to Ab from 0h up to 96h. UV-Vis spectra before exposure to Ab is represented by the blue dotted line. The colour gradient from black to red indicated spectra acquired at increasing exposure time to proteins. The upper right graph shows a zoom of main absorbance peaks. The bottom right graph shows wavelengths of the absorbance peaks as a function of the incubation time with the antibody. **b)** Hydrodynamic size (Z-Average) of AuNPs exposed to Ab and purified after exposure just after mixing, 0h, and after 24h of exposure time with respect to the hydrodynamic size of original AuNPs, represented by the blue dotted line. **c)** Zeta potential evolution over time of the ~50nm purified NPs after different exposure time to Nivolumab. **d)** Surface coverage calculated from the temporal evolution of the SPR peak position with respect to the SPR of naked NPs (blue dot).

Supplementary Figure 5



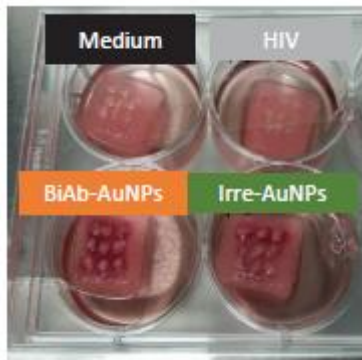
Supplementary figure 5. Flow gating strategy used to measure ADCC in gp120-coated CEM-NK^R.CCR5 cell line. AccuCount Blank Particles are used to normalize cell collection to a constant number of particles (1,000 events).

Supplementary Figure 6



Supplementary Figure 6. Assessment of NK cell activation induced by the BiAb-AuNPs. Summary graphs for different markers of NK cell activation and function after co-culturing the cells for 4.5h with the free antibodies A32 (5 µg/ml) and 3G8 (5 µg/ml), Irre-AuNPs and the pBiAb-AuNPs (10 µg/ml of total antibody burden). Positive controls consisted in adding PMA (10 ng/ml) and ionomycin (1 µM) to the culture. **a)** Percentage of IFN- γ ⁺ cells. **b)** Percentage of CD107a⁺ cells. **c)** Percentage of HLA-DR⁺ cells. All graphs represent median with range (min-max) for each condition. Statistical analysis consisted on a Wilcoxon matched-pairs signed rank test. *p<0.05.

Supplementary Figure 7



Supplementary Figure 7. Image of tonsil histoculture blocks infected with HIV and exposed to the *p*BiAb-AuNPs or the *Irre*-AuNPs.

IV. DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

A día de hoy no se conoce por completo el momento exacto y mecanismo de formación de los reservorios del VIH. El inicio temprano del TAR, 3 días después de la infección por SIV en simios [519, 520], y en los primeros momentos de la fase aguda en humanos [521-523], no previene el establecimiento de un reservorio latente permanente. Estudios recientes indican que la mayor parte del reservorio persistente en presencia del TAR parece haberse formado justo momentos previos al inicio del tratamiento [210, 524, 525], y una reducción más acusada en el tamaño del mismo se da a comienzos del TAR en comparación a los años posteriores [526, 527]. Esto se debe probablemente, a la rápida eliminación de células infectadas con una vida media relativamente corta, a la muerte celular inducida por infección lítica o por mecanismos efectores inmunes como respuestas CTL o mediadas por células NK [528]. Sin embargo, en presencia del TAR permanece otra proporción de células que no son objeto de esta eliminación, incluyendo aquellas que albergan provirus en regiones del genoma no permisivos a la expresión viral (en estado de latencia profunda) [220, 529, 530], y otras que como sugieren publicaciones recientes, podrían ser clones que albergan virus infecciosos capaces de producir antígenos virales, y resisten a los mecanismos de eliminación inmune [99, 244].

En pacientes en TAR, con el transcurso de los años el reservorio circulante se ve progresivamente dominado por poblaciones clonales, a menudo formado por células que se expanden mediante proliferación y exhiben un fenotipo más diferenciado [118, 236, 238, 531]. La proliferación y expansión clonal de las células infectadas se ve facilitada en ausencia de expresión viral, es decir, mientras el provirus se mantiene en estado de latencia [120, 240, 532]. Sin embargo, durante la supresión viral inducida por el TAR no todas estas células o clones persisten en un estado latente, y prueba de ello es la detección de viriones en la mayoría de los individuos en tratamiento, a lo que se denomina viremia residual [251]. Además, se desconoce si la expresión del RNA viral por parte de los clones activos es continua o intermitente, y cada vez hay más conciencia sobre la importancia de estudiar en profundidad los reservorios activos así como sus mecanismos de persistencia.

Varias publicaciones recientes han evidenciado la existencia de clones persistentes con expresión viral en algunos individuos VIH⁺ bajo tratamiento, que podrían representar el origen de la viremia residual [99, 533]. Además, cabe destacar que algunos de estos clones con transcripción viral activa poseen genomas VIH intactos, resaltando su posible papel en el rebote viral característico tras periodos de interrupción del TAR [120]. Estas células podrían también alterar la dinámica del reservorio y frenar la caída de su tamaño. De hecho, en un estudio incluyendo una cohorte de 1057 pacientes con carga viral suprimida durante una mediana de cinco años, los autores hallaron una asociación entre tamaños más grandes del reservorio viral así como tasas de reducción más lentas del mismo, y la magnitud de la viremia residual e incrementos transitorios en la misma, denominados *viral blips* [534]. Otros estudios han demostrado la presencia de células que contienen provirus defectivos competentes para la traducción de proteínas virales [161, 162]. Si bien estas células carecen de potencial para producir nuevas infecciones, podrían contribuir al agotamiento y activación persistente de distintas células del sistema inmune, debido a una exposición repetida a antígenos. Por tanto, la

existencia de células reservorio con genomas tanto intactos como defectivos que pueden dar lugar a expresión viral, indica la necesidad de prestar más atención a estos reservorios celulares activos. Da lugar también a especular sobre los potenciales beneficios que la eliminación de las células con producción de ARN y proteínas del VIH podría tener, no solo en la activación sistémica inmune, sino también en una transformación del reservorio hacia una configuración predominante de latencia profunda. Esto, en los individuos controladores de élite, parece ser una de las claves para lograr el control natural de la infección, dada la integración viral predominante en posiciones del genoma humano restrictivas para la expresión del VIH, como por ejemplo regiones centroméricas [220]. Por tanto, aspectos clave como la identificación de los reservorios activos así como la comprensión de los mecanismos que permiten a estas células persistir, pueden suponer un gran avance para el diseño de estrategias de cura.

En ausencia de estímulos, varias poblaciones celulares en sangre así como en varios compartimentos anatómicos, muestran niveles elevados de transcripción viral [99]. Estos reservorios activos se pueden ver representados en la **Figura 5**, e incluyen a las células T_{EM}, T_{CM}, T_{TM}, T_{FH} y T_{RM}, y aquellas identificadas mediante los marcadores CD20, CD30, PD-1 y CD32a. Por otro lado, una estrategia objeto de estudio actualmente consiste en la estimulación de los reservorios latentes mediante agentes revertidores de la latencia, con el objetivo de desenmascarar los provirus inactivos, que inicien la transcripción y traducción de proteínas virales y así fomentar su eliminación [267, 270].

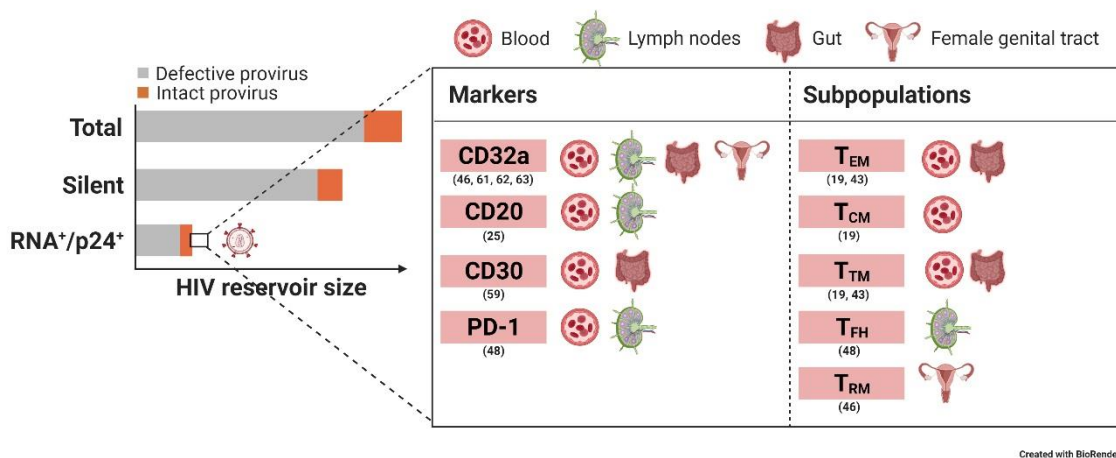


Figura 5. Reservorios activos del VIH identificados en individuos bajo TAR. La imagen representa la contribución relativa de las fracciones virales latente y activa al reservorio total, destacando los principales marcadores descritos hasta ahora que denotan reservorios activos, así como las subpoblaciones celulares y compartimentos anatómicos donde se produce una transcripción activa del VIH durante el tratamiento. Imagen extraída de [99].

A continuación, se discutirán aspectos relevantes en la eliminación de los reservorios activos, como una vulnerabilidad diferencial a la respuesta inmune mediada por células NK, y el uso de la nanotecnología para facilitar la respuesta inmune contra las células infectadas.

-Mecanismos de persistencia del reservorio viral activo en células que expresan el marcador CD32.

En el **CAPÍTULO 1** de la tesis, se presenta un trabajo cuya hipótesis de partida es una vulnerabilidad diferente de distintas poblaciones de células T CD4⁺ reservorio, a la eliminación por mecanismos inmunes mediados por células NK. Entre las subpoblaciones reservorio analizadas: T_{NA}, T_{SCM}, T_{CM}, T_{EM}, T_{CD20^{dim}}, T_{CD32^{dim}}, aquellas células con expresión del marcador CD32, el cual identifica una proporción del reservorio activo [201, 204, 205, 427], mostró una gran resistencia al mecanismo ADCC. La exploración de posibles factores conducentes a la habilidad de las células T_{CD32^{dim}} para escapar del control inmune mediado por inmunoglobulinas, indicó como razón principal, un impedimento estérico en la unión de IgGs específicas de VIH a estas células, y por tanto una débil activación de la respuesta ADCC a través del receptor CD16 en las células NK. La naturaleza de CD32 como receptor Fc, permite a las células que expresan esta molécula interactuar con los anticuerpos a través del fragmento constante [535]. En el caso de células T CD4⁺ infectadas por VIH, la expresión de CD32 les proporciona una capacidad bivalente de interacción con los anticuerpos: I) pudiendo ser reconocida por el fragmento variable de anticuerpos VIH-específicos, y II) pudiendo unirse al fragmento constante de dichos anticuerpos. En este caso, ello conlleva un detrimento en la respuesta ADCC contra las células infectadas, ya que la posible ocupación de las moléculas CD32 por parte de inmunoglobulinas no específicas a través de su fragmento Fc, podría obstaculizar la unión de anticuerpos específicos y por tanto una sinapsis inmunológica eficiente con las células NK. En este estudio, además se observó una correlación entre la potencia de las células NK para eliminar células infectadas y el tamaño del reservorio, encontrándose respuestas ADCC más débiles, contra el total de células T CD4⁺ y particularmente contra la subpoblación T_{CD32^{dim}}, en los pacientes con mayor tamaño del reservorio. Independientemente de ello, y aunque el estado funcional de la célula NK influyó en la magnitud de eliminación de las células T_{CD32^{dim}}, experimentos ex vivo con células NK de otras cohortes, incluyendo controladores de élite y donantes sanos, mostraron resultados similares, resaltando la resistencia intrínseca de las células T_{CD32^{dim}} al mecanismo ADCC. Desafortunadamente, y en consistencia con el modelo propuesto de interferencia en la respuesta ADCC debido a impedimento estérico, intervenciones para mejorar la respuesta inmune NK contra la subpoblación T_{CD32^{dim}}, incluyendo el bloqueo de moléculas HLA-E en la célula infectada o la estimulación de las células NK mediante citoquinas, no dieron resultado.

Los resultados anteriormente expuestos podrían representar un nuevo obstáculo para la erradicación del VIH, con especial implicación en el contexto de terapias diseñadas para el ataque a los reservorios mediante anticuerpos, neutralizantes y no-neutralizantes, ya que las células T_{CD32^{dim}} podrían escapar de sus mecanismos de acción. El incremento en la expresión de CD32 tras la infección o reactivación viral en las células T CD4⁺, se añade a la lista de medios que el VIH podría emplear para evadir la respuesta inmune humoral, citando el difícil acceso de determinados anticuerpos neutralizantes a sus epítopos en los trímeros de la proteína de la envuelta, debido por ejemplo a una alta densidad de glicanos [536]. Además, el mayor potencial de las células T_{CD32^{dim}} para proliferar, de forma basal [201, 417], y especialmente como se ha demostrado aquí tras interacción con estos complejos inmunes, son cualidades que podrían explicar la capacidad de estas células para persistir. En este sentido, la proliferación celular es

uno de los principales mecanismos de mantenimiento del reservorio, y cabe destacar que diversos estudios han hallado células T_{CD32} persistentes, tanto en sangre como en tejidos linfoides, siendo asociada la expresión de esta molécula a una transcripción activa del VIH, especialmente en tejidos [201-205, 427]. Por tanto, la eliminación de las células T_{CD32}^{dim} y sus particulares características, deberían considerarse en cualquier estrategia encaminada a reducir los niveles del reservorio. Aspectos claves y que todavía se desconocen sobre las células T_{CD32}^{dim} incluyen la dinámica de expresión de la molécula CD32 en las células infectadas, así como su comportamiento frente a otras respuestas inmunes relevantes en el control de la infección, como las mediadas por células T_{CD8^+} . Ello podría facilitar el diseño de estrategias para acabar con los reservorios celulares del VIH.

La depleción total de las células $CD32^+$ no representa una alternativa factible, ya que supondría la eliminación de la mayoría de células mieloides del organismo, dados los niveles superiores de expresión de CD32A en monocitos por ejemplo, respecto a las células T_{CD4^+} [535]. La familia de receptores para IgG Fc γ RII, o también conocida como CD32 en la nomenclatura de *clusters* de diferenciación, consta de 3 subtipos en humanos: CD32A, CD32B y CD32C, y presentan dos funciones principales: la regulación de las respuestas celulares y la captación de complejos inmunes. CD32A y CD32C están implicados en activación de respuestas celulares, mientras que CD32B tiene función inhibitoria. Las respuestas celulares reguladas por CD32 incluyen la fagocitosis, estimulación de producción de citoquinas y transporte endocítico [200]. En el contexto de la infección por VIH, la postulación de CD32A como marcador del reservorio latente competente en un artículo reciente [203], suscitó el interés por conocer más sobre el papel de las moléculas CD32 en el compartimento de células T y su implicación en la persistencia del VIH. CD32A puede mediar la internalización de complejos inmunes-anticuerpos mediante endocitosis y fagocitosis en neutrófilos, monocitos, plaquetas y macrófagos, donde su función ha sido profundamente estudiada [200]. Este receptor puede activar neutrófilos y otras células efectoras mieloides para la eliminación directa de células diana como células tumorales o infectadas por virus, y también inducir la liberación de moléculas y citoquinas inflamatorias en granulocitos tras su unión a complejos inmunes de tipo IgG. CD32A juega además un papel importante en la fisiología normal de la activación, adhesión y agregación de plaquetas después de una lesión vascular. La expresión y función de CD32 en células T_{CD4^+} humanas, sin embargo, ha sido poco caracterizada, donde parece predominar la isoforma CD32A, aunque podría estar presente también la isoforma CD32B en menor proporción (ratio reportado 5:1) [417]. Los estudios indican niveles de expresión muy bajos de CD32 en células T_{CD4^+} en ausencia de estimulación [200, 417]. Sin embargo, la activación con anti-CD3/CD28, así como la infección ex vivo por VIH, producen un incremento en la expresión de CD32 en superficie [201, 400, 535]. Respecto a su función, un papel activador del receptor CD32A en células T_{CD4^+} tras interacción con IgGs, también ha sido descrito, en términos de proliferación, en consistencia con los resultados observados en la presente tesis, y secreción de citoquinas [201, 417]. Por otro lado, CD32B se expresa en células B, basófilos, monocitos y macrófagos, estando su expresión altamente influenciada por la exposición a determinadas citoquinas. CD32B funciona como punto de control inmune o *checkpoint*, y contrarresta la activación celular por un amplio espectro de receptores activadores, además de la activación inducida por el receptor de células B (BCR) [414]. Por su parte, la expresión de CD32C es compleja y sujeta a polimorfismo. Su expresión ha sido principalmente estudiada en células NK, y al igual que CD32A, la proteína

CD32C funcional constituye un receptor activador [535]. El análisis de la expresión de las distintas isoformas de CD32 ha sido difícil históricamente, debido a la alta similitud en los dominios extracelulares de CD32A, CD32B, y CD32C. Ello ha dificultado la producción de anticuerpos altamente específicos que sean capaces de discriminar entre los receptores, y su aplicación para la citometría de flujo. Un anticuerpo específico para CD32A fue desarrollado, pero mostró una resolución muy baja [414]. Todo esto contribuye a la dificultad para eliminar el compartimento CD32 como estrategia para reducir el reservorio, dada su expresión en múltiples tipos celulares así como la variedad de funciones que puede ejercer y que son fundamentales en la respuesta inmune contra distintos patógenos. El desarrollo de un anticuerpo altamente específico para CD32A, y su combinación en un formato innovador como los producidos recientemente con especificidad doble o triple, que permitan una terapia más selectiva y dirigida solo al compartimento CD32⁺ CD4⁺, podría facilitar la exploración de esta opción.

En la misma línea, para la eliminación del reservorio CD32, el uso de inhibidores de Nef [537] tampoco sería una solución a la existencia de estas células y su resistencia a la función NK, ya que los experimentos presentados en la tesis sugieren un papel limitado de las proteínas accesorias del VIH en el incremento de expresión de CD32 tras la infección ex vivo. Estudios futuros sobre la dinámica de expresión del receptor CD32 en las células infectadas y en las células latentes reactivadas, así como la exploración de mecanismos inmunes alternativos que sean altamente efectivos en la eliminación de estas células, serán de gran utilidad.

- Estimulación del sistema inmune mediante nanopartículas para eliminar los reservorios virales

Lograr una cura para la infección VIH se ha mostrado una tarea extremadamente complicada. Una estrategia exitosa requerirá seguramente superar simultáneamente varias barreras que entorpecen la eliminación de los reservorios, como los mecanismos que mantienen el estado de latencia, la expansión clonal, respuestas inmunes debilitadas y mecanismos de resistencia como los hallados en células T_{CD32}^{dim}. Hasta ahora, solo se han descrito dos casos en los que parece haberse curado la infección, el denominado paciente de Berlín y más recientemente otra persona en Londres. Ambos recibieron un trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas (HSCT, del inglés, *hematopoietic stem cell transplantation*) de un donante con una mutación en el gen del correceptor CCR5, que hace a las células resistentes a la entrada de cepas VIH con tropismo R5 [538, 539]. Pero este procedimiento es complejo, y conlleva riesgos para la salud que hacen que no sea posible su aplicación a gran escala en pacientes infectados que no padezcan otras patologías como cáncer. El paciente de Berlín permaneció sin signos de rebote viral y ausencia de viremia residual durante más de 10 años sin tratamiento. Ensayos de medición del reservorio sugirieron una reducción de 3,5 logaritmos en el tamaño del mismo [540]. Otros casos en los que pareció lograrse una cura debido a una remisión temporal de la infección, incluye a los “pacientes de Boston” y el “niño de Mississippi”. Los dos pacientes de Boston recibieron un trasplante HSCT para el tratamiento de enfermedades hematológicas mientras que seguían tomando el TAR. Esto resultó en una reducción del reservorio de más de 2 logaritmos, y tras interrupción del TAR, experimentaron una supresión viral por un periodo de 3 y 8 meses, hasta que se produjo un rebote viral [541]. En el caso del “niño de Mississippi”, un bebé infectado perinatalmente, se le administró el TAR desde las 30 horas de vida hasta los 18

meses de edad, y los niveles de virus en plasma permanecieron por debajo del límite de detección durante más de 2 años tras interrupción del tratamiento [542]. En este niño, la frecuencia de células latentemente infectadas fue 2,5 logaritmos inferior a los niveles típicos en un adulto tratado; a pesar de ello, sufrió un rebote viral 27 meses después de interrumpir el tratamiento [521, 540]. Estos casos ilustran la dificultad y el requerimiento de reducciones más sustanciales en el tamaño del reservorio para prevenir una recrudescencia de la infección.

Las estrategias de *shock and kill* representan una manera de desenmascarar al reservorio latente, y la aproximación más explorada para fomentar la eliminación de los reservorios celulares. La baja inducibilidad de los provirus latentes es uno de los problemas principales para curar la infección [532], y los LRA desarrollados hasta la fecha no han mostrado un gran impacto en la inducción de expresión génica viral. Actualmente, se está testando una nueva generación de compuestos con potencial para reactivar el VIH, entre los que se encuentran agonistas de PRRs, inhibidores de puntos de control inmune o *checkpoints*, o compuestos que estimulan la vía no canónica NF- κ B. Estas moléculas con propiedades inmunomoduladoras podrían tener además la ventaja teórica de restaurar las respuestas inmunes para facilitar la eliminación de las células infectadas [543]. Esto podría ser clave para incrementar el éxito de las estrategias *shock and kill*, ya que los resultados obtenidos en diferentes estudios donde los niveles del reservorio permanecieron estables tras la administración de LRAs, también sugieren la necesidad de combinar el uso de estas moléculas con intervenciones para estimular y promover respuestas inmunes robustas contra las células infectadas [49]. En este sentido, las células NK son un candidato atractivo para el desarrollo de inmunoterapias [347]. Importantes aspectos como la necesidad de una sinapsis inmunológica eficiente con las células infectadas y una potenciación de las funciones NK en los pacientes VIH⁺, se deben tener en cuenta en el diseño de tales intervenciones.

En el **CAPÍTULO 2** de la tesis se presentan los resultados referentes al desarrollo de una nanoherramienta creada para guiar y potenciar las respuestas inmunes NK contra las células infectadas por VIH, simulando una respuesta de tipo ADCC. Se trata de nanopartículas biespecíficas cubiertas en su superficie por dos clases de anticuerpos en una disposición ordenada. La presencia simultánea de los anticuerpos A32 y 3G8 en una misma plataforma, el primero con capacidad para reconocer la proteína viral gp120 y el segundo el receptor CD16, permite guiar y estimular la respuesta inmune. CD16 es un potente receptor activador ampliamente expresado por células NK, y cuando se producen eventos de señalización a través del mismo, la balanza que gobierna el estado funcional de las células NK se inclina hacia la activación y mediación de respuestas citotóxicas [505]. La inclusión de anticuerpos 3G8 en las nanopartículas desarrolladas cumple dos objetivos, por un lado la dirección inmune hacia el compartimento NK, y por otro lado la activación de las mismas mediante señalización a través de CD16. De forma similar a cuando se produce una respuesta ADCC, en este caso tras el reconocimiento por parte de CD16 del fragmento constante de anticuerpos unidos a células anómalas, la estimulación directa de este receptor mediante los fragmentos variables de anticuerpos 3G8 permite desencadenar una potente respuesta citotóxica. Por su parte, los anticuerpos A32 permiten direccionar la respuesta citotóxica NK hacia las células infectadas. Este anticuerpo reconoce un epítipo conformacional de gp120, que requiere la interacción con

el receptor CD4 para su exposición [517]. Debido a ello, una limitación relativa a su uso puede ser la disminución de los niveles de CD4 inducida por las proteínas virales Nef y Vpu [544]. Sin embargo, se ha demostrado que el epítipo reconocido por los anticuerpos A32 permanece accesible durante una ventana de tiempo de varias horas, ofreciendo una oportunidad para atacar a las células VIH⁺ [545]. Además, otras propiedades como la capacidad para reconocer la envuelta de todas las cepas virales y la ausencia de mutaciones de escape frente a su epítipo [546, 547], hacen del anticuerpo A32 un buen candidato para dirigir las nanopartículas hacia las células reservorio en el contexto de la reactivación viral. En nuestro estudio, demostramos que la combinación y confinamiento de ambos anticuerpos, A32 y 3G8, sobre la nanopartícula (BiAb-AuNPs), favoreció la sinapsis inmunológica con las células VIH⁺ y la inducción de una respuesta potente mediada por células NK. Además, en experimentos con muestras de amígdala, las nanopartículas biespecíficas fueron capaces de entrar y reducir la infección en este tejido linfoide. Las terapias basadas en nanopartículas, por ejemplo para aplicaciones de administración de fármacos, han mostrado ventajas significativas sobre sus homólogos no formulados, como la capacidad para alcanzar áreas del cuerpo que otros sistemas no pueden [548, 549]. El tejido linfoide se ha mostrado como un área privilegiada para la persistencia del VIH, por lo que terapias innovadoras basadas en nanopartículas podrían ayudar a llevar a estos compartimentos tanto fármacos anti-virales como moléculas inmunomoduladoras de una forma óptima [550]. Un aspecto innovador de las BiAb-AuNPs desarrolladas y descritas aquí, es la presentación de dos tipos de anticuerpos en un formato multivalente y ordenado, con dominios de anticuerpos A32 por un lado, y dominios de anticuerpos 3G8 por otro, lo cual facilita el reconocimiento de los correspondientes antígenos y el contacto celular específico. El método optimizado para la obtención de nanopartículas biespecíficas polarizadas ha sido patentado (patente WO 2021/023649 A1). Dadas las ventajas que presenta, como la funcionalización de las nanopartículas sin necesidad de intermediarios de conjugación que puedan afectar a la estructura de los anticuerpos, así como la disposición polarizada que logra de los mismos, puede representar una metodología muy útil y fácilmente intercambiable para testar moléculas con distintas especificidades, en diversas patologías. De hecho, la combinación de anticuerpos es una estrategia que se está intentando explotar para eliminar los reservorios persistentes [392], y su agrupación en una misma plataforma podría suponer avances como los citados anteriormente, incluyendo una mayor facilidad para alcanzar las células diana, una reducción en la dosis necesaria de moléculas inmuno-moduladoras y toxicidad reducida [310, 551]. En el campo del VIH, la aplicación más inmediata de la nueva nanoherramienta diseñada, sería como plataforma rápida para testar combinaciones de moléculas, haciendo hincapié en las ventajas que ofrece su formato biespecífico, multivalente y polarizado. Sin embargo, su aplicación en la clínica podría ser más complicada.

Varios sistemas basados en nanopartículas han recibido la aprobación por la FDA o la Agencia Europea del Medicamento (EMA) para el tratamiento o diagnóstico de enfermedades, principalmente con aplicación en cáncer [552]. En el contexto de la infección por VIH, implementar este tipo de nanoherramientas encuentra dificultades añadidas, dada la alta eficacia del TAR actual para controlar la infección viral y la cantidad de evidencia sobre su seguridad de la que se dispone, a diferencia de lo que ocurre en el campo de la nanotecnología. Cada sistema de nanopartículas es único, y cada formulación tiene que recorrer un largo camino en el esfuerzo para su translación clínica, siendo necesaria aún más información sobre la

seguridad y eficacia de estas terapias, la biodistribución de las nanopartículas, una mejor comprensión de las discrepancias obtenidas entre los estudios con modelos animales versus los estudios en humanos, y la dificultad añadida de una síntesis a gran escala. Aun así, hay múltiples casos de nanopartículas con fines terapéuticos y diagnósticos, tanto inorgánicas (por ejemplo de oro, sílice u óxido de hierro) como orgánicas (poliméricas, liposomas, micelas, etc.), que han tenido éxito en estudios preclínicos y han sido o están siendo desarrolladas en la clínica, para aplicaciones como la obtención de imágenes y tratamiento de la anemia, ablación de tumores, agentes tópicos, terapia génica, administración de fármacos, y en el campo de las vacunas [552]. De hecho, las vacunas contra la COVID-19 producidas por Pfizer/BioNTech y Moderna, basadas en ARNm, han sido uno de los avances científicos más importantes de los últimos años [553, 554]. Ambas formulaciones se han servido de nanopartículas lipídicas para encapsular el ARNm que codifica para la proteína espiga “S” del SARS-CoV-2, proporcionándole estabilidad y facilidad para entrar en las células [555]. Esta y otras propiedades suscitan el interés en las tecnologías basadas en nanopartículas. En este sentido, varios diseños y formulaciones de nanopartículas orgánicas han demostrado una mayor protección de los fármacos, una liberación controlada de los mismos, incrementos en el tiempo de circulación, y una acumulación o dirección ventajosa hacia tejidos dañados [556]. Por otro lado, el uso de nanopartículas inorgánicas podría aportar beneficios como los mencionados anteriormente [557], además de otras funciones derivadas de propiedades únicas como la resonancia del plasmón de superficie y magnetismo. Al respecto, se han intentado explotar estas características de los nanosistemas para un transporte selectivo a regiones de interés en el organismo, como por ejemplo zonas afectadas por tumores, así como la inducción de calor por parte de los mismos para fomentar la eliminación de las células anómalas [558]. De hecho, la aplicación de campos magnéticos externos es una aproximación que se está explorando, encontrándose estudios con el objetivo de guiar células NK manipuladas con nanopartículas magnéticas hacia el tumor, logrando niveles superiores de infiltración de las células al mismo tiempo que mantuvieron su capacidad funcional [559].

En conclusión, los nanosistemas ofrecen propiedades que no se encuentran en compuestos o moléculas individuales, representando una perspectiva de futuro que podría mejorar las terapias centradas en el compartimento celular NK y que merece la pena explorar. Inmunoterapias basadas en células NK han demostrado ser seguras y efectivas en cáncer, especialmente en enfermedad hematológica [310]. Estas terapias han consistido principalmente en la mejora de las funciones efectoras de las células NK in vivo mediante la administración de citoquinas, o en la terapia adoptiva de células NK a los pacientes, tras manipulación de las mismas ex vivo y su posterior transfusión. Sin embargo, aún hay barreras que se deben superar para implementar con mayor éxito estas inmunoterapias, y que incluyen una corta vida útil de las células NK in vivo, la dificultad para alcanzar determinadas áreas o regiones tumorales, una limitación en la capacidad para expandir poblaciones NK in vitro, y la complejidad y coste del tratamiento [560]. Las nanopartículas podrían ser útiles para el desarrollo de productos optimizados basados en células NK, representando una aproximación innovadora que se debería estudiar.

La mayoría de trabajos publicados con el objetivo de modular la respuesta inmune NK mediante distintas estrategias, incluyendo la nanotecnología, han considerado a estos linfocitos como un

compartimento homogéneo [310]. Sin embargo, una línea de futuro con potencial interés implica considerar la gran heterogeneidad del compartimento NK a nivel de expresión de receptores y capacidad funcional. La expansión y activación de determinadas subpoblaciones dotadas de capacidades ventajosas, como la mediación de respuestas de tipo memoria o mayor potencial citotóxico, podría ser de gran utilidad para combatir el cáncer y las infecciones virales. En la misma línea, la mejora de las capacidades funcionales de determinadas subpoblaciones de células NK que se encuentran exhaustas en los pacientes VIH⁺, podría ayudar a la eliminación de los reservorios virales. Para tal fin, el uso de anticuerpos bloqueadores de *checkpoints* o moléculas de control inmune, como KIRs, NKG2A, TIGIT, y PD-1, podría ser una estrategia útil, y se está mostrando como una opción muy interesante para avivar la función de las células NK in vitro e in vivo, sobre todo en enfermedad cancerígena [310]. En este sentido, en nuestro laboratorio estamos llevando a cabo actualmente estudios sobre las características y función de las células NK en los pacientes VIH⁺ en tratamiento, con el objetivo de encontrar aquellas subpoblaciones que correlacionan con el tamaño del reservorio viral, así como mejorar la función de aquellas que muestran respuestas disminuidas. En concreto, estamos explorando el papel del receptor inhibidor KLRG1 en la respuesta NK en los pacientes con VIH, y el potencial de una terapia con anticuerpos anti-KLRG1 in vitro para estimular su función. Además, para facilitar la translación a la clínica de la estrategia de combinación de los anticuerpos A32 y 3G8, en nuestro laboratorio se está testando la eficacia in vivo de un anticuerpo biespecífico A32-3G8 para eliminar los reservorios latentes tras reactivación viral.

V. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. Distintas poblaciones de células T CD4⁺ que constituyen el reservorio del VIH presentan una vulnerabilidad diferencial a la respuesta inmune mediada por células NK.
2. Las células T infectadas con expresión de la molécula CD32 son capaces de interactuar con complejos inmunes, y presentan resistencia al mecanismo inmune ADCC.
3. Las células infectadas CD32⁺ presentan mayor potencial de proliferación tras la interacción con complejos inmunes.
4. El reservorio latente expresa la molécula CD32 tras la reversión de la latencia con varios compuestos, y estas células muestran también una marcada resistencia a la respuesta inmune ADCC.
5. Pacientes VIH⁺ tratados y con carga viral indetectable durante varios años presentan anticuerpos VIH-específicos en plasma con capacidad de desencadenar respuestas inmunes de tipo ADCC, resaltando el potencial de este mecanismo inmune en la configuración del reservorio viral.
6. Las células NK de los pacientes con mayor tamaño total del reservorio eliminan de manera menos eficiente las células infectadas por VIH mediante ADCC.
7. La combinación de los anticuerpos A32 y 3G8 se muestra como una estrategia útil para dirigir y estimular la respuesta inmune mediada por células NK hacia las células infectadas por VIH.
8. El confinamiento de ambos anticuerpos en una plataforma basada en nanopartículas facilita el contacto celular específico y la eliminación de células que sirven de reservorio para el VIH.
9. La nueva nanoherramienta pBiAb-AuNPs muestra la capacidad de penetrar en el tejido linfoide y reducir la infección viral.
10. El método de conjugación basado en la adsorción cooperativa desarrollado y optimizado en la presente tesis, conduce a la disposición ordenada de los anticuerpos A32 y 3G8 sobre la nanopartícula, y presenta ventajas en términos de favorecimiento de la sinapsis inmunológica específica y la estimulación inmune NK, respecto a estrategias de conjugación no polarizadas.

VI. BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. *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., H.W. Jaffe, and J.W. Curran, *Reflections on 30 years of AIDS.* Emerg Infect Dis, 2011. **17**(6): p. 1044-8.
4. Greene, W.C., *A history of AIDS: looking back to see ahead.* Eur J Immunol, 2007. **37 Suppl 1**: p. S94-102.
5. 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.
6. 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.
7. Coffin, J., et al., *What to call the AIDS virus?* Nature, 1986. **321**(6065): p. 10.
8. Perelson, A.S., et al., *Decay characteristics of HIV-1-infected compartments during combination therapy.* Nature, 1997. **387**(6629): p. 188-91.
9. Eisinger, R.W., C.W. Dieffenbach, and A.S. Fauci, *HIV Viral Load and Transmissibility of HIV Infection: Undetectable Equals Untransmittable.* JAMA, 2019. **321**(5): p. 451-452.
10. in *Retroviruses*, J.M. Coffin, S.H. Hughes, and H.E. Varmus, Editors. 1997, Cold Spring Harbor Laboratory Press Copyright © 1997, Cold Spring Harbor Laboratory Press.: Cold Spring Harbor (NY).
11. Kannangai, R., S. David, and G. Sridharan, *Human immunodeficiency virus type-2-A milder, kinder virus: an update.* Indian J Med Microbiol, 2012. **30**(1): p. 6-15.
12. 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.
13. Keele, B.F., et al., *Chimpanzee reservoirs of pandemic and nonpandemic HIV-1.* Science, 2006. **313**(5786): p. 523-6.
14. Gao, F., et al., *Origin of HIV-1 in the chimpanzee Pan troglodytes troglodytes.* Nature, 1999. **397**(6718): p. 436-41.
15. 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.
16. Malim, M.H. and M. Emerman, *HIV-1 accessory proteins--ensuring viral survival in a hostile environment.* Cell Host Microbe, 2008. **3**(6): p. 388-98.
17. Kingsman, S.M. and A.J. Kingsman, *The regulation of human immunodeficiency virus type-1 gene expression.* Eur J Biochem, 1996. **240**(3): p. 491-507.
18. Dalgleish, A.G., et al., *The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus.* Nature, 1984. **312**(5996): p. 763-7.
19. Ganor, Y., et al., *HIV-1 reservoirs in urethral macrophages of patients under suppressive antiretroviral therapy.* Nat Microbiol, 2019. **4**(4): p. 633-644.
20. Oberlin, E., et al., *The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1.* Nature, 1996. **382**(6594): p. 833-5.

21. Deng, H., et al., *Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1*. Nature, 1996. **381**(6584): p. 661-6.
22. Doranz, B.J., et al., *A dual-tropic primary HIV-1 isolate that uses fusin and the beta-chemokine receptors CKR-5, CKR-3, and CKR-2b as fusion cofactors*. Cell, 1996. **85**(7): p. 1149-58.
23. Hu, W.S. and S.H. Hughes, *HIV-1 reverse transcription*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2012. **2**(10).
24. Selyutina, A., et al., *Nuclear Import of the HIV-1 Core Precedes Reverse Transcription and Uncoating*. Cell Rep, 2020. **32**(13): p. 108201.
25. Zila, V., et al., *Cone-shaped HIV-1 capsids are transported through intact nuclear pores*. Cell, 2021. **184**(4): p. 1032-1046 e18.
26. Rensen, E., et al., *Clustering and reverse transcription of HIV-1 genomes in nuclear niches of macrophages*. EMBO J, 2021. **40**(1): p. e105247.
27. 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.
28. Engelman, A. and P. Cherepanov, *The structural biology of HIV-1: mechanistic and therapeutic insights*. Nat Rev Microbiol, 2012. **10**(4): p. 279-90.
29. Peterlin, B.M. and D.H. Price, *Controlling the elongation phase of transcription with P-TEFb*. Mol Cell, 2006. **23**(3): p. 297-305.
30. Kleinpeter, A.B. and E.O. Freed, *HIV-1 Maturation: Lessons Learned from Inhibitors*. Viruses, 2020. **12**(9).
31. Rein, A., *RNA Packaging in HIV*. Trends Microbiol, 2019. **27**(8): p. 715-723.
32. Sundquist, W.I. and H.G. Krausslich, *HIV-1 assembly, budding, and maturation*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2012. **2**(7): p. a006924.
33. Pornillos, O., B.K. Ganser-Pornillos, and M. Yeager, *Atomic-level modelling of the HIV capsid*. Nature, 2011. **469**(7330): p. 424-7.
34. Freed, E.O., *HIV-1 assembly, release and maturation*. Nat Rev Microbiol, 2015. **13**(8): p. 484-96.
35. Maartens, G., C. Celum, and S.R. Lewin, *HIV infection: epidemiology, pathogenesis, treatment, and prevention*. Lancet, 2014. **384**(9939): p. 258-71.
36. 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.
37. Schacker, T., et al., *Rapid accumulation of human immunodeficiency virus (HIV) in lymphatic tissue reservoirs during acute and early HIV infection: implications for timing of antiretroviral therapy*. J Infect Dis, 2000. **181**(1): p. 354-7.
38. Hofer, U. and R.F. Speck, *Disturbance of the gut-associated lymphoid tissue is associated with disease progression in chronic HIV infection*. Semin Immunopathol, 2009. **31**(2): p. 257-66.
39. Cohen, M.S., et al., *Acute HIV-1 Infection*. N Engl J Med, 2011. **364**(20): p. 1943-54.
40. Fiebig, E.W., et al., *Dynamics of HIV viremia and antibody seroconversion in plasma donors: implications for diagnosis and staging of primary HIV infection*. AIDS, 2003. **17**(13): p. 1871-9.
41. Krebs, S.J. and J. Ananworanich, *Immune activation during acute HIV infection and the impact of early antiretroviral therapy*. Curr Opin HIV AIDS, 2016. **11**(2): p. 163-72.
42. Buttò, S., et al., *Suggested strategies for the laboratory diagnosis of HIV infection in Italy*. Ann Ist Super Sanita, 2010. **46**(1): p. 34-41.

43. Kahn, J.O. and B.D. Walker, *Acute Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection*. New England Journal of Medicine, 1998. **339**(1): p. 33-39.
44. Vanhems, P., et al., *Severity and prognosis of acute human immunodeficiency virus type 1 illness: a dose-response relationship*. Clin Infect Dis, 1998. **26**(2): p. 323-9.
45. Keet, I.P., et al., *Predictors of rapid progression to AIDS in HIV-1 seroconverters*. Aids, 1993. **7**(1): p. 51-7.
46. Ford, E.S., C.E. Purotonen, and I. Sereti, *Immunopathogenesis of asymptomatic chronic HIV Infection: the calm before the storm*. Curr Opin HIV AIDS, 2009. **4**(3): p. 206-14.
47. Stamatatos, L., et al., *Neutralizing antibodies generated during natural HIV-1 infection: good news for an HIV-1 vaccine?* Nat Med, 2009. **15**(8): p. 866-70.
48. Forthal, D.N. and A. Finzi, *Antibody-dependent cellular cytotoxicity in HIV infection*. AIDS (London, England), 2018. **32**(17): p. 2439-2451.
49. Sengupta, S. and R.F. Siliciano, *Targeting the Latent Reservoir for HIV-1*. Immunity, 2018. **48**(5): p. 872-895.
50. 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.
51. Rustagi, A. and M. Gale, Jr., *Innate antiviral immune signaling, viral evasion and modulation by HIV-1*. J Mol Biol, 2014. **426**(6): p. 1161-77.
52. Altfeld, M. and M. Gale, Jr., *Innate immunity against HIV-1 infection*. Nat Immunol, 2015. **16**(6): p. 554-62.
53. Iwasaki, A. and R. Medzhitov, *Regulation of adaptive immunity by the innate immune system*. Science, 2010. **327**(5963): p. 291-5.
54. Loo, Y.M. and M. Gale, Jr., *Immune signaling by RIG-I-like receptors*. Immunity, 2011. **34**(5): p. 680-92.
55. Kawai, T. and S. Akira, *The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors*. Nat Immunol, 2010. **11**(5): p. 373-84.
56. Akira, S., S. Uematsu, and O. Takeuchi, *Pathogen recognition and innate immunity*. Cell, 2006. **124**(4): p. 783-801.
57. Jakobsen, M.R., et al., *IFI16 senses DNA forms of the lentiviral replication cycle and controls HIV-1 replication*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(48): p. E4571-80.
58. Gao, D., et al., *Cyclic GMP-AMP synthase is an innate immune sensor of HIV and other retroviruses*. Science, 2013. **341**(6148): p. 903-6.
59. Nazli, A., et al., *HIV-1 gp120 induces TLR2- and TLR4-mediated innate immune activation in human female genital epithelium*. J Immunol, 2013. **191**(8): p. 4246-58.
60. Schlaepfer, E., et al., *TLR7/8 triggering exerts opposing effects in acute versus latent HIV infection*. J Immunol, 2006. **176**(5): p. 2888-95.
61. Berg, R.K., et al., *Genomic HIV RNA induces innate immune responses through RIG-I-dependent sensing of secondary-structured RNA*. PLoS One, 2012. **7**(1): p. e29291.
62. Schoggins, J.W., et al., *A diverse range of gene products are effectors of the type I interferon antiviral response*. Nature, 2011. **472**(7344): p. 481-5.
63. Stetson, D.B. and R. Medzhitov, *Type I interferons in host defense*. Immunity, 2006. **25**(3): p. 373-81.
64. Perez-Caballero, D., et al., *Tetherin inhibits HIV-1 release by directly tethering virions to cells*. Cell, 2009. **139**(3): p. 499-511.

65. Neil, S.J., T. Zang, and P.D. Bieniasz, *Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu*. *Nature*, 2008. **451**(7177): p. 425-30.
66. Hotter, D., D. Sauter, and F. Kirchhoff, *Emerging role of the host restriction factor tetherin in viral immune sensing*. *J Mol Biol*, 2013. **425**(24): p. 4956-64.
67. Monroe, K.M., et al., *IFIH6 DNA sensor is required for death of lymphoid CD4 T cells abortively infected with HIV*. *Science*, 2014. **343**(6169): p. 428-32.
68. Chang, J.J. and M. Altfeld, *Innate immune activation in primary HIV-1 infection*. *J Infect Dis*, 2010. **202 Suppl 2**: p. S297-301.
69. Tomescu, C., et al., *NK cell lysis of HIV-1-infected autologous CD4 primary T cells: requirement for IFN-mediated NK activation by plasmacytoid dendritic cells*. *J Immunol*, 2007. **179**(4): p. 2097-104.
70. 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.
71. Florez-Alvarez, L., J.C. Hernandez, and W. Zapata, *NK Cells in HIV-1 Infection: From Basic Science to Vaccine Strategies*. *Front Immunol*, 2018. **9**: p. 2290.
72. Kazer, S.W., B.D. Walker, and A.K. Shalek, *Evolution and Diversity of Immune Responses during Acute HIV Infection*. *Immunity*, 2020. **53**(5): p. 908-924.
73. Kardava, L., et al., *Abnormal B cell memory subsets dominate HIV-specific responses in infected individuals*. *J Clin Invest*, 2014. **124**(7): p. 3252-62.
74. Tomaras, G.D., et al., *Initial B-cell responses to transmitted human immunodeficiency virus type 1: virion-binding immunoglobulin M (IgM) and IgG antibodies followed by plasma anti-gp41 antibodies with ineffective control of initial viremia*. *J Virol*, 2008. **82**(24): p. 12449-63.
75. Arthos, J., et al., *HIV-1 envelope protein binds to and signals through integrin alpha4beta7, the gut mucosal homing receptor for peripheral T cells*. *Nat Immunol*, 2008. **9**(3): p. 301-9.
76. Lu, X., et al., *Preferential loss of gut-homing alpha4beta7 CD4(+) T cells and their circulating functional subsets in acute HIV-1 infection*. *Cell Mol Immunol*, 2016. **13**(6): p. 776-784.
77. Yue, F.Y., et al., *Virus-specific interleukin-17-producing CD4+ T cells are detectable in early human immunodeficiency virus type 1 infection*. *J Virol*, 2008. **82**(13): p. 6767-71.
78. Demers, K.R., et al., *Temporal Dynamics of CD8+ T Cell Effector Responses during Primary HIV Infection*. *PLoS Pathog*, 2016. **12**(8): p. e1005805.
79. Ndhlovu, Z.M., et al., *Magnitude and Kinetics of CD8+ T Cell Activation during Hyperacute HIV Infection Impact Viral Set Point*. *Immunity*, 2015. **43**(3): p. 591-604.
80. Takata, H., et al., *Delayed differentiation of potent effector CD8(+) T cells reducing viremia and reservoir seeding in acute HIV infection*. *Sci Transl Med*, 2017. **9**(377).
81. Migueles, S.A., et al., *Lytic granule loading of CD8+ T cells is required for HIV-infected cell elimination associated with immune control*. *Immunity*, 2008. **29**(6): p. 1009-21.
82. Migueles, S.A. and M. Connors, *Success and failure of the cellular immune response against HIV-1*. *Nat Immunol*, 2015. **16**(6): p. 563-70.
83. Kessing, C.F., et al., *High Number of Activated CD8+ T Cells Targeting HIV Antigens Are Present in Cerebrospinal Fluid in Acute HIV Infection*. *JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, 2017. **75**(1).

84. Fukazawa, Y., et al., *B cell follicle sanctuary permits persistent productive simian immunodeficiency virus infection in elite controllers*. Nat Med, 2015. **21**(2): p. 132-9.
85. Li, S., et al., *Low levels of SIV-specific CD8+ T cells in germinal centers characterizes acute SIV infection*. PLoS Pathog, 2019. **15**(3): p. e1007311.
86. Liu, J., et al., *IL-10-producing B cells are induced early in HIV-1 infection and suppress HIV-1-specific T cell responses*. PLoS One, 2014. **9**(2): p. e89236.
87. Brockman, M.A., et al., *IL-10 is up-regulated in multiple cell types during viremic HIV infection and reversibly inhibits virus-specific T cells*. Blood, 2009. **114**(2): p. 346-56.
88. Eller, M.A., et al., *Expansion of Inefficient HIV-Specific CD8 T Cells during Acute Infection*. J Virol, 2016. **90**(8): p. 4005-4016.
89. McDonald, D., et al., *Recruitment of HIV and its receptors to dendritic cell-T cell junctions*. Science, 2003. **300**(5623): p. 1295-7.
90. Borrow, P. and N. Bhardwaj, *Innate immune responses in primary HIV-1 infection*. Curr Opin HIV AIDS, 2008. **3**(1): p. 36-44.
91. Flexner, C., et al., *Long-acting drugs and formulations for the treatment and prevention of HIV infection*. Int J Antimicrob Agents, 2021. **57**(1): p. 106220.
92. 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.
93. Davey, R.T., Jr., et al., *HIV-1 and T cell dynamics after interruption of highly active antiretroviral therapy (HAART) in patients with a history of sustained viral suppression*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(26): p. 15109-14.
94. Chun, T.W., et al., *Re-emergence of HIV after stopping therapy*. Nature, 1999. **401**(6756): p. 874-5.
95. Abdel-Mohsen, M., et al., *Recommendations for measuring HIV reservoir size in cure-directed clinical trials*. Nat Med, 2020. **26**(9): p. 1339-1350.
96. Bruner, K.M., et al., *Defective proviruses rapidly accumulate during acute HIV-1 infection*. Nat Med, 2016. **22**(9): p. 1043-9.
97. Bruner, K.M., et al., *A quantitative approach for measuring the reservoir of latent HIV-1 proviruses*. Nature, 2019. **566**(7742): p. 120-125.
98. Kinloch, N.N., et al., *HIV-1 diversity considerations in the application of the Intact Proviral DNA Assay (IPDA)*. Nat Commun, 2021. **12**(1): p. 165.
99. Astorga-Gamaza, A. and M.J. Buzon, *The active human immunodeficiency virus reservoir during antiretroviral therapy: emerging players in viral persistence*. Curr Opin HIV AIDS, 2021. **16**(4): p. 193-199.
100. 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.
101. 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.
102. 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.
103. 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.

104. 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).
105. 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).
106. 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.
107. 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.
108. 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.
109. 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.
110. 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.
111. 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.
112. Wong, J.K., et al., *Recovery of replication-competent HIV despite prolonged suppression of plasma viremia*. Science, 1997. **278**(5341): p. 1291-5.
113. 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.
114. 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.
115. Fromentin, R. and N. Chomont, *HIV persistence in subsets of CD4+ T cells: 50 shades of reservoirs*. Semin Immunol, 2020: p. 101438.
116. 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.
117. De Boer, R.J. and A.S. Perelson, *Quantifying T lymphocyte turnover*. J Theor Biol, 2013. **327**: p. 45-87.
118. 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.
119. Wonderlich, E.R., et al., *Effector memory differentiation increases detection of replication-competent HIV-1 in resting CD4+ T cells from virally suppressed individuals*. PLoS Pathog, 2019. **15**(10): p. e1008074.
120. Musick, A., et al., *HIV Infected T Cells Can Proliferate in vivo Without Inducing Expression of the Integrated Provirus*. Front Microbiol, 2019. **10**: p. 2204.
121. De Scheerder, M.A., et al., *HIV Rebound Is Predominantly Fueled by Genetically Identical Viral Expansions from Diverse Reservoirs*. Cell Host Microbe, 2019. **26**(3): p. 347-358 e7.
122. Turner, D.L. and D.L. Farber, *Mucosal resident memory CD4 T cells in protection and immunopathology*. Front Immunol, 2014. **5**: p. 331.
123. Kumar, B.V., et al., *Human Tissue-Resident Memory T Cells Are Defined by Core Transcriptional and Functional Signatures in Lymphoid and Mucosal Sites*. Cell Rep, 2017. **20**(12): p. 2921-2934.

124. Cauley, L.S. and L. Lefrancois, *Guarding the perimeter: protection of the mucosa by tissue-resident memory T cells*. Mucosal Immunol, 2013. **6**(1): p. 14-23.
125. 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.
126. Sallusto, F., *Heterogeneity of Human CD4(+) T Cells Against Microbes*. Annu Rev Immunol, 2016. **34**: p. 317-34.
127. 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.
128. Lu, Y., et al., *Th9 cells promote antitumor immune responses in vivo*. J Clin Invest, 2012. **122**(11): p. 4160-71.
129. Orlova-Fink, N., et al., *Preferential susceptibility of Th9 and Th2 CD4+ T cells to X4-tropic HIV-1 infection*. AIDS, 2017. **31**(16): p. 2211-2215.
130. Karmaus, P.W.F., et al., *Metabolic heterogeneity underlies reciprocal fates of TH17 cell stemness and plasticity*. Nature, 2019. **565**(7737): p. 101-105.
131. Muranski, P., et al., *Th17 cells are long lived and retain a stem cell-like molecular signature*. Immunity, 2011. **35**(6): p. 972-85.
132. 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.
133. 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.
134. 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.
135. 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.
136. 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.
137. Crotty, S., *T Follicular Helper Cell Biology: A Decade of Discovery and Diseases*. Immunity, 2019. **50**(5): p. 1132-1148.
138. Locci, M., et al., *Human circulating PD-1+CXCR3-CXCR5+ memory Tfh cells are highly functional and correlate with broadly neutralizing HIV antibody responses*. Immunity, 2013. **39**(4): p. 758-69.
139. 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.
140. Nicholson, J.K., et al., *CCR5 and CXCR4 expression on memory and naive T cells in HIV-1 infection and response to highly active antiretroviral therapy*. J Acquir Immune Defic Syndr, 2001. **27**(2): p. 105-15.
141. Venanzi Rullo, E., et al., *Persistence of an intact HIV reservoir in phenotypically naive T cells*. JCI Insight, 2020. **5**(20).
142. 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.
143. Ostrowski, M.A., et al., *Both memory and CD45RA+/CD62L+ naive CD4(+) T cells are infected in human immunodeficiency virus type 1-infected individuals*. J Virol, 1999. **73**(8): p. 6430-5.

144. Wightman, F., et al., *Both CD31(+) and CD31(-) naive CD4(+) T cells are persistent HIV type 1-infected reservoirs in individuals receiving antiretroviral therapy*. J Infect Dis, 2010. **202**(11): p. 1738-48.
145. Dai, J., et al., *Human immunodeficiency virus integrates directly into naive resting CD4+ T cells but enters naive cells less efficiently than memory cells*. J Virol, 2009. **83**(9): p. 4528-37.
146. Vriskoop, N., et al., *Sparse production but preferential incorporation of recently produced naive T cells in the human peripheral pool*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(16): p. 6115-20.
147. Hendricks, C.M., et al., *The Interplay of HIV-1 and Macrophages in Viral Persistence*. Front Microbiol, 2021. **12**: p. 646447.
148. Coleman, C.M. and L. Wu, *HIV interactions with monocytes and dendritic cells: viral latency and reservoirs*. Retrovirology, 2009. **6**: p. 51.
149. Marban, C., et al., *Targeting the Brain Reservoirs: Toward an HIV Cure*. Front Immunol, 2016. **7**: p. 397.
150. Andrade, V.M., et al., *A minor population of macrophage-tropic HIV-1 variants is identified in recrudescing viremia following analytic treatment interruption*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2020. **117**(18): p. 9981-9990.
151. Cribbs, S.K., et al., *Healthy HIV-1-infected individuals on highly active antiretroviral therapy harbor HIV-1 in their alveolar macrophages*. AIDS Res Hum Retroviruses, 2015. **31**(1): p. 64-70.
152. 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.
153. Di Mascio, M., et al., *Noninvasive in vivo imaging of CD4 cells in simian-human immunodeficiency virus (SHIV)-infected nonhuman primates*. Blood, 2009. **114**(2): p. 328-37.
154. 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.
155. Yukl, S.A., et al., *Differences in HIV burden and immune activation within the gut of HIV-positive patients receiving suppressive antiretroviral therapy*. J Infect Dis, 2010. **202**(10): p. 1553-61.
156. Wong, J.K. and S.A. Yukl, *Tissue reservoirs of HIV*. Curr Opin HIV AIDS, 2016. **11**(4): p. 362-70.
157. Chaillon, A., et al., *HIV persists throughout deep tissues with repopulation from multiple anatomical sources*. J Clin Invest, 2020. **130**(4): p. 1699-1712.
158. Sanchez, G., et al., *Accumulation of defective viral genomes in peripheral blood mononuclear cells of human immunodeficiency virus type 1-infected individuals*. J Virol, 1997. **71**(3): p. 2233-40.
159. 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.
160. Ishizaka, A., et al., *Short Intracellular HIV-1 Transcripts as Biomarkers of Residual Immune Activation in Patients on Antiretroviral Therapy*. J Virol, 2016. **90**(12): p. 5665-5676.
161. Imamichi, H., et al., *Defective HIV-1 proviruses produce novel protein-coding RNA species in HIV-infected patients on combination antiretroviral therapy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2016. **113**(31): p. 8783-8.
162. 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.

163. Rothenberger, M.K., et al., *Large number of rebounding/founder HIV variants emerge from multifocal infection in lymphatic tissues after treatment interruption*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015. **112**(10): p. E1126-34.
164. Folkvord, J.M., C. Armon, and E. Connick, *Lymphoid follicles are sites of heightened human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) replication and reduced antiretroviral effector mechanisms*. AIDS Res Hum Retroviruses, 2005. **21**(5): p. 363-70.
165. 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.
166. 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.
167. Deleage, C., et al., *Defining HIV and SIV Reservoirs in Lymphoid Tissues*. Pathog Immun, 2016. **1**(1): p. 68-106.
168. Miller, S.M., et al., *Follicular Regulatory T Cells Are Highly Permissive to R5-Tropic HIV-1*. J Virol, 2017. **91**(17).
169. 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.
170. Keele, B.F., et al., *Characterization of the follicular dendritic cell reservoir of human immunodeficiency virus type 1*. J Virol, 2008. **82**(11): p. 5548-61.
171. Smith, B.A., et al., *Persistence of infectious HIV on follicular dendritic cells*. J Immunol, 2001. **166**(1): p. 690-6.
172. Heath, S.L., et al., *Follicular dendritic cells and human immunodeficiency virus infectivity*. Nature, 1995. **377**(6551): p. 740-4.
173. 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.
174. Leong, Y.A., et al., *CXCR5(+) follicular cytotoxic T cells control viral infection in B cell follicles*. Nat Immunol, 2016. **17**(10): p. 1187-96.
175. Li, S., et al., *Simian Immunodeficiency Virus-Producing Cells in Follicles Are Partially Suppressed by CD8+ Cells In Vivo*. J Virol, 2016. **90**(24): p. 11168-11180.
176. Miles, B., et al., *Follicular Regulatory CD8 T Cells Impair the Germinal Center Response in SIV and Ex Vivo HIV Infection*. PLoS Pathog, 2016. **12**(10): p. e1005924.
177. Petrovas, C., et al., *Follicular CD8 T cells accumulate in HIV infection and can kill infected cells in vitro via bispecific antibodies*. Sci Transl Med, 2017. **9**(373).
178. 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.
179. Dobbins, W.O., 3rd, *Human intestinal intraepithelial lymphocytes*. Gut, 1986. **27**(8): p. 972-85.
180. Mowat, A.M. and J.L. Viney, *The anatomical basis of intestinal immunity*. Immunol Rev, 1997. **156**: p. 145-66.
181. 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.
182. 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.

183. 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.
184. Yukl, S.A., et al., *A comparison of methods for measuring rectal HIV levels suggests that HIV DNA resides in cells other than CD4+ T cells, including myeloid cells*. AIDS, 2014. **28**(3): p. 439-42.
185. Belmonte, L., et al., *The intestinal mucosa as a reservoir of HIV-1 infection after successful HAART*. Aids, 2007. **21**(15): p. 2106-8.
186. Zalar, A., et al., *Macrophage HIV-1 infection in duodenal tissue of patients on long term HAART*. Antiviral Res, 2010. **87**(2): p. 269-71.
187. 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.
188. Ellis, R.J., et al., *Cerebrospinal fluid HIV RNA originates from both local CNS and systemic sources*. Neurology, 2000. **54**(4): p. 927-36.
189. Spudich, S., et al., *Treatment benefit on cerebrospinal fluid HIV-1 levels in the setting of systemic virological suppression and failure*. J Infect Dis, 2006. **194**(12): p. 1686-96.
190. 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*. Journal of NeuroVirology, 2007. **13**(3): p. 210-224.
191. Smit, T.K., et al., *Independent evolution of human immunodeficiency virus (HIV) drug resistance mutations in diverse areas of the brain in HIV-infected patients, with and without dementia, on antiretroviral treatment*. J Virol, 2004. **78**(18): p. 10133-48.
192. 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.
193. Canestri, A., et al., *Discordance Between Cerebral Spinal Fluid and Plasma HIV Replication in Patients with Neurological Symptoms Who Are Receiving Suppressive Antiretroviral Therapy*. Clinical Infectious Diseases, 2010. **50**(5): p. 773-778.
194. Bingham, R., et al., *HIV encephalitis despite suppressed viraemia: a case of compartmentalized viral escape*. Int J STD AIDS, 2011. **22**(10): p. 608-9.
195. Peluso, M.J., et al., *Cerebrospinal fluid HIV escape associated with progressive neurologic dysfunction in patients on antiretroviral therapy with well controlled plasma viral load*. AIDS, 2012. **26**(14): p. 1765-1774.
196. 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.
197. Biswas, P., et al., *CD30 ligation differentially affects CXCR4-dependent HIV-1 replication and soluble CD30 secretion in non-Hodgkin cell lines and in gamma delta T lymphocytes*. Eur J Immunol, 2003. **33**(11): p. 3136-45.
198. Hogan, L.E., et al., *Increased HIV-1 transcriptional activity and infectious burden in peripheral blood and gut-associated CD4+ T cells expressing CD30*. PLoS Pathog, 2018. **14**(2): p. e1006856.
199. Prator, C.A., et al., *Circulating CD30+CD4+ T Cells Increase Before Human Immunodeficiency Virus Rebound After Analytical Antiretroviral Treatment Interruption*. The Journal of Infectious Diseases, 2019. **221**(7): p. 1146-1155.
200. Anania, J.C., et al., *The Human FcγRII (CD32) Family of Leukocyte FcR in Health and Disease*. Front Immunol, 2019. **10**: p. 464.

201. 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).
202. Darcis, G., et al., *CD32(+)CD4(+) T Cells Are Highly Enriched for HIV DNA and Can Support Transcriptional Latency*. *Cell Rep*, 2020. **30**(7): p. 2284-2296 e3.
203. 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.
204. Noto, A., et al., *CD32(+) and PD-1(+) Lymph Node CD4 T Cells Support Persistent HIV-1 Transcription in Treated Aviremic Individuals*. *J Virol*, 2018. **92**(20).
205. Vasquez, J.J., et al., *CD32-RNA Co-localizes with HIV-RNA in CD3+ Cells Found within Gut Tissues from Viremic and ART-Suppressed Individuals*. *Pathog Immun*, 2019. **4**(1): p. 147-160.
206. Piatak, M., Jr., et al., *High levels of HIV-1 in plasma during all stages of infection determined by competitive PCR*. *Science*, 1993. **259**(5102): p. 1749-54.
207. Shan, L., et al., *Transcriptional Reprogramming during Effector-to-Memory Transition Renders CD4(+) T Cells Permissive for Latent HIV-1 Infection*. *Immunity*, 2017. **47**(4): p. 766-775 e3.
208. Snook, J.P., C. Kim, and M.A. Williams, *TCR signal strength controls the differentiation of CD4(+) effector and memory T cells*. *Sci Immunol*, 2018. **3**(25).
209. Gagne, M., et al., *Strength of T cell signaling regulates HIV-1 replication and establishment of latency*. *PLoS Pathog*, 2019. **15**(5): p. e1007802.
210. Abrahams, M.-R., et al., *The replication-competent HIV-1 latent reservoir is primarily established near the time of therapy initiation*. *Science Translational Medicine*, 2019. **11**(513): p. eaaw5589.
211. Zack, J.A., et al., *HIV-1 entry into quiescent primary lymphocytes: molecular analysis reveals a labile, latent viral structure*. *Cell*, 1990. **61**(2): p. 213-22.
212. Baldauf, H.-M., et al., *SAMHD1 restricts HIV-1 infection in resting CD4+ T cells*. *Nature Medicine*, 2012. **18**(11): p. 1682-1688.
213. Descours, B., et al., *SAMHD1 restricts HIV-1 reverse transcription in quiescent CD4(+) T-cells*. *Retrovirology*, 2012. **9**: p. 87.
214. Cameron, P.U., et al., *Establishment of HIV-1 latency in resting CD4⁺ T cells depends on chemokine-induced changes in the actin cytoskeleton*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2010. **107**(39): p. 16934-16939.
215. Kulpa, D.A., et al., *Differentiation into an Effector Memory Phenotype Potentiates HIV-1 Latency Reversal in CD4⁺ T Cells*. *Journal of Virology*, 2019. **93**(24): p. e00969-19.
216. Pace, M.J., et al., *Directly infected resting CD4+T cells can produce HIV Gag without spreading infection in a model of HIV latency*. *PLoS Pathog*, 2012. **8**(7): p. e1002818.
217. Coiras, M., et al., *IL-7 Induces SAMHD1 Phosphorylation in CD4+ T Lymphocytes, Improving Early Steps of HIV-1 Life Cycle*. *Cell Rep*, 2016. **14**(9): p. 2100-2107.
218. Hsiao, F., et al., *Tissue memory CD4+ T cells expressing IL-7 receptor-alpha (CD127) preferentially support latent HIV-1 infection*. *PLoS Pathog*, 2020. **16**(4): p. e1008450.
219. Romani, B. and E. Allahbakhshi, *Underlying mechanisms of HIV-1 latency*. *Virus Genes*, 2017. **53**(3): p. 329-339.

220. Jiang, C., et al., *Distinct viral reservoirs in individuals with spontaneous control of HIV-1*. Nature, 2020. **585**(7824): p. 261-267.
221. Festenstein, R., et al., *Modulation of Heterochromatin Protein 1 Dynamics in Primary Mammalian Cells*. Science, 2003. **299**(5607): p. 719-721.
222. Han, Y., et al., *Orientation-dependent regulation of integrated HIV-1 expression by host gene transcriptional readthrough*. Cell Host Microbe, 2008. **4**(2): p. 134-46.
223. 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.
224. Cary, D.C., K. Fujinaga, and B.M. Peterlin, *Molecular mechanisms of HIV latency*. The Journal of Clinical Investigation, 2016. **126**(2): p. 448-454.
225. Blazkova, J., et al., *CpG Methylation Controls Reactivation of HIV from Latency*. PLOS Pathogens, 2009. **5**(8): p. e1000554.
226. Kauder, S.E., et al., *Epigenetic regulation of HIV-1 latency by cytosine methylation*. PLoS Pathog, 2009. **5**(6): p. e1000495.
227. Lusic, M., et al., *Regulation of HIV-1 gene expression by histone acetylation and factor recruitment at the LTR promoter*. EMBO J, 2003. **22**(24): p. 6550-61.
228. Li, Z., et al., *The KAT5-Acetyl-Histone4-Brd4 axis silences HIV-1 transcription and promotes viral latency*. PLOS Pathogens, 2018. **14**(4): p. e1007012.
229. 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.
230. Ne, E., R.-J. Palstra, and T. Mahmoudi, *Chapter Six - Transcription: Insights From the HIV-1 Promoter*, in *International Review of Cell and Molecular Biology*, F. Loos, Editor. 2018, Academic Press. p. 191-243.
231. McManus, W.R., et al., *HIV-1 in lymph nodes is maintained by cellular proliferation during antiretroviral therapy*. J Clin Invest, 2019. **129**(11): p. 4629-4642.
232. Wiegand, A., et al., *Single-cell analysis of HIV-1 transcriptional activity reveals expression of proviruses in expanded clones during ART*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2017. **114**(18): p. E3659-E3668.
233. DeMaster, L.K., et al., *A Subset of CD4/CD8 Double-Negative T Cells Expresses HIV Proteins in Patients on Antiretroviral Therapy*. J Virol, 2015. **90**(5): p. 2165-79.
234. Hermankova, M., et al., *Analysis of human immunodeficiency virus type 1 gene expression in latently infected resting CD4+ T lymphocytes in vivo*. J Virol, 2003. **77**(13): p. 7383-92.
235. Kearney, M.F., et al., *Origin of Rebound Plasma HIV Includes Cells with Identical Proviruses That Are Transcriptionally Active before Stopping of Antiretroviral Therapy*. J Virol, 2016. **90**(3): p. 1369-76.
236. Wagner, T.A., et al., *Proliferation of cells with HIV integrated into cancer genes contributes to persistent infection*. Science, 2014. **345**(6196): p. 570-573.
237. Maldarelli, F., et al., *Specific HIV integration sites are linked to clonal expansion and persistence of infected cells*. Science, 2014. **345**(6193): p. 179-183.
238. Cohn, L.B., et al., *HIV-1 integration landscape during latent and active infection*. Cell, 2015. **160**(3): p. 420-32.
239. Simonetti, F.R., et al., *Clonally expanded CD4+ T cells can produce infectious HIV-1 in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2016. **113**(7): p. 1883-8.

240. Hosmane, N.N., et al., *Proliferation of latently infected CD4+ T cells carrying replication-competent HIV-1: Potential role in latent reservoir dynamics*. Journal of Experimental Medicine, 2017. **214**(4): p. 959-972.
241. Henrich, T.J., et al., *Human Immunodeficiency Virus Type 1 Persistence Following Systemic Chemotherapy for Malignancy*. The Journal of Infectious Diseases, 2017. **216**(2): p. 254-262.
242. Lorenzi, J.C.C., et al., *Paired quantitative and qualitative assessment of the replication-competent HIV-1 reservoir and comparison with integrated proviral DNA*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2016. **113**(49): p. E7908-E7916.
243. Bui, J.K., et al., *Provirus with identical sequences comprise a large fraction of the replication-competent HIV reservoir*. PLOS Pathogens, 2017. **13**(3): p. e1006283.
244. 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.
245. Lorenzo-Redondo, R., et al., *Persistent HIV-1 replication maintains the tissue reservoir during therapy*. Nature, 2016. **530**(7588): p. 51-56.
246. 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.
247. 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.
248. Dornadula, G., et al., *Residual HIV-1 RNA in blood plasma of patients taking suppressive highly active antiretroviral therapy*. JAMA, 1999. **282**(17): p. 1627-32.
249. Frenkel, L.M., et al., *Multiple viral genetic analyses detect low-level human immunodeficiency virus type 1 replication during effective highly active antiretroviral therapy*. J Virol, 2003. **77**(10): p. 5721-30.
250. Halvas, E.K., et al., *HIV-1 viremia not suppressible by antiretroviral therapy can originate from large T cell clones producing infectious virus*. J Clin Invest, 2020. **130**(11): p. 5847-5857.
251. Dinoso, J.B., et al., *Treatment intensification does not reduce residual HIV-1 viremia in patients on highly active antiretroviral therapy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(23): p. 9403-8.
252. 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).
253. Kieffer, T.L., et al., *Genotypic analysis of HIV-1 drug resistance at the limit of detection: virus production without evolution in treated adults with undetectable HIV loads*. J Infect Dis, 2004. **189**(8): p. 1452-65.
254. Sedaghat, A.R., et al., *Limits on replenishment of the resting CD4+ T cell reservoir for HIV in patients on HAART*. PLoS Pathog, 2007. **3**(8): p. e122.
255. Kearney, M.F., et al., *Lack of detectable HIV-1 molecular evolution during suppressive antiretroviral therapy*. PLoS Pathog, 2014. **10**(3): p. e1004010.
256. Josefsson, L., et al., *The HIV-1 reservoir in eight patients on long-term suppressive antiretroviral therapy is stable with few genetic changes over time*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(51): p. E4987-96.
257. Walker, B. and A. McMichael, *The T-cell response to HIV*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2012. **2**(11).

258. Deng, K., et al., *Broad CTL response is required to clear latent HIV-1 due to dominance of escape mutations*. Nature, 2015. **517**(7534): p. 381-5.
259. Pitcher, C.J., et al., *HIV-1-specific CD4+ T cells are detectable in most individuals with active HIV-1 infection, but decline with prolonged viral suppression*. Nat Med, 1999. **5**(5): p. 518-25.
260. Streeck, H., et al., *Antigen load and viral sequence diversification determine the functional profile of HIV-1-specific CD8+ T cells*. PLoS Med, 2008. **5**(5): p. e100.
261. 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.
262. Kahan, S.M., E.J. Wherry, and A.J. Zajac, *T cell exhaustion during persistent viral infections*. Virology, 2015. **479-480**: p. 180-93.
263. Nabatanzi, R., et al., *Aberrant natural killer (NK) cell activation and dysfunction among ART-treated HIV-infected adults in an African cohort*. Clin Immunol, 2019. **201**: p. 55-60.
264. Lichtfuss, G.F., et al., *Virologically suppressed HIV patients show activation of NK cells and persistent innate immune activation*. J Immunol, 2012. **189**(3): p. 1491-9.
265. Huang, S.-H., et al., *Have Cells Harboring the HIV Reservoir Been Immunoedited?* Frontiers in immunology, 2019. **10**: p. 1842-1842.
266. Ren, Y., et al., *BCL-2 antagonism sensitizes cytotoxic T cell-resistant HIV reservoirs to elimination ex vivo*. J Clin Invest, 2020. **130**(5): p. 2542-2559.
267. Archin, N.M., et al., *Eradicating HIV-1 infection: seeking to clear a persistent pathogen*. Nat Rev Microbiol, 2014. **12**(11): p. 750-64.
268. Kulkosky, J., et al., *Intensification and stimulation therapy for human immunodeficiency virus type 1 reservoirs in infected persons receiving virally suppressive highly active antiretroviral therapy*. J Infect Dis, 2002. **186**(10): p. 1403-11.
269. 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).
270. Ait-Ammar, A., et al., *Current Status of Latency Reversing Agents Facing the Heterogeneity of HIV-1 Cellular and Tissue Reservoirs*. Front Microbiol, 2019. **10**: p. 3060.
271. Archin, N.M., et al., *Administration of vorinostat disrupts HIV-1 latency in patients on antiretroviral therapy*. Nature, 2012. **487**(7408): p. 482-5.
272. Sogaard, O.S., et al., *The Depsipeptide Romidepsin Reverses HIV-1 Latency In Vivo*. PLoS Pathog, 2015. **11**(9): p. e1005142.
273. 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.
274. 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.
275. 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*. The Lancet HIV, 2016. **3**(10): p. e463-e472.
276. 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.
277. 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.

278. 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.
279. Garrido, C., et al., *HIV Latency-Reversing Agents Have Diverse Effects on Natural Killer Cell Function*. Frontiers in Immunology, 2016. **7**(356).
280. Shan, L., et al., *Stimulation of HIV-1-specific cytolytic T lymphocytes facilitates elimination of latent viral reservoir after virus reactivation*. Immunity, 2012. **36**(3): p. 491-501.
281. Tapia, G., et al., *Sequential Vacc-4x and romidepsin during combination antiretroviral therapy (cART): Immune responses to Vacc-4x regions on p24 and changes in HIV reservoirs*. J Infect, 2017. **75**(6): p. 555-571.
282. 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.
283. Strack, P.R., et al., *Apoptosis mediated by HIV protease is preceded by cleavage of Bcl-2*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1996. **93**(18): p. 9571-9576.
284. Cummins, N.W., et al., *Prime, Shock, and Kill: Priming CD4 T Cells from HIV Patients with a BCL-2 Antagonist before HIV Reactivation Reduces HIV Reservoir Size*. Journal of Virology, 2016. **90**(8): p. 4032-4048.
285. Crooks, A.M., et al., *Precise Quantitation of the Latent HIV-1 Reservoir: Implications for Eradication Strategies*. The Journal of Infectious Diseases, 2015. **212**(9): p. 1361-1365.
286. Caligiuri, M.A., *Human natural killer cells*. Blood, 2008. **112**(3): p. 461-9.
287. Ferlazzo, G. and P. Carrega, *Natural killer cell distribution and trafficking in human tissues*. Frontiers in Immunology, 2012. **3**(347).
288. Kiessling, R., et al., *Killer cells: a functional comparison between natural, immune T-cell and antibody-dependent in vitro systems*. Journal of Experimental Medicine, 1976. **143**(4): p. 772-780.
289. Ljunggren, H.-G. and K. Kärre, *In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition*. Immunology Today, 1990. **11**: p. 237-244.
290. Biron, C.A., K.S. Byron, and J.L. Sullivan, *Severe Herpesvirus Infections in an Adolescent without Natural Killer Cells*. New England Journal of Medicine, 1989. **320**(26): p. 1731-1735.
291. Orange, Jordan S., *Human natural killer cell deficiencies and susceptibility to infection*. Microbes and Infection, 2002. **4**(15): p. 1545-1558.
292. Notarangelo, L.D. and E. Mazzolari, *Natural killer cell deficiencies and severe varicella infection*. J Pediatr, 2006. **148**(4): p. 563-4; author reply 564.
293. Mace, E.M., et al., *Mutations in GATA2 cause human NK cell deficiency with specific loss of the CD56bright subset*. Blood, 2013. **121**(14): p. 2669-2677.
294. Mjösberg, J. and H. Spits, *Human innate lymphoid cells*. J Allergy Clin Immunol, 2016. **138**(5): p. 1265-1276.
295. Cooper, M.A., T.A. Fehniger, and M.A. Caligiuri, *The biology of human natural killer-cell subsets*. Trends Immunol, 2001. **22**(11): p. 633-40.
296. Moretta, L., *Dissecting CD56dim human NK cells*. Blood, 2010. **116**(19): p. 3689-91.
297. Ferlazzo, G., et al., *The abundant NK cells in human secondary lymphoid tissues require activation to express killer cell Ig-like receptors and become cytolytic*. J Immunol, 2004. **172**(3): p. 1455-62.
298. Poli, A., et al., *CD56bright natural killer (NK) cells: an important NK cell subset*. Immunology, 2009. **126**(4): p. 458-465.

299. Horowitz, A., et al., *Genetic and environmental determinants of human NK cell diversity revealed by mass cytometry*. *Sci Transl Med*, 2013. **5**(208): p. 208ra145.
300. Strauss-Albee, D.M., et al., *Human NK cell repertoire diversity reflects immune experience and correlates with viral susceptibility*. *Science Translational Medicine*, 2015. **7**(297): p. 297ra115-297ra115.
301. Vivier, E., et al., *Functions of natural killer cells*. *Nat Immunol*, 2008. **9**(5): p. 503-10.
302. Vivier, E., J.A. Nunès, and F. Vély, *Natural killer cell signaling pathways*. *Science*, 2004. **306**(5701): p. 1517-9.
303. Sivori, S., et al., *Human NK cells: surface receptors, inhibitory checkpoints, and translational applications*. *Cellular & Molecular Immunology*, 2019. **16**(5): p. 430-441.
304. Arnon, T.I., G. Markel, and O. Mandelboim, *Tumor and viral recognition by natural killer cells receptors*. *Semin Cancer Biol*, 2006. **16**(5): p. 348-58.
305. Pogge von Strandmann, E., et al., *Human leukocyte antigen-B-associated transcript 3 is released from tumor cells and engages the NKp30 receptor on natural killer cells*. *Immunity*, 2007. **27**(6): p. 965-74.
306. De Maria, A., et al., *The impaired NK cell cytolytic function in viremic HIV-1 infection is associated with a reduced surface expression of natural cytotoxicity receptors (NKp46, NKp30 and NKp44)*. *Eur J Immunol*, 2003. **33**(9): p. 2410-8.
307. Bauer, S., et al., *Activation of NK Cells and T Cells by NKG2D, a Receptor for Stress-Inducible MICA*. *Science*, 1999. **285**(5428): p. 727-729.
308. Cosman, D., et al., *ULBPs, Novel MHC Class I-Related Molecules, Bind to CMV Glycoprotein UL16 and Stimulate NK Cytotoxicity through the NKG2D Receptor*. *Immunity*, 2001. **14**(2): p. 123-133.
309. Della Chiesa, M., et al., *Activating KIRs and NKG2C in Viral Infections: Toward NK Cell Memory?* *Front Immunol*, 2015. **6**: p. 573.
310. Mikelez-Alonso, I., et al., *Natural killer (NK) cell-based immunotherapies and the many faces of NK cell memory: A look into how nanoparticles enhance NK cell activity*. *Adv Drug Deliv Rev*, 2021: p. 113860.
311. Ochoa, M.C., et al., *Antibody-dependent cell cytotoxicity: immunotherapy strategies enhancing effector NK cells*. *Immunol Cell Biol*, 2017. **95**(4): p. 347-355.
312. Braud, V.M., et al., *HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C*. *Nature*, 1998. **391**(6669): p. 795-9.
313. Middleton, D. and F. Gonzelez, *The extensive polymorphism of KIR genes*. *Immunology*, 2010. **129**(1): p. 8-19.
314. Martin, M.P., et al., *Epistatic interaction between KIR3DS1 and HLA-B delays the progression to AIDS*. *Nat Genet*, 2002. **31**(4): p. 429-34.
315. Valés-Gómez, M., et al., *Kinetics and peptide dependency of the binding of the inhibitory NK receptor CD94/NKG2-A and the activating receptor CD94/NKG2-C to HLA-E*. *Embo j*, 1999. **18**(15): p. 4250-60.
316. Anfossi, N., et al., *Human NK Cell Education by Inhibitory Receptors for MHC Class I*. *Immunity*, 2006. **25**(2): p. 331-342.
317. Kim, S., et al., *Licensing of natural killer cells by host major histocompatibility complex class I molecules*. *Nature*, 2005. **436**(7051): p. 709-713.
318. Joncker, N.T., et al., *NK Cell Responsiveness Is Tuned Commensurate with the Number of Inhibitory Receptors for Self-MHC Class I: The Rheostat Model*. *The Journal of Immunology*, 2009. **182**(8): p. 4572-4580.

319. Carrington, M. and G. Alter, *Innate immune control of HIV*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2012. **2**(7): p. a007070.
320. Metkar, S.S., et al., *Cytotoxic Cell Granule-Mediated Apoptosis: Perforin Delivers Granzyme B-Serglycin Complexes into Target Cells without Plasma Membrane Pore Formation*. Immunity, 2002. **16**(3): p. 417-428.
321. Fauriat, C., et al., *Regulation of human NK-cell cytokine and chemokine production by target cell recognition*. Blood, 2010. **115**(11): p. 2167-2176.
322. Zamai, L., et al., *Natural killer (NK) cell-mediated cytotoxicity: differential use of TRAIL and Fas ligand by immature and mature primary human NK cells*. J Exp Med, 1998. **188**(12): p. 2375-80.
323. Brillantes, M. and A.M. Beaulieu, *Memory and Memory-Like NK Cell Responses to Microbial Pathogens*. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2020. **10**(102).
324. Lopez-Vergès, S., et al., *Expansion of a unique CD57⁺NKG2C^{hi} natural killer cell subset during acute human cytomegalovirus infection*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2011. **108**(36): p. 14725-14732.
325. Hammer, Q., et al., *Peptide-specific recognition of human cytomegalovirus strains controls adaptive natural killer cells*. Nature Immunology, 2018. **19**(5): p. 453-463.
326. Nikzad, R., et al., *Human natural killer cells mediate adaptive immunity to viral antigens*. Science Immunology, 2019. **4**(35): p. eaat8116.
327. Wijaya, R.S., et al., *HBV vaccination and HBV infection induces HBV-specific natural killer cell memory*. Gut, 2021. **70**(2): p. 357-369.
328. Suliman, S., et al., *Bacillus Calmette–Guérin (BCG) Revaccination of Adults with Latent *Mycobacterium tuberculosis* Infection Induces Long-Lived BCG-Reactive NK Cell Responses*. The Journal of Immunology, 2016. **197**(4): p. 1100-1110.
329. Wijaya, R.S., et al., *Hepatitis C Virus (HCV) Eradication With Interferon-Free Direct-Acting Antiviral-Based Therapy Results in KLRG1+ HCV-Specific Memory Natural Killer Cells*. The Journal of Infectious Diseases, 2020. **223**(7): p. 1183-1195.
330. Rölle, A., et al., *Distinct HLA-E Peptide Complexes Modify Antibody-Driven Effector Functions of Adaptive NK Cells*. Cell Reports, 2018. **24**(8): p. 1967-1976.e4.
331. Jost, S., et al., *Human antigen-specific memory natural killer cell responses develop against HIV-1 and influenza virus and are dependent on MHC-E restriction*. bioRxiv, 2020: p. 2020.11.09.374348.
332. Brunetta, E., K.L. Hudspeth, and D. Mavilio, *Pathologic natural killer cell subset redistribution in HIV-1 infection: new insights in pathophysiology and clinical outcomes*. J Leukoc Biol, 2010. **88**(6): p. 1119-30.
333. Jia, M., et al., *Impaired natural killer cell-induced antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity is associated with human immunodeficiency virus-1 disease progression*. Clin Exp Immunol, 2013. **171**(1): p. 107-16.
334. Ward, J., et al., *HIV modulates the expression of ligands important in triggering natural killer cell cytotoxic responses on infected primary T-cell blasts*. Blood, 2007. **110**(4): p. 1207-1214.
335. Jost, S. and M. Altfeld, *Evasion from NK cell-mediated immune responses by HIV-1*. Microbes Infect, 2012. **14**(11): p. 904-15.

336. Madhavi, V., et al., *Antibody-dependent effector functions against HIV decline in subjects receiving antiretroviral therapy*. J Infect Dis, 2015. **211**(4): p. 529-38.
337. Scott-Algara, D., et al., *Cutting Edge: Increased NK Cell Activity in HIV-1-Exposed but Uninfected Vietnamese Intravascular Drug Users*. The Journal of Immunology, 2003. **171**(11): p. 5663-5667.
338. Montoya, C.J., et al., *Increased IFN- γ production by NK and CD3⁺/CD56⁺ cells in sexually HIV-1-exposed but uninfected individuals*. Clinical Immunology, 2006. **120**(2): p. 138-146.
339. Ravet, S., et al., *Distinctive NK-cell receptor repertoires sustain high-level constitutive NK-cell activation in HIV-exposed uninfected individuals*. Blood, 2007. **109**(10): p. 4296-4305.
340. Jennes, W., et al., *Cutting Edge: Resistance to HIV-1 Infection among African Female Sex Workers Is Associated with Inhibitory KIR in the Absence of Their HLA Ligands*. The Journal of Immunology, 2006. **177**(10): p. 6588-6592.
341. Tomescu, C., et al., *Impact of protective killer inhibitory receptor/human leukocyte antigen genotypes on natural killer cell and T-cell function in HIV-1-infected controllers*. AIDS, 2012. **26**(15).
342. Kanya, P., et al., *Receptor-Ligand Requirements for Increased NK Cell Polyfunctional Potential in Slow Progressors Infected with HIV-1 Coexpressing KIR3DL1^{*h}/^{*y} and HLA-B*57*. Journal of Virology, 2011. **85**(12): p. 5949-5960.
343. Marras, F., et al., *Control of the HIV-1 DNA Reservoir Is Associated In Vivo and In Vitro with Nkp46/Nkp30 (CD335 CD337) Inducibility and Interferon Gamma Production by Transcriptionally Unique NK Cells*. J Virol, 2017. **91**(23).
344. Olesen, R., et al., *Innate Immune Activity Correlates with CD4 T Cell-Associated HIV-1 DNA Decline during Latency-Reversing Treatment with Panobinostat*. J Virol, 2015. **89**(20): p. 10176-89.
345. Hua, S., et al., *Pegylated Interferon- α -Induced Natural Killer Cell Activation Is Associated With Human Immunodeficiency Virus-1 DNA Decline in Antiretroviral Therapy-Treated HIV-1/Hepatitis C Virus-Coinfected Patients*. Clinical Infectious Diseases, 2017. **66**(12): p. 1910-1917.
346. Papanavvas, E., et al., *NK Response Correlates with HIV Decrease in Pegylated IFN- α 2a-Treated Antiretroviral Therapy-Suppressed Subjects*. The Journal of Immunology, 2019. **203**(3): p. 705-717.
347. Miller, J.S. and L.L. Lanier, *Natural Killer Cells in Cancer Immunotherapy*. Annual Review of Cancer Biology, 2019. **3**(1): p. 77-103.
348. Huot, N., et al., *Natural killer cells migrate into and control simian immunodeficiency virus replication in lymph node follicles in African green monkeys*. Nat Med, 2017. **23**(11): p. 1277-1286.
349. Barouch, D.H., et al., *Protective efficacy of adenovirus/protein vaccines against SIV challenges in rhesus monkeys*. Science, 2015. **349**(6245): p. 320-324.
350. Alpert, M.D., et al., *ADCC develops over time during persistent infection with live-attenuated SIV and is associated with complete protection against SIV(mac)251 challenge*. PLoS Pathog, 2012. **8**(8): p. e1002890.
351. Bradley, T., et al., *Pentavalent HIV-1 vaccine protects against simian-human immunodeficiency virus challenge*. Nature Communications, 2017. **8**(1): p. 15711.
352. Forthal, D.N., et al., *Recombinant gp120 Vaccine-Induced Antibodies Inhibit Clinical Strains of HIV-1 in the Presence of Fc Receptor-Bearing Effector Cells and Correlate Inversely with HIV Infection Rate*. The Journal of Immunology, 2007. **178**(10): p. 6596-6603.

353. Haynes, B.F., et al., *Immune-correlates analysis of an HIV-1 vaccine efficacy trial*. N Engl J Med, 2012. **366**(14): p. 1275-86.
354. Yates, N.L., et al., *Vaccine-Induced Env V1-V2 IgG3 Correlates with Lower HIV-1 Infection Risk and Declines Soon After Vaccination*. Science Translational Medicine, 2014. **6**(228): p. 228ra39-228ra39.
355. Hessel, A.J., et al., *Effective, low-titer antibody protection against low-dose repeated mucosal SHIV challenge in macaques*. Nature medicine, 2009. **15**(8): p. 951-954.
356. Hessel, A.J., et al., *Fc receptor but not complement binding is important in antibody protection against HIV*. Nature, 2007. **449**(7158): p. 101-4.
357. Fouts, T.R., et al., *Balance of cellular and humoral immunity determines the level of protection by HIV vaccines in rhesus macaque models of HIV infection*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2015. **112**(9): p. E992-E999.
358. Bomsel, M., et al., *Immunization with HIV-1 gp41 subunit virosomes induces mucosal antibodies protecting nonhuman primates against vaginal SHIV challenges*. Immunity, 2011. **34**(2): p. 269-80.
359. Rerks-Ngarm, S., et al., *Vaccination with ALVAC and AIDSVAX to prevent HIV-1 infection in Thailand*. N Engl J Med, 2009. **361**(23): p. 2209-20.
360. Van Rompay, K.K., et al., *Passive immunization of newborn rhesus macaques prevents oral simian immunodeficiency virus infection*. J Infect Dis, 1998. **177**(5): p. 1247-59.
361. Florese, R.H., et al., *Evaluation of passively transferred, nonneutralizing antibody-dependent cellular cytotoxicity-mediating IgG in protection of neonatal rhesus macaques against oral SIVmac251 challenge*. J Immunol, 2006. **177**(6): p. 4028-36.
362. Burton, D.R., et al., *Limited or no protection by weakly or nonneutralizing antibodies against vaginal SHIV challenge of macaques compared with a strongly neutralizing antibody*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2011. **108**(27): p. 11181-11186.
363. Dugast, A.-S., et al., *Lack of protection following passive transfer of polyclonal highly functional low-dose non-neutralizing antibodies*. PloS one, 2014. **9**(5): p. e97229-e97229.
364. Moog, C., et al., *Protective effect of vaginal application of neutralizing and nonneutralizing inhibitory antibodies against vaginal SHIV challenge in macaques*. Mucosal Immunol, 2014. **7**(1): p. 46-56.
365. Santra, S., et al., *Human Non-neutralizing HIV-1 Envelope Monoclonal Antibodies Limit the Number of Founder Viruses during SHIV Mucosal Infection in Rhesus Macaques*. PLoS pathogens, 2015. **11**(8): p. e1005042-e1005042.
366. Siegel, F., R. Kurth, and S. Norley, *Neither whole inactivated virus immunogen nor passive immunoglobulin transfer protects against SIVagm infection in the African green monkey natural host*. J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol, 1995. **8**(3): p. 217-26.
367. Astronomo, R.D., et al., *Neutralization Takes Precedence Over IgG or IgA Isotype-related Functions in Mucosal HIV-1 Antibody-mediated Protection*. EBioMedicine, 2016. **14**: p. 97-111.
368. Hessel, A.J., et al., *Reduced Cell-Associated DNA and Improved Viral Control in Macaques following Passive Transfer of a Single Anti-V2 Monoclonal Antibody and Repeated Simian/Human Immunodeficiency Virus Challenges*. Journal of virology, 2018. **92**(11): p. e02198-17.

369. Onyango-Makumbi, C., et al., *Safety and efficacy of HIV hyperimmune globulin for prevention of mother-to-child HIV transmission in HIV-1-infected pregnant women and their infants in Kampala, Uganda (HIVIGLOB/NVP STUDY)*. Journal of acquired immune deficiency syndromes (1999), 2011. **58**(4): p. 399-407.
370. Hidajat, R., et al., *Correlation of vaccine-elicited systemic and mucosal nonneutralizing antibody activities with reduced acute viremia following intrarectal simian immunodeficiency virus SIVmac251 challenge of rhesus macaques*. Journal of virology, 2009. **83**(2): p. 791-801.
371. Xiao, P., et al., *Multiple vaccine-elicited nonneutralizing anti-envelope antibody activities contribute to protective efficacy by reducing both acute and chronic viremia following simian/human immunodeficiency virus SHIV89.6P challenge in rhesus macaques*. Journal of virology, 2010. **84**(14): p. 7161-7173.
372. Xiao, P., et al., *Replicating adenovirus-simian immunodeficiency virus (SIV) recombinant priming and envelope protein boosting elicits localized, mucosal IgA immunity in rhesus macaques correlated with delayed acquisition following a repeated low-dose rectal SIV(mac251) challenge*. Journal of virology, 2012. **86**(8): p. 4644-4657.
373. Gómez-Román, V.R., et al., *Vaccine-elicited antibodies mediate antibody-dependent cellular cytotoxicity correlated with significantly reduced acute viremia in rhesus macaques challenged with SIVmac251*. J Immunol, 2005. **174**(4): p. 2185-9.
374. Binley, J.M., et al., *Passive infusion of immune serum into simian immunodeficiency virus-infected rhesus macaques undergoing a rapid disease course has minimal effect on plasma viremia*. Virology, 2000. **270**(1): p. 237-49.
375. Forthal, D.N., et al., *Antibody-dependent cellular cytotoxicity independently predicts survival in severely immunocompromised human immunodeficiency virus-infected patients*. J Infect Dis, 1999. **180**(4): p. 1338-41.
376. Lambotte, O., et al., *Heterogeneous neutralizing antibody and antibody-dependent cell cytotoxicity responses in HIV-1 elite controllers*. AIDS (London, England), 2009. **23**(8): p. 897-906.
377. Madhavi, V., et al., *HIV-1 Env- and Vpu-Specific Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity Responses Associated with Elite Control of HIV*. Journal of virology, 2017. **91**(18): p. e00700-17.
378. Baum, L.L., et al., *HIV-1 gp120-specific antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity correlates with rate of disease progression*. J Immunol, 1996. **157**(5): p. 2168-73.
379. Bournazos, S., et al., *Broadly neutralizing anti-HIV-1 antibodies require Fc effector functions for in vivo activity*. Cell, 2014. **158**(6): p. 1243-1253.
380. Lu, C.-L., et al., *Enhanced clearance of HIV-1-infected cells by broadly neutralizing antibodies against HIV-1 in vivo*. Science, 2016. **352**(6288): p. 1001-1004.
381. Horwitz, J.A., et al., *Non-neutralizing Antibodies Alter the Course of HIV-1 Infection In Vivo*. Cell, 2017. **170**(4): p. 637-648.e10.
382. Schoofs, T., et al., *HIV-1 therapy with monoclonal antibody 3BNC117 elicits host immune responses against HIV-1*. Science, 2016. **352**(6288): p. 997-1001.
383. Sather, D.N., et al., *Factors Associated with the Development of Cross-Reactive Neutralizing Antibodies during Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection*. Journal of Virology, 2009. **83**(2): p. 757-769.
384. Mikell, I., et al., *Characteristics of the earliest cross-neutralizing antibody response to HIV-1*. PLoS Pathog, 2011. **7**(1): p. e1001251.

385. Kwong, P.D., J.R. Mascola, and G.J. Nabel, *Mining the B Cell Repertoire for Broadly Neutralizing Monoclonal Antibodies to HIV-1*. *Cell Host & Microbe*, 2009. **6**(4): p. 292-294.
386. Halper-Stromberg, A., et al., *Broadly Neutralizing Antibodies and Viral Inducers Decrease Rebound from HIV-1 Latent Reservoirs in Humanized Mice*. *Cell*, 2014. **158**(5): p. 989-999.
387. Lynch, R.M., et al., *Virologic effects of broadly neutralizing antibody VRC01 administration during chronic HIV-1 infection*. *Science Translational Medicine*, 2015. **7**(319): p. 319ra206-319ra206.
388. Bar, K.J., et al., *Effect of HIV Antibody VRC01 on Viral Rebound after Treatment Interruption*. *New England Journal of Medicine*, 2016. **375**(21): p. 2037-2050.
389. Scheid, J.F., et al., *HIV-1 antibody 3BNC117 suppresses viral rebound in humans during treatment interruption*. *Nature*, 2016. **535**(7613): p. 556-560.
390. Barouch, D.H., et al., *Therapeutic efficacy of potent neutralizing HIV-1-specific monoclonal antibodies in SHIV-infected rhesus monkeys*. *Nature*, 2013. **503**(7475): p. 224-228.
391. Caskey, M., F. Klein, and M.C. Nussenzweig, *Broadly Neutralizing Antibodies for HIV-1 Prevention or Immunotherapy*. *New England Journal of Medicine*, 2016. **375**(21): p. 2019-2021.
392. Tuyishime, M., et al., *Improved killing of HIV-infected cells using three neutralizing and non-neutralizing antibodies*. *J Clin Invest*, 2020. **130**(10): p. 5157-5170.
393. Gaudinski, M.R., et al., *Safety and pharmacokinetics of the Fc-modified HIV-1 human monoclonal antibody VRC01LS: A Phase 1 open-label clinical trial in healthy adults*. *PLOS Medicine*, 2018. **15**(1): p. e1002493.
394. Hsu, D.C., J.W. Mellors, and S. Vasan, *Can Broadly Neutralizing HIV-1 Antibodies Help Achieve an ART-Free Remission?* *Frontiers in Immunology*, 2021. **12**(2771).
395. Klatt, N.R., et al., *Immune activation and HIV persistence: implications for curative approaches to HIV infection*. *Immunol Rev*, 2013. **254**(1): p. 326-42.
396. Joos, B., et al., *HIV rebounds from latently infected cells, rather than from continuing low-level replication*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. **105**(43): p. 16725-30.
397. Neidleman, J., et al., *Phenotypic analysis of the unstimulated in vivo HIV CD4 T cell reservoir*. *Elife*, 2020. **9**.
398. Bertagnolli, L.N., et al., *The role of CD32 during HIV-1 infection*. *Nature*, 2018. **561**(7723): p. E17-E19.
399. Perez, L., et al., *Conflicting evidence for HIV enrichment in CD32(+) CD4 T cells*. *Nature*, 2018. **561**(7723): p. E9-E16.
400. 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.
401. Martin, G.E., et al., *CD32-Expressing CD4 T Cells Are Phenotypically Diverse and Can Contain Proviral HIV DNA*. *Front Immunol*, 2018. **9**: p. 928.
402. Lanier, L.L., *Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition*. *Nat Immunol*, 2008. **9**(5): p. 495-502.
403. Bottino, C., et al., *Cellular ligands of activating NK receptors*. *Trends Immunol*, 2005. **26**(4): p. 221-6.
404. Andre, P., et al., *Anti-NKG2A mAb Is a Checkpoint Inhibitor that Promotes Anti-tumor Immunity by Unleashing Both T and NK Cells*. *Cell*, 2018. **175**(7): p. 1731-1743 e13.

405. Pereira, B.I., et al., *Senescent cells evade immune clearance via HLA-E-mediated NK and CD8(+) T cell inhibition*. Nat Commun, 2019. **10**(1): p. 2387.
406. Li, M., et al., *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, 2006. **80**(23): p. 11776-90.
407. Moore, J.P., et al., *Immunochemical analysis of the gp120 surface glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1: probing the structure of the C4 and V4 domains and the interaction of the C4 domain with the V3 loop*. J Virol, 1993. **67**(8): p. 4785-96.
408. Grau-Expósito J, S.-P.C., Miguel L, Navarro J, Curran A, Burgos J, Ocaña I, Ribera E, Torrella A, Planas B, Rosa Badía, Castellví J, Falcò V, Crespo M, Buzon MJ, *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.
409. Pollara, J., et al., *High-throughput quantitative analysis of HIV-1 and SIV-specific ADCC-mediating antibody responses*. Cytometry A, 2011. **79**(8): p. 603-12.
410. Gomez-Roman, V.R., et al., *A simplified method for the rapid fluorometric assessment of antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*. J Immunol Methods, 2006. **308**(1-2): p. 53-67.
411. Montes, M., et al., *A general method for bead-enhanced quantitation by flow cytometry*. J Immunol Methods, 2006. **317**(1-2): p. 45-55.
412. Mikulak, J., et al., *Natural killer cells in HIV-1 infection and therapy*. AIDS, 2017. **31**(17): p. 2317-2330.
413. Alevy, Y.G., J. Tucker, and T. Mohanakumar, *CD32A (Fc gamma RIIa) mRNA expression and regulation in blood monocytes and cell lines*. Mol Immunol, 1992. **29**(11): p. 1289-97.
414. Veri, M.C., et al., *Monoclonal antibodies capable of discriminating the human inhibitory Fc gamma-receptor IIB (CD32B) from the activating Fc gamma-receptor IIA (CD32A): biochemical, biological and functional characterization*. Immunology, 2007. **121**(3): p. 392-404.
415. Lu, J., et al., *Structural recognition and functional activation of Fc gammaR by innate pentraxins*. Nature, 2008. **456**(7224): p. 989-92.
416. Clayton, K.L., et al., *Resistance of HIV-infected macrophages to CD8(+) T lymphocyte-mediated killing drives activation of the immune system*. Nat Immunol, 2018. **19**(5): p. 475-486.
417. Holgado, M.P., et al., *CD32 Ligation Promotes the Activation of CD4(+) T Cells*. Front Immunol, 2018. **9**: p. 2814.
418. Garcia, M., et al., *CD32 Expression is not Associated to HIV-DNA content in CD4 cell subsets of individuals with Different Levels of HIV Control*. Sci Rep, 2018. **8**(1): p. 15541.
419. Tremblay-McLean, A., et al., *Expression Profiles of Ligands for Activating Natural Killer Cell Receptors on HIV Infected and Uninfected CD4(+) T Cells*. Viruses, 2017. **9**(10).
420. Apps, R., et al., *HIV-1 Vpu Mediates HLA-C Downregulation*. Cell Host Microbe, 2016. **19**(5): p. 686-95.
421. Ward, J.P., M.I. Bonaparte, and E. Barker, *HLA-C and HLA-E reduce antibody-dependent natural killer cell-mediated cytotoxicity of HIV-infected primary T cell blasts*. AIDS, 2004. **18**(13): p. 1769-79.

422. Garrido, C., et al., *Interleukin-15-Stimulated Natural Killer Cells Clear HIV-1-Infected Cells following Latency Reversal Ex Vivo*. J Virol, 2018. **92**(12).
423. Lim, P.S., C.R. Sutton, and S. Rao, *Protein kinase C in the immune system: from signalling to chromatin regulation*. Immunology, 2015. **146**(4): p. 508-22.
424. Suryawanshi, P., et al., *Anti-HIV-1 ADCC and HIV-1 Env Can Be Partners in Reducing Latent HIV Reservoir*. Front Immunol, 2021. **12**: p. 663919.
425. Astorga-Gamaza, A., et al., *Antibody cooperative adsorption onto AuNPs and its exploitation to force natural killer cells to kill HIV-infected T cells*. Nano Today, 2021. **36**: p. 101056.
426. Fromentin, R., et al., *CD4+ T Cells Expressing PD-1, TIGIT and LAG-3 Contribute to HIV Persistence during ART*. PLoS Pathog, 2016. **12**(7): p. e1005761.
427. Huot, N., et al., *CD32(+)/CD4(+) T Cells Sharing B Cell Properties Increase With Simian Immunodeficiency Virus Replication in Lymphoid Tissues*. Front Immunol, 2021. **12**: p. 695148.
428. Engelhardt, W., J. Matzke, and R.E. Schmidt, *Activation-dependent expression of low affinity IgG receptors Fc gamma RII(CD32) and Fc gamma RIII(CD16) in subpopulations of human T lymphocytes*. Immunobiology, 1995. **192**(5): p. 297-320.
429. Gantner, P., et al., *Single-cell TCR sequencing reveals phenotypically diverse clonally expanded cells harboring inducible HIV proviruses during ART*. Nat Commun, 2020. **11**(1): p. 4089.
430. Alter, G., et al., *HIV-1 adaptation to NK-cell-mediated immune pressure*. Nature, 2011. **476**(7358): p. 96-100.
431. Cohen, G.B., et al., *The selective downregulation of class I major histocompatibility complex proteins by HIV-1 protects HIV-infected cells from NK cells*. Immunity, 1999. **10**(6): p. 661-71.
432. Bonaparte, M.I. and E. Barker, *Killing of human immunodeficiency virus-infected primary T-cell blasts by autologous natural killer cells is dependent on the ability of the virus to alter the expression of major histocompatibility complex class I molecules*. Blood, 2004. **104**(7): p. 2087-94.
433. Collins, K.L., et al., *HIV-1 Nef protein protects infected primary cells against killing by cytotoxic T lymphocytes*. Nature, 1998. **391**(6665): p. 397-401.
434. Arias, J.F., et al., *Tetherin antagonism by Vpu protects HIV-infected cells from antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(17): p. 6425-30.
435. Veillette, M., et al., *Interaction with cellular CD4 exposes HIV-1 envelope epitopes targeted by antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*. J Virol, 2014. **88**(5): p. 2633-44.
436. Murin, C.D., *Considerations of Antibody Geometric Constraints on NK Cell Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity*. Front Immunol, 2020. **11**: p. 1635.
437. Martina, B.E., P. Koraka, and A.D. Osterhaus, *Dengue virus pathogenesis: an integrated view*. Clin Microbiol Rev, 2009. **22**(4): p. 564-81.
438. Lu, L.L., et al., *Beyond binding: antibody effector functions in infectious diseases*. Nat Rev Immunol, 2018. **18**(1): p. 46-61.
439. Bournazos, S. and J.V. Ravetch, *Fc gamma Receptor Function and the Design of Vaccination Strategies*. Immunity, 2017. **47**(2): p. 224-233.
440. Martini, F., et al., *HLA-E up-regulation induced by HIV infection may directly contribute to CD94-mediated impairment of NK cells*. Int J Immunopathol Pharmacol, 2005. **18**(2): p. 269-76.

441. Kanevskiy, L., et al., *Dimorphism of HLA-E and its Disease Association*. Int J Mol Sci, 2019. **20**(21).
442. Kaiser, B.K., et al., *Structural basis for NKG2A/CD94 recognition of HLA-E*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(18): p. 6696-701.
443. Brostjan, C., et al., *Differential expression of inhibitory and activating CD94/NKG2 receptors on NK cell clones*. J Immunol Methods, 2002. **264**(1-2): p. 109-19.
444. Ward, A.R., T.M. Mota, and R.B. Jones, *Immunological approaches to HIV cure*. Semin Immunol, 2020: p. 101412.
445. Spivak, A.M. and V. Planelles, *Novel Latency Reversal Agents for HIV-1 Cure*. Annu Rev Med, 2018. **69**: p. 421-436.
446. Merino, A., et al., *Chronic stimulation drives human NK cell dysfunction and epigenetic reprogramming*. J Clin Invest, 2019. **129**(9): p. 3770-3785.
447. Mori, S., et al., *Differential regulation of human NK cell-associated gene expression following activation by IL-2, IFN-alpha and PMA/ionomycin*. Int J Oncol, 1998. **12**(5): p. 1165-70.
448. Jensen, S.S., et al., *HIV-Specific Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity (ADCC) -Mediating Antibodies Decline while NK Cell Function Increases during Antiretroviral Therapy (ART)*. PLoS One, 2015. **10**(12): p. e0145249.
449. Zhukovsky, E.A., R.J. Morse, and M.V. Maus, *Bispecific antibodies and CARs: generalized immunotherapeutics harnessing T cell redirection*. Curr Opin Immunol, 2016. **40**: p. 24-35.
450. Alter, G., et al., *Differential natural killer cell-mediated inhibition of HIV-1 replication based on distinct KIR/HLA subtypes*. J Exp Med, 2007. **204**(12): p. 3027-36.
451. Bi, J. and Z. Tian, *NK Cell Exhaustion*. Front Immunol, 2017. **8**: p. 760.
452. Zhang, L., et al., *Genetic characterization of rebounding HIV-1 after cessation of highly active antiretroviral therapy*. J Clin Invest, 2000. **106**(7): p. 839-45.
453. Yuan, H., et al., *Multivalent bi-specific nanobioconjugate engager for targeted cancer immunotherapy*. Nat Nanotechnol, 2017. **12**(8): p. 763-769.
454. Jiang, W., et al., *Nanoparticle-mediated cellular response is size-dependent*. Nat Nanotechnol, 2008. **3**(3): p. 145-50.
455. Bhattacharyya, S., et al., *Nanoconjugation modulates the trafficking and mechanism of antibody induced receptor endocytosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(33): p. 14541-6.
456. Garrido, C., et al., *Gold nanoparticles to improve HIV drug delivery*. Future Med Chem, 2015. **7**(9): p. 1097-107.
457. Ramsden, J.J., G.I. Bachmanova, and A.I. Archakov, *Kinetic evidence for protein clustering at a surface*. Phys Rev E Stat Phys Plasmas Fluids Relat Interdiscip Topics, 1994. **50**(6): p. 5072-5076.
458. Casals, E., et al., *Time evolution of the nanoparticle protein corona*. ACS Nano, 2010. **4**(7): p. 3623-32.
459. Hlady, V.V. and J. Buijs, *Protein adsorption on solid surfaces*. Curr Opin Biotechnol, 1996. **7**(1): p. 72-7.
460. Monopoli, M.P., et al., *Biomolecular coronas provide the biological identity of nanosized materials*. Nat Nanotechnol, 2012. **7**(12): p. 779-86.
461. Colangelo, E., et al., *Characterizing Self-Assembled Monolayers on Gold Nanoparticles*. Bioconjug Chem, 2017. **28**(1): p. 11-22.
462. Vroman, L., *Effect of absorbed proteins on the wettability of hydrophilic and hydrophobic solids*. Nature, 1962. **196**: p. 476-7.

463. Raman, A., C. Jaime, and V.F. Puentes, *Domain Formation and Conformational Changes in Gold Nanoparticle Conjugates Studied Using DPD Simulations*. Langmuir, 2017. **33**(50): p. 14502-14512.
464. Jackson, A.M., J.W. Myerson, and F. Stellacci, *Spontaneous assembly of subnanometre-ordered domains in the ligand shell of monolayer-protected nanoparticles*. Nat Mater, 2004. **3**(5): p. 330-6.
465. Singh, C., et al., *Entropy-mediated patterning of surfactant-coated nanoparticles and surfaces*. Phys Rev Lett, 2007. **99**(22): p. 226106.
466. Howell, D.N., et al., *Natural killing target antigens as inducers of interferon: studies with an immunoselected, natural killing-resistant human T lymphoblastoid cell line*. J Immunol, 1985. **134**(2): p. 971-6.
467. Trkola, A., et al., *A cell line-based neutralization assay for primary human immunodeficiency virus type 1 isolates that use either the CCR5 or the CXCR4 coreceptor*. J Virol, 1999. **73**(11): p. 8966-74.
468. Clouse, K.A., et al., *Monokine regulation of human immunodeficiency virus-1 expression in a chronically infected human T cell clone*. J Immunol, 1989. **142**(2): p. 431-8.
469. Folks, T.M., et al., *Tumor necrosis factor alpha induces expression of human immunodeficiency virus in a chronically infected T-cell clone*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(7): p. 2365-8.
470. Wyatt, R., et al., *Involvement of the V1/V2 variable loop structure in the exposure of human immunodeficiency virus type 1 gp120 epitopes induced by receptor binding*. J Virol, 1995. **69**(9): p. 5723-33.
471. Bastus, N.G., J. Comenge, and V. Puentes, *Kinetically controlled seeded growth synthesis of citrate-stabilized gold nanoparticles of up to 200 nm: size focusing versus Ostwald ripening*. Langmuir, 2011. **27**(17): p. 11098-105.
472. Ciaurriz, P., et al., *Comparison of four functionalization methods of gold nanoparticles for enhancing the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)*. Beilstein J Nanotechnol, 2017. **8**: p. 244-253.
473. Erickson, H.P., *Size and shape of protein molecules at the nanometer level determined by sedimentation, gel filtration, and electron microscopy*. Biol Proced Online, 2009. **11**: p. 32-51.
474. Monticelli, L., et al., *The MARTINI Coarse-Grained Force Field: Extension to Proteins*. J Chem Theory Comput, 2008. **4**(5): p. 819-34.
475. Afshar Y., S.F., Pischevar A. and Worley S., *Exploiting seeding of random number generators for efficient domain decomposition parallelization of dissipative particle dynamics*. Computer Physics Communications, 2013. **184**(4): p. 1119-1128.
476. A., M.A.a.J., *Dissipative particle dynamics: effects of parameterization and thermostating schemes on rheology*. Soft Materials, 2015. **13**(2): p. 106-117.
477. Franconetti, A., et al., *Chitosan as a capping agent: Insights on the stabilization of gold nanoparticles*. Carbohydr Polym, 2019. **207**: p. 806-814.
478. Moreno A., J.A., Grillo R., Fraceto L. F. and Jaime C., *A study on the molecular existing interactions in nanoherbicides: a chitoooligosaccharide/tripolyphosphate kloaded with paraquat case.* . Colloids and Surfaces A, 2018. **562**: p. 220-228.
479. De Meyer F. J. M., R.J.M., Willems T. F. and Smit B., *Molecular simulation of the effect of cholesterol on lipid-mediated protein-protein interactions*. Biophysical Journal, 2010. **99**(11): p. 3629-3638.

480. Venturoli M., S.B.a.S., M. M., *Simulation studies of protein-induced bilayer deformations, and lipid-induced protein tilting, on a mesoscopic model for lipid bilayers with embedded proteins*. Biophysical Journal, 2005. **88**(3): p. 1778-1798.
481. Garcia-Fernandez, L., et al., *Conserved effects and altered trafficking of Cetuximab antibodies conjugated to gold nanoparticles with precise control of their number and orientation*. Nanoscale, 2017. **9**(18): p. 6111-6121.
482. Grivel, J.C. and L. Margolis, *Use of human tissue explants to study human infectious agents*. Nat Protoc, 2009. **4**(2): p. 256-69.
483. Sajadi, M.M., et al., *Signature biochemical properties of broadly cross-reactive HIV-1 neutralizing antibodies in human plasma*. J Virol, 2012. **86**(9): p. 5014-25.
484. Piella, J., N.G. Bastus, and V. Puntès, *Size-Dependent Protein-Nanoparticle Interactions in Citrate-Stabilized Gold Nanoparticles: The Emergence of the Protein Corona*. Bioconjug Chem, 2017. **28**(1): p. 88-97.
485. Pillai, P.P., et al., *Electrostatic Titrations Reveal Surface Compositions of Mixed, On-Nanoparticle Monolayers Comprising Positively and Negatively Charged Ligands*. The Journal of Physical Chemistry C, 2016. **120**: p. 4139-4144.
486. Zhang, D., et al., *Gold nanoparticles can induce the formation of protein-based aggregates at physiological pH*. Nano Lett, 2009. **9**(2): p. 666-71.
487. Saha, B., T.H. Evers, and M.W. Prins, *How antibody surface coverage on nanoparticles determines the activity and kinetics of antigen capturing for biosensing*. Anal Chem, 2014. **86**(16): p. 8158-66.
488. Ong, Q., Z. Luo, and F. Stellacci, *Characterization of Ligand Shell for Mixed-Ligand Coated Gold Nanoparticles*. Acc Chem Res, 2017. **50**(8): p. 1911-1919.
489. Comenge, J., *The Role of PEG Conformation in Mixed Layers: From Protein Corona Substrate to Steric Stabilization Avoiding Protein Adsorption*. ScienceOpen Research, 2015.
490. Cesbron, Y., et al., *Stripy nanoparticles revisited*. Small, 2012. **8**(24): p. 3714-9; author reply 3720-6.
491. Ong, Q.K. and F. Stellacci, *Response to "Critical Assessment of the Evidence for Striped Nanoparticles"*. PLoS One, 2015. **10**(11): p. e0135594.
492. Duchesne, L., et al., *Supramolecular domains in mixed peptide self-assembled monolayers on gold nanoparticles*. Chembiochem, 2008. **9**(13): p. 2127-34.
493. Bonomi, R., A. Cazzolaro, and L.J. Prins, *Assessment of the morphology of mixed SAMs on Au nanoparticles using a fluorescent probe*. Chem Commun (Camb), 2011. **47**(1): p. 445-7.
494. Jain, P.K., et al., *Calculated absorption and scattering properties of gold nanoparticles of different size, shape, and composition: applications in biological imaging and biomedicine*. J Phys Chem B, 2006. **110**(14): p. 7238-48.
495. Ferrari, G., et al., *An HIV-1 gp120 envelope human monoclonal antibody that recognizes a C1 conformational epitope mediates potent antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) activity and defines a common ADCC epitope in human HIV-1 serum*. J Virol, 2011. **85**(14): p. 7029-36.
496. Jacobi, C., et al., *Exposure of NK cells to intravenous immunoglobulin induces IFN gamma release and degranulation but inhibits their cytotoxic activity*. Clin Immunol, 2009. **133**(3): p. 393-401.
497. Cantero, J. and M. Genesca, *Maximizing the immunological output of the cervicovaginal explant model*. J Immunol Methods, 2018. **460**: p. 26-35.
498. Estes, J.D., et al., *Defining total-body AIDS-virus burden with implications for curative strategies*. Nat Med, 2017. **23**(11): p. 1271-1276.

499. Kennedy, J., et al., *In vivo studies investigating biodistribution of nanoparticle-encapsulated rhodamine B delivered via dissolving microneedles*. J Control Release, 2017. **265**: p. 57-65.
500. Cao, S. and K.A. Woodrow, *Nanotechnology approaches to eradicating HIV reservoirs*. Eur J Pharm Biopharm, 2019. **138**: p. 48-63.
501. Bowen, A., E.E. Sweeney, and R. Fernandes, *Nanoparticle-Based Immunoengineered Approaches for Combating HIV*. Front Immunol, 2020. **11**: p. 789.
502. Boesch, A.W., E.P. Brown, and M.E. Ackerman, *The role of Fc receptors in HIV prevention and therapy*. Immunol Rev, 2015. **268**(1): p. 296-310.
503. Lux, A., et al., *Impact of immune complex size and glycosylation on IgG binding to human FcγR3s*. J Immunol, 2013. **190**(8): p. 4315-23.
504. Acharya, P., et al., *Structural definition of an antibody-dependent cellular cytotoxicity response implicated in reduced risk for HIV-1 infection*. J Virol, 2014. **88**(21): p. 12895-906.
505. Bryceson, Y.T., et al., *Synergy among receptors on resting NK cells for the activation of natural cytotoxicity and cytokine secretion*. Blood, 2006. **107**(1): p. 159-66.
506. Azzoni, L., et al., *Sustained impairment of IFN-γ secretion in suppressed HIV-infected patients despite mature NK cell recovery: evidence for a defective reconstitution of innate immunity*. J Immunol, 2002. **168**(11): p. 5764-70.
507. Chehimi, J., et al., *Baseline viral load and immune activation determine the extent of reconstitution of innate immune effectors in HIV-1-infected subjects undergoing antiretroviral treatment*. J Immunol, 2007. **179**(4): p. 2642-50.
508. Sweeney, E.E., et al., *PLGA nanodepots co-encapsulating prostratin and anti-CD25 enhance primary natural killer cell antiviral and antitumor function*. Nano Research, 2020. **13**(3): p. 736-744.
509. Jones, R.B., et al., *Antigen recognition-triggered drug delivery mediated by nanocapsule-functionalized cytotoxic T-cells*. Biomaterials, 2017. **117**: p. 44-53.
510. Yeheskely-Hayon, D., et al., *Optically induced cell fusion using bispecific nanoparticles*. Small, 2013. **9**(22): p. 3771-7.
511. Wiernik, A., et al., *Targeting natural killer cells to acute myeloid leukemia in vitro with a CD16 x 33 bispecific killer cell engager and ADAM17 inhibition*. Clin Cancer Res, 2013. **19**(14): p. 3844-55.
512. Gleason, M.K., et al., *Bispecific and trispecific killer cell engagers directly activate human NK cells through CD16 signaling and induce cytotoxicity and cytokine production*. Mol Cancer Ther, 2012. **11**(12): p. 2674-84.
513. Manickam, C., et al., *Monkeying Around: Using Non-human Primate Models to Study NK Cell Biology in HIV Infections*. Front Immunol, 2019. **10**: p. 1124.
514. 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.
515. 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.
516. Moore, J.P., et al., *Exploration of antigenic variation in gp120 from clades A through F of human immunodeficiency virus type 1 by using monoclonal antibodies*. J Virol, 1994. **68**(12): p. 8350-64.

517. Tolbert, W.D., et al., *Paring Down HIV Env: Design and Crystal Structure of a Stabilized Inner Domain of HIV-1 gp120 Displaying a Major ADCC Target of the A32 Region*. *Structure*, 2016. **24**(5): p. 697-709.
518. Lewis, G.K., M. Pazgier, and A.L. DeVico, *Survivors Remorse: antibody-mediated protection against HIV-1*. *Immunol Rev*, 2017. **275**(1): p. 271-284.
519. Whitney, J.B., et al., *Rapid seeding of the viral reservoir prior to SIV viraemia in rhesus monkeys*. *Nature*, 2014. **512**(7512): p. 74-77.
520. Cadena, A.M., et al., *Persistence of viral RNA in lymph nodes in ART-suppressed SIV/SHIV-infected Rhesus Macaques*. *Nature Communications*, 2021. **12**(1): p. 1474.
521. Luzuriaga, K., et al., *Viremic relapse after HIV-1 remission in a perinatally infected child*. *The New England journal of medicine*, 2015. **372**(8): p. 786-788.
522. Henrich, T.J., et al., *HIV-1 persistence following extremely early initiation of antiretroviral therapy (ART) during acute HIV-1 infection: An observational study*. *PLOS Medicine*, 2017. **14**(11): p. e1002417.
523. Colby, D.J., et al., *Rapid HIV RNA rebound after antiretroviral treatment interruption in persons durably suppressed in Fiebig I acute HIV infection*. *Nature Medicine*, 2018. **24**(7): p. 923-926.
524. Brodin, J., et al., *Establishment and stability of the latent HIV-1 DNA reservoir*. *Elife*, 2016. **5**.
525. Pankau, M.D., et al., *Dynamics of HIV DNA reservoir seeding in a cohort of superinfected Kenyan women*. *PLOS Pathogens*, 2020. **16**(2): p. e1008286.
526. Laanani, M., et al., *Impact of the Timing of Initiation of Antiretroviral Therapy During Primary HIV-1 Infection on the Decay of Cell-Associated HIV-DNA*. *Clinical Infectious Diseases*, 2015. **60**(11): p. 1715-1721.
527. Peluso, M.J., et al., *Differential decay of intact and defective proviral DNA in HIV-1-infected individuals on suppressive antiretroviral therapy*. *JCI insight*, 2020. **5**(4): p. e132997.
528. Leyre, L., et al., *Abundant HIV-infected cells in blood and tissues are rapidly cleared upon ART initiation during acute HIV infection*. *Science Translational Medicine*, 2020. **12**(533): p. eaav3491.
529. Einkauff, 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.
530. Pinzone, M.R., et al., *Longitudinal HIV sequencing reveals reservoir expression leading to decay which is obscured by clonal expansion*. *Nat Commun*, 2019. **10**(1): p. 728.
531. Wagner, T.A., et al., *An increasing proportion of monotypic HIV-1 DNA sequences during antiretroviral treatment suggests proliferation of HIV-infected cells*. *Journal of virology*, 2013. **87**(3): p. 1770-1778.
532. Kwon, K.J., A.E. Timmons, and S. Sengupta, *Different human resting memory CD4(+) T cell subsets show similar low inducibility of latent HIV-1 proviruses*. 2020. **12**(528).
533. Aamer, H.A., et al., *Cells producing residual viremia during antiretroviral treatment appear to contribute to rebound viremia following interruption of treatment*. *PLoS Pathog*, 2020. **16**(8): p. e1008791.
534. Bachmann, N., et al., *Determinants of HIV-1 reservoir size and long-term dynamics during suppressive ART*. *Nat Commun*, 2019. **10**(1): p. 3193.
535. Anania, J.C., et al., *The Human FcγRII (CD32) Family of Leukocyte FcR in Health and Disease*. *Frontiers in Immunology*, 2019. **10**(464).

536. Burton, D.R. and L. Hangartner, *Broadly Neutralizing Antibodies to HIV and Their Role in Vaccine Design*. Annual review of immunology, 2016. **34**: p. 635-659.
537. Dekaban, G.A. and J.D. Dikeakos, *HIV-1 Nef inhibitors: a novel class of HIV-specific immune adjuvants in support of a cure*. AIDS research and therapy, 2017. **14**(1): p. 53-53.
538. Hütter, 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.
539. Gupta, R.K., et al., *Evidence for HIV-1 cure after CCR5Δ32/Δ32 allogeneic haemopoietic stem-cell transplantation 30 months post analytical treatment interruption: a case report*. The Lancet HIV, 2020. **7**(5): p. e340-e347.
540. Hill, A.L., et al., *Real-Time Predictions of Reservoir Size and Rebound Time during Antiretroviral Therapy Interruption Trials for HIV*. PLoS pathogens, 2016. **12**(4): p. e1005535-e1005535.
541. Henrich, T.J., et al., *Antiretroviral-free HIV-1 remission and viral rebound after allogeneic stem cell transplantation: report of 2 cases*. Ann Intern Med, 2014. **161**(5): p. 319-27.
542. Persaud, D., et al., *Absence of detectable HIV-1 viremia after treatment cessation in an infant*. The New England journal of medicine, 2013. **369**(19): p. 1828-1835.
543. Singh, V., et al., *Latency Reversal 2.0: Giving the Immune System a Seat at the Table*. Current HIV/AIDS reports, 2021. **18**(2): p. 117-127.
544. Veillette, M., et al., *Role of HIV-1 Envelope Glycoproteins Conformation and Accessory Proteins on ADCC Responses*. Curr HIV Res, 2016. **14**(1): p. 9-23.
545. Mengistu, M., et al., *Antigenic properties of the human immunodeficiency virus envelope glycoprotein gp120 on virions bound to target cells*. PLoS pathogens, 2015. **11**(3): p. e1004772-e1004772.
546. Moore, J.P., et al., *Exploration of antigenic variation in gp120 from clades A through F of human immunodeficiency virus type 1 by using monoclonal antibodies*. Journal of Virology, 1994. **68**(12): p. 8350-8364.
547. Lewis, G.K., M. Pazgier, and A.L. DeVico, *Survivors Remorse: antibody-mediated protection against HIV-1*. Immunological Reviews, 2017. **275**(1): p. 271-284.
548. Bhattacharyya, S., et al., *Nanoconjugation modulates the trafficking and mechanism of antibody induced receptor endocytosis*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2010. **107**(33): p. 14541-14546.
549. Garrido, C., et al., *Gold nanoparticles to improve HIV drug delivery*. Future Medicinal Chemistry, 2015. **7**(9): p. 1097-1107.
550. Schudel, A., et al., *Programmable multistage drug delivery to lymph nodes*. Nat Nanotechnol, 2020. **15**(6): p. 491-499.
551. Zhang, Y., et al., *Nanoparticle anchoring targets immune agonists to tumors enabling anti-cancer immunity without systemic toxicity*. Nature Communications, 2018. **9**(1): p. 6.
552. Anselmo, A.C. and S. Mitragotri, *Nanoparticles in the clinic*. Bioengineering & translational medicine, 2016. **1**(1): p. 10-29.
553. Polack, F.P., et al., *Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine*. New England Journal of Medicine, 2020. **383**(27): p. 2603-2615.
554. Baden, L.R., et al., *Efficacy and Safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 Vaccine*. New England Journal of Medicine, 2020. **384**(5): p. 403-416.

555. Pardi, N., et al., *Expression kinetics of nucleoside-modified mRNA delivered in lipid nanoparticles to mice by various routes*. Journal of Controlled Release, 2015. **217**: p. 345-351.
556. Wang, A.Z., R. Langer, and O.C. Farokhzad, *Nanoparticle delivery of cancer drugs*. Annu Rev Med, 2012. **63**: p. 185-98.
557. Torchilin, V.P., *Multifunctional, stimuli-sensitive nanoparticulate systems for drug delivery*. Nature reviews. Drug discovery, 2014. **13**(11): p. 813-827.
558. Mura, S., J. Nicolas, and P. Couvreur, *Stimuli-responsive nanocarriers for drug delivery*. Nat Mater, 2013. **12**(11): p. 991-1003.
559. Jang, E.-S., et al., *The manipulation of natural killer cells to target tumor sites using magnetic nanoparticles*. Biomaterials, 2012. **33**(22): p. 5584-5592.
560. Phung, C.D., T.H. Tran, and J.O. Kim, *Engineered nanoparticles to enhance natural killer cell activity towards onco-immunotherapy: a review*. Archives of Pharmacal Research, 2020. **43**(1): p. 32-45.

VII. PUBLICACIONES

LISTA DE PUBLICACIONES DURANTE LA TESIS DOCTORAL

Astorga-Gamaza A, Vitali M, Borrajo ML, Suárez-López R, Jaime C, Bastus N, Serra-Peinado C, Luque-Ballesteros L, Blanch-Lombarte O, Prado JG, Lorente J, Pumarola F, Pellicer M, Falcó V, Genescà M, Puentes V, Buzon MJ. Antibody cooperative adsorption onto AuNPs and its exploitation to force natural killer cells to kill HIV-infected T cells. *Nano Today*. 2021 Feb;36:101056. doi: 10.1016/j.nantod.2020.101056. Epub 2020 Dec 20.

Astorga-Gamaza A, Buzon MJ. The active human immunodeficiency virus reservoir during antiretroviral therapy: emerging players in viral persistence. *Curr Opin HIV AIDS*. 2021 Jul 1;16(4):193-199. doi: 10.1097/COH.0000000000000685.

Serra-Peinado C, Grau-Expósito J, Luque-Ballesteros L, **Astorga-Gamaza A**, Navarro J, Gallego-Rodríguez J, Martín M, Curran A, Burgos J, Ribera E, Raventós B, Willekens R, Torrella A, Planas B, Badía R, García F, Castellví J, Genescà M, Falcó V, Buzon MJ. Expression of CD20 after viral reactivation renders HIV-reservoir cells susceptible to Rituximab. *Nat Commun*. 2019 Aug 16;10(1):3705. doi: 10.1038/s41467-019-11556-4.

Cantero-Pérez J, Grau-Expósito J, Serra-Peinado C, Rosero DA, Luque-Ballesteros L, **Astorga-Gamaza A**, Castellví J, Sanhueza T, Tapia G, Lloveras B, Fernández MA, Prado JG, Solé-Sedeno JM, Tarrats A, Lecumberri C, Mañalich-Barrachina L, Centeno-Mediavilla C, Falcó V, Buzon MJ, Genescà M. Resident memory T cells are a cellular reservoir for HIV in the cervical mucosa. *Nat Commun*. 2019 Oct 18;10(1):4739. doi: 10.1038/s41467-019-12732-2.

Grau-Expósito J, Sánchez-Gaona N, Massana N, Suppi M, **Astorga-Gamaza A**, Perea D, Rosado J, Falcó A, Kirkegaard C, Torrella A, Planas B, Navarro J, Suanzes P, Álvarez-Sierra D, Ayora A, Sansano I, Esperalba J, Andrés C, Antón A, Ramón Y Cajal S, Almirante B, Pujol-Borrell R, Falcó V, Burgos J, Buzón MJ, Genescà M. Peripheral and lung resident memory T cell responses against SARS-CoV-2. *Nat Commun*. 2021 May 21;12(1):3010. doi: 10.1038/s41467-021-23333-3.

En proceso:

Astorga-Gamaza A, Grau-Expósito J, Burgos J, Navarro J, Curran A, Raventós B, Torrella A, Planas B, Suanzes P, Falcó V, Genescà M, and Buzon MJ. HIV-Reservoir Cells Expressing CD32 are Resistant to Natural Killer Antibody-Dependent Immune Response. Submitted.

Astorga-Gamaza A, Perea D, Calvet-Mirabent M, Grau-Expósito J, Sánchez-Gaona N, Sánchez-Cerrillo I, Burgos J, Navarro J, Curran A, Suanzes P, Falcó V, Genescà M, Martín-Gayo E and Buzon MJ. Targeting KLRG1 enhances NK cytotoxicity and eliminates viral reactivated cells from the HIV latent reservoir. Manuscript in preparation.

Patente:

Bi-functionalized nanoparticles, process for its preparation and uses thereof. International Publication Number: WO 2021/023649 A1. International Publication Date: 11 February 2021. Inventors: Buzón Gómez MJ, Franco Puntos V, **Astorga-Gamaza A**, López Borrajo M.

