



Caracterización del perfil funcional de linfocitos T CD8 + específicos para los epítomos mutados, HA9 y HY9 presentados por el HLA-B*35, derivados de la proteína Gag de cepas circulantes del VIH-1 en Medellín

Andrés Fernando Alulema Colimba

Trabajo de grado presentado para optar al título de Microbiólogo y Bioanalista

Asesores

Liliana Yazmín Acevedo Sáenz, Doctor (PhD) en Ciencias Básicas Biomédicas

Paula Andréa Velilla Hernández, Doctor (PhD) en Ciencias Básicas Biomédicas

Universidad de Antioquia
Escuela de Microbiología
Microbiología y Bioanálisis
Medellín, Antioquia, Colombia

2023

Cita	(Alulema Colimba, 2018)
Referencia	Alulema Colimba. (2018). <i>Caracterización del perfil funcional de linfocitos T CD8 + específicos para los epítomos mutados, HA9 y HY9 presentados por el HLA-B*35, derivados de la proteína Gag de cepas circulantes del VIH-1 en Medellín</i> [Trabajo de grado profesional]. Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.
Estilo APA 7 (2020)	



Grupo de Investigación Inmunovirología.



Repositorio Institucional: <http://bibliotecadigital.udea.edu.co>

Universidad de Antioquia - www.udea.edu.co

El contenido de esta obra corresponde al derecho de expresión de los autores y no compromete el pensamiento institucional de la Universidad de Antioquia ni desata su responsabilidad frente a terceros. Los autores asumen la responsabilidad por los derechos de autor y conexos.

Resumen

La expresión del alelo HLA-B*35 se ha asociado con progresión lenta y rápida de la infección por el virus de inmunodeficiencia humana. Los mecanismos por los cuales se da este proceso no son claros. Se ha planteado que la afinidad de unión de epítomos a la molécula HLA-B*35 puede inducir una mejor respuesta inmune por parte de los LT CD8. Un reciente estudio reportó nuevas variantes mutadas de los epítomos HSNQVSQNY y HPVHAGPIA, los cuales son presentados por moléculas HLA-B*35. Los estudios bioinformáticos demostraron que las nuevas variantes mutadas del epítomo HSNQVSQNY se unen con una baja afinidad de a la molécula HLA, mientras que las variantes mutadas derivadas del epítomo HPVHAGPIA se unen con una mayor afinidad a la molécula HLA-B*35. Teniendo en cuenta lo anterior, este estudio se centró en la caracterización del perfil funcional de LT CD8+ en 12 individuos infectados crónicamente con el VIH-1 que expresan alelos pertenecientes al subtipo HLA-B*35 frente al estímulo con epítomos silvestres y variantes mutadas de alta o baja afinidad. Los hallazgos de este estudio resaltan que variantes con mayor afinidad de unión al HLA inducen un mayor porcentaje de LT CD8+ expresando un perfil polifuncional comparado con los epítomos silvestres y con las variantes mutadas asociadas con menor afinidad de unión. Sumado a lo anterior, se observó que la variante I223V del epítomo HPVHAGPIA induce una co-expresión mayor de granzima B y perforina comparado con otras variantes mutadas. Los resultados obtenidos en este estudio sugieren que las variantes mutadas asociadas con una alta afinidad de unión al HLA-B*35 inducen una respuesta de LT CD8+ de mayor magnitud, la cual aportaría al control de la replicación del virus y a la progresión de la enfermedad.

Palabras clave: Linfocitos T CD8 +, VIH, Epítomos, Antígenos HLA-B

Introducción

Para el año 2019, aproximadamente 38 millones de personas se encontraban conviviendo con virus de inmunodeficiencia humana (VIH), el cual es el agente causante del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) [1] . En Colombia, para ese mismo año, se reportaron que 200.000 personas estaban viviendo con el virus por lo que se considera a la infección por el VIH-1 como un problema de salud pública a nivel nacional y global [2] .

En el curso clínico de la infección, los linfocitos T CD8 + (LT CD8 +) juegan un papel importante en el control de la replicación del virus a través de respuestas citotóxicas y no citotóxicas, por lo que se considera crucial la activación de dicha subpoblación celular en el control de la viremia [3] . Los LT CD8 + se activan al reconocer a través de su receptor (TCR) un epítipo presentado por las células presentadoras de antígenos en el contexto del antígeno leucocitario humano clase I (HLA-I), asociado con el estímulo proporcionado por las moléculas co-estimuladoras y las citoquinas [4] . Hasta la fecha se ha determinado que la genética del HLA-I específica de cada individuo es crucial para la presentación de dichos epítopos y el curso de la infección; dicha asociación se relaciona con la afinidad de unión entre los epítopos y la molécula HLA-I en la que son presentados a los LT CD8+ [5] . Varias investigaciones se han enfocado en la búsqueda de epítopos que induzcan una respuesta eficaz, que suprima la replicación viral y que pueda ser utilizada como componentes de vacuna profiláctica y/o terapéutica [6] . Entre los alelos de HLA-I, el más estudiado y mejor caracterizado es el HLA-B, ya que presenta una gran variabilidad alélica [7] , aumentando el repertorio de péptidos que pueden unirse y presentarse [8] . Los epítopos presentados en estas moléculas, se asocian con la inducción de una respuesta funcional de LT CD8+ capaz de controlar la replicación del virus en comparación con el HLA-A y HLA-C [5, 6] . Cabe mencionar que los epítopos presentados en el HLA-I que inducen una respuesta funcional con actividad antiviral tienden a proceder de proteínas inmunogénicas del VIH, las cuales son epítopos derivados de las proteínas Gag, Pol y Nef [9] . Sumado a lo anterior, estos epítopos pueden inducir una potente respuesta de los LT CD8+ [10] .

En Colombia, uno de los subtipos de mayor frecuencia en el locus B es HLA-B*35 (17,8%) [11] , el cual ha sido asociado con progresión rápida a sida [12] y altas carga virales en sangre periférica [13] . Sin embargo, también se ha observado que este alelo puede asociarse con un mayor control de la replicación del virus [14] . En particular, los alelos HLA-B*35:02, -B*35:03 y -

B*35:04 se ha relacionado con una rápida progresión de la infección en pacientes caucásicos, mientras que el alelo HLA-B*35:01 y –B*35:08 tiene poco efecto sobre dicha progresión [15] . La diferencia en la respuesta ha sido asociada con la secuencia de aminoácidos del epítipo a ser presentado. Los alelos denominados HLA-B*35 Px (-B35:02, –B*35:03 y -B*35:04) unen un amplio repertorio de aminoácidos ubicados en la posición nueve del péptido, mientras los alelos HLA-B*35 Py (-B*35:01 y –B*35:08) unen epítipos con prolina en la posición dos y tirosina en la posición nueve [16, 17]. Los individuos que expresan alelos HLA-B*35 Px responden a variantes peptídicas en ausencia de respuesta a epítipos silvestres [17] ; sin embargo, los alelos HLA-B*35 Px se unen con mayor afinidad a ILT4, un inhibidor expresado en células dendríticas, llevando a una disfunción de células dendríticas e impactando en la presentación antigénica y la progresión en VIH-1 [18] .

Un estudio *in silico* realizado en el Grupo de Inmunovirología de la Universidad de Antioquia con individuos VIH + [19] , identificó varios epítipos mutados derivados de la proteína Gag de cepas circulantes de VIH-1. Tres de estas mutaciones en el epítipo HPVHAGPIA (HA9) se asociaron con alta afinidad de unión a la molécula HLA-B*35, mientras dos mutaciones en el epítipo HSNQVSQNY (HY9) se asociaron con una baja afinidad de unión a esta misma molécula HLA. Dichas mutaciones se encuentran en alta frecuencia en cepas virales que circulan en la población, y a la fecha, no se encuentran reportes en la literatura del perfil funcional de los LT CD8+ inducidos por estas variantes. Teniendo en cuenta estos antecedentes, el objetivo del presente estudio fue caracterizar el perfil funcional de los LT CD8+ en respuesta a los péptidos mutados de los epítipos HA9 y HY9 derivados de la proteína Gag del VIH-1, asociadas con un incremento o una disminución en la afinidad de unión al HLA*B35. Este enfoque es crucial al momento de crear estrategias terapéuticas basadas en la función efectora de los LT CD8+ en el control inmune contra la infección [20] .

Metodología

Tipo de estudio y población de estudio

Este es un estudio observacional analítico transversal, en el que se reclutaron doce individuos crónicamente infectados por VIH-1, que expresan específicamente el alelo HLA-B*35. El tamaño de la muestra se determinó teniendo en cuenta la frecuencia alélica de HLA-B*35 en Colombia (20%), y el número de personas infectadas por el VIH que asistían al programa de salud del VIH de la Corporación para Investigaciones Biológicas -CIB, con confianza. nivel del 95% y una precisión del 10%, utilizando el software Epidat 4.2. Los pacientes se seleccionaron con base en los siguientes criterios de inclusión: i) ser mayor de 18 años y ii) si estaba bajo tratamiento antirretroviral, que el tiempo en tratamiento no sobrepasara los 5 años. De igual forma se excluyeron pacientes que i) presenten infecciones oportunistas activas, ii) presenten tuberculosis latente, iii) prueba treponémica positiva, iv) uso actual o pasado de fármacos inmunosupresores o radio/quimioterapia, v) mujeres embarazadas o lactantes y vi) negación del paciente. Cada participante firmo un consentimiento informado, el cual fue elaborado de acuerdo con la resolución 008430 de la Legislación Colombiana de 1993.

Características de los péptidos derivados de Gag

En un estudio previo [19] , se identificó diferentes variantes de epítomos derivados de la proteína Gag del VIH-1 asociados a una alta o baja afinidad hacia la molécula HLA-B*35. Brevemente, la afinidad del complejo péptido-HLA se definió utilizando el software de simulación de acoplamiento receptor-ligando AutodockVina 4 y FlexPepDock. La afinidad de unión se expresó como la puntuación total de FlexPepDock, donde cuanto más negativo es el valor, más afinidad tiene la variante del epítomo por la molécula de HLA-I. Este paso de refinamiento se realizó tres veces para cada modelo de acoplamiento. Para cada repetición, se seleccionaron los mejores tres modelos de refinamiento de acuerdo con la posición del epítomo respectivo y las interacciones moleculares entre los aminoácidos del epítomo y los bolsillos HLA-B*35 (ver Tabla 1).

Carga viral plasmática y conteos de LT CD4+ y LT CD8+

Para cuantificar la carga viral plasmática y el conteo de LT CD4+ y LT CD8+, a cada participante se le tomó una muestra de sangre periférica con anticoagulante EDTA. La carga viral plasmática del VIH-1 se determinó utilizando el estuche comercial COBAS®AmpliPrep/Cobas TaqMan HIV-1 Test, versión 2.0 (Roche, Indianápolis, IN, USA), el cual detecta entre 20 a 10.000.000 de copias de ARN/mL

El conteo de LT CD4+ y LT CD8+ se realizó por citometría de flujo. Brevemente, se incubaron 150 µl de sangre total anticoagulada con EDTA con anticuerpos anti-CD3 FITC, anti-CD4 PE y anti-CD8 PeCy5 (BD Pharminge, San Diego, CA, USA) durante 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Los eritrocitos fueron lisados mediante la incubación por 10 min con 2 ml de BD FACS Lysing Solution 1X (BD Bioscience, San José, CA, USA). Se adquirieron por lo menos 100.000 eventos en la región de linfocitos para cada muestra, en el citómetro LSR Fortessa (BD Biosciences, San José, CA, USA). Las subpoblaciones de los LT CD4+ y LT CD8+ fueron identificadas como CD3+/CD4+ o CD3+/CD8+ usando el software FACSDiva versión 8.0.1 (BD Biosciencias). El número absoluto de linfocitos en sangre periférica fue calculado con base en el conteo manual, determinando conteo total de leucocitos y diferencial de células sanguíneas.

Evaluación del perfil funcional de LT CD8+

La evaluación funcional de LT CD8+ se realizó a partir de mononucleares de sangre periférica (MNSP) de los 12 individuos VIH-1 + que expresan específicamente el alelo HLA-B*35. Los MNSP se cultivaron en un plato de cultivo de 96 pozos de fondo en V (Costar, Corning, NY) con una densidad de 4×10^6 células/ml en medio RPMI-1640 suplementado con suero bovino fetal al 10%. Los MNSP se estimularon con 1 µg/ml de anticuerpos anti-CD28 (clon: CD28.2, eBioscience) y anti-CD49d (clon: 9F10, eBioscience), más cada uno de los péptidos a evaluar a una concentración de 10 µg/mL; como control positivo se estimuló con 1 µg/ml de enterotoxina B estafilocócica de *Staphylococcus aureus* (SEB) (Sigma-Aldrich), o con 12-miristato 13-acetato de forbol (PMA) más ionomicina a una concentración de 50 y 500 ng/ml, respectivamente (ambos de Sigma-Aldrich). Como control negativo se utilizaron células MNSP tratadas sólo con anticuerpos anti-CD28 y anti-CD49d. Todas las condiciones de estimulación se incubaron durante 12 horas a 37°C en CO₂ al 5%, en presencia de anti-CD107a (clon H4A3, BD) y de brefeldina A y monensina a una concentración de 10µg/ml (Thermo Fisher).

El perfil funcional de LT CD8+ específicos para cada epítipo y sus respectivas variantes mutadas, se evaluó por citometría de flujo, utilizando el siguiente panel de anticuerpos: anti-CD3-AlexaFluor700, anti-CD8-BV450, anti-IL-2-BV506, anti-GranzimaB-FITC, anti- Perforina-PE, antiCD107/a-APC, anti-IFN- γ -BV711, anti-TNF- α -PerCP-Cy5.5, anti-IL-10- PE-Cy7 y anti-MIP1 β -APC-H7, y el marcador de viabilidad Fixable Viability Dye 506. Los datos fueron analizados utilizando el software FlowJo Software versión 10-4 (Tree Star, Inc, Ashland, OR, USA). Para la caracterización de la respuesta específica contra los epítipos silvestre y sus variantes mutadas, a cada estímulo se le realizó la resta del porcentaje de respuesta obtenido con el control negativo y se definió respuesta en aquellas células donde se observe una producción dos veces mayor al control negativo. Los LT CD8+ positivos para varias combinaciones de moléculas efectoras fueron analizadas usando la función Booleana del software FlowJo X y graficada con el programa SPICE (<http://exon.niaid.nih.gov/spice/>). La magnitud total de la respuesta de LT CD8+ se determinó como la suma de cualquier respuesta a los péptidos individuales evaluados [21] .

Análisis estadísticos

Mediante la prueba Shapiro-Wilk se determinó el tipo de distribución, resultando en una distribución no paramétrica. Los datos se presentan como mediana \pm intervalo de confianza (IC) del 95%. Se utilizó la prueba U de Mann-Whitney para comparar dos grupos de datos no pareados. El conjunto de datos pareados a comparar se analizó mediante la prueba de Wilcoxon. Para los análisis de correlación se utilizó el coeficiente de Spearman. Los valores de $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos.

Resultados

Características clínicas y demográficas de la población

Las características clínicas y demográficas de la población se detallan en la Tabla 2. En general, en el estudio se incluyeron 12 individuos VIH+ que expresan el alelo HLA-B*35, de los cuales el 83% pertenecen al género masculino. La mediana del conteo de linfocitos T CD4+ fue de 636.8 células/mL y del conteo de LT CD8+ fue de 793.9 células/mL. De los 12 individuos, siete se encontraban recibiendo terapia antirretroviral (TAR) (58,3%), con una mediana entre el diagnóstico y el inicio de TAR de 14 meses; todos los pacientes en tratamiento tenían carga viral indetectable. Los individuos sin tratamiento, tenían una mediana de carga viral de 25500 (IQR 4535-80522).

Respuesta de LT CD8+ a estímulos policlonales en individuos HLA-B*35

Inicialmente, se evaluó la respuesta de LT CD8+ frente a estímulos policlonales con el objetivo de determinar la competencia funcional de las células obtenidas de pacientes con/sin TAR. En este estudio, la evaluación se realizó con dos estímulos policlonales: i) enterotoxina B de *Staphylococcus aureus* (SEB) y ii) PMA/Ionomicina (PMA). Como se observa en la Figura 1, la gran mayoría de los individuos respondieron a los estímulos policlonales con la producción de diferentes citoquinas y la expresión de moléculas asociadas con un perfil citotóxico (CD107a, expresión de novo de Granzima B (GrzB) y Perforina (Perf)). No se encontró diferencias significativas en la producción de Rantes en respuesta a los estímulos policlonales comparado con el control negativo (ver Figura 1E).

Teniendo en cuenta que previos estudios han reportado una recuperación parcial del perfil funcional de LT CD8+ en pacientes con tratamiento y alteraciones de la respuesta de subpoblación celular en pacientes con carga viral alta y sin TAR, en este estudio se analizó los cambios en la respuesta funcional de individuos con o sin TAR. En general, no se observan diferencias estadísticamente significativas entre la producción de citoquinas y algunas moléculas asociadas con citotoxicidad entre pacientes con TAR y sin TAR (ver Figura 2). Sin embargo, en los individuos sin TAR se observó una mayor frecuencia de LT CD8+ co-expresando CD107a+GrzB+ en respuesta al estímulo con PMA en comparación con los individuos con TAR (ver Figura 2I).

Las variantes mutadas con alta afinidad de unión al HLA-B*35 se asocia con una mayor magnitud total de respuesta de LT CD8+.

Previos estudios han postulado que una alta afinidad de unión del péptido a la molécula HLA determina su inmunogenicidad. Teniendo en cuenta lo anterior, se comparó la magnitud total de la respuesta de LT CD8+ (definida como la suma de cualquier respuesta frente a péptidos individuales evaluados [21]), la producción de citoquinas y la polifuncionalidad de LT CD8+ específicos para los epítomos, definido como la capacidad de las células para producir múltiples citoquinas y/o degranular al mismo tiempo [22]

Al comparar el porcentaje de LT CD8+ que respondían frente a los epítomos silvestres (HY9 y HA9) y sus variantes mutadas según afinidad de unión, se observó un mayor porcentaje de LT CD8+ que responden frente a variantes mutadas con alta afinidad de unión al HLA-B*35 en comparación con las variantes asociadas con baja afinidad de unión (ver Figura 3).

Variantes mutadas de los epítomos inducen una respuesta de LT CD8+ independiente de su afinidad de unión.

Al evaluar el perfil funcional de LT CD8+ en respuesta a las variantes mutadas NNSQVSQNY (H124N/S125N7N126S) y NNSKVSQNY (H124N/S125N/N126S/Q127K) asociadas con baja unión al HLA-B*35 del epítomo HY9, se observó que al igual que el péptido silvestre, los péptidos mutados inducen una respuesta funcional de los LT CD8+ (ver Figure 4). La mayoría de los individuos expresaban IFN- γ , aunque la expresión del marcador de degranulación CD107a, es menor frente al péptido H124N/S125N7N126S en comparación con el péptido silvestre (ver Figure 4F).

Adicionalmente, se observó que el estímulo con las variantes mutadas I223V, I223A y V219A/H219Q/I223V del epítomo HA9, asociadas con alta afinidad de unión al HLA-B*35, inducían una respuesta funcional de los LT CD8+, siendo significativamente mayor la frecuencia de LT CD8+ que co-expresan IFN- γ TNF- α y Granz / Perf en respuesta a la variante I223V en comparación con el péptido silvestre HA9 (ver Figure 5).

Variantes mutadas de alta afinidad de unión al HLA-B*35 inducen un porcentaje mayor de LT CD8+ con perfil polifuncional

El perfil polifuncional en el contexto de LT CD8⁺ se refiere a la capacidad de responder mediante dos o más funciones, ya sea una función no citotóxica, citotóxica o la combinación de ambas. Al comparar los epítomos silvestres de la proteína Gag con sus variantes de baja o alta afinidad, se encontró un mayor porcentaje de LT CD8⁺ que exhiben dos, tres y cinco funciones en respuesta a las variantes asociada con alta afinidad al HLA-B*35 en comparación con las variantes asociadas con baja afinidad de unión (ver Figura 6).

No se observó diferencias en la calidad de la respuesta de LT CD8⁺ frente a las variantes mutadas del epítomo HY9, asociadas con baja afinidad de unión al HLA en comparación con el péptido silvestre HY9 (ver Figura 7). Sin embargo, en el caso del epítomo HA9 y sus variantes asociadas con alta afinidad de unión al HLA-B*35, se observó un mayor número de LT CD8⁺ expresando cuatro y cinco funciones simultáneas frente al estímulo con la variante I223V comparado con la variante mutada V218A/H219Q/I223V y el epítomo silvestre HA9, respectivamente (ver Figura 8).

Discusión

Múltiples estudios han demostrado el papel crucial de los LT CD8⁺ en el control de la replicación del VIH-1, reportándose un control en la replicación del virus en la fase aguda de la infección y la eliminación de células infectadas en la fase crónica de la enfermedad [23–25] . Los LT CD8⁺ reconocen proteínas virales presentadas en el contexto de moléculas HLA clase I expresadas en la superficie celular. El reconocimiento de la proteína viral por el receptor de células T (TCR, por su nombre en inglés), junto con otras señales co-estimuladoras, inicia una cascada de eventos que permiten la producción y liberación de citoquinas y moléculas citotóxicas [26]

Los alelos HLA-I pueden presentar múltiples secuencias de péptidos [27] ; sin embargo, la activación, respuesta y expansión de los LT CD8⁺ se limita a un conjunto determinado de epítotos derivados del virus, fenómeno denominado como inmunodominancia [28] . Varios estudios han demostrado un limitado número de epítotos inmunodominantes que impactan en el control de la progresión de la infección por VIH-1 [29] , por lo que se hace crucial la identificación de estos epítotos para el diseño de vacunas terapéuticas y profilácticas.

Diferentes mecanismos pueden explicar la asociación del locus B con la progresión de la enfermedad. Uno de ellos, se relaciona con el proceso de selección del receptor de células T (TCR) a través de la presentación de péptidos propios en el contexto de moléculas codificadas por los alelos HLA [30] . Un estudio realizado por Kosmrlj y colaboradores reportó que, el alelo HLA-B*57:01, presenta pocos péptidos propios en el timo, derivando en una alta frecuencia de LT CD8⁺ que reconocen péptidos a través de un menor número de puntos aminoacídicos sin afectar la interacción entre péptidos-HLA-TCR, por lo que la presencia de variantes mutadas no afecta sustancialmente la fuerza de unión del complejo inmune. En contraste, los alelos HLA-B*07 y – B*35 presentan un alto número de péptidos propios, permitiendo la selección de LT CD8⁺ con un TCR más estricto en los puntos de contacto con el complejo péptido-HLA, por lo que mutaciones en epítotos puede llevar a pérdida del reconocimiento por parte del LT CD8⁺ [30] . Adicionalmente, se ha observado que la respuesta de LT CD8⁺ frente a epítotos derivados de la proteína Gag es más robusta y frecuente en pacientes con un control de la viremia, en ausencia de terapia antirretroviral; en contraste, respuestas restringidas a proteínas derivadas de la envoltura de VIH han sido asociadas con cargas virales altas [31–33] . En el caso de los alelos HLA- B*35, se

reportó que dichas moléculas tienden a presentar epítomos derivados de regiones altamente variables del virus como Env y otras regiones no gag [34] .

Teniendo en cuenta lo anterior, este estudio se centró en la evaluación de la respuesta de LT CD8+ estimulados con los epítomos silvestres HA9 y HY9 derivados de Gag, y sus respectivas variantes mutadas que se unen con baja o alta afinidad al HLA-B*35. En este estudio se observó un mayor porcentaje de LT CD8+ con perfil polifuncional y con expresión de GrzB/Perforina al estimular dicha subpoblación celular con variantes mutadas que presentan una alta afinidad de unión al HLA, comparado con los epítomos silvestres y variantes mutadas de baja afinidad de unión.

Inicialmente, se evaluó la respuesta de los LT CD8+ frente a los estímulos policlonales y a los péptidos específicos de VIH, con el objetivo de determinar la respuesta funcional de las células obtenidas de pacientes crónicamente infectados con y sin tratamiento antirretroviral. Los resultados demuestran competencia funcional de la población de LT CD8+ en los dos grupos de pacientes evaluados. Este hallazgo, puede estar asociado al inicio temprano de la terapia después del diagnóstico de la infección, y a que en los pacientes sin tratamiento no presentaban un deterioro clínico, ni inmunológico marcado. Durante la fase aguda de infección por VIH, en individuos que se encuentran bajo tratamiento antirretroviral, se ha observado una expansión de LT CD8+ específicos de epítomos derivados de nef y gag, junto con una respuesta altamente polifuncional [35] . En contraste, la capacidad proliferativa, la producción de citoquinas y la degranulación de moléculas citotóxicas en LT CD8+ se encuentra reducida en pacientes crónicamente infectados con tratamiento antirretroviral [36] . Sin embargo, otros estudios han sugerido que la terapia antirretroviral restaura parcialmente las funciones de los LT CD8+ [45] [46], restaura los conteos de LT CD8+ [37] , incrementa la frecuencia de LT CD8+ específicos de VIH con respuesta polifuncional y disminuye la expresión de la molécula PD-1, asociada con agotamiento inmunológico [38, 39] .

En este estudio se incluyeron 12 pacientes VIH positivos crónicamente infectados, de los cuales sólo el 25% expresan alelos HLA-B*35 Px (HLA-B*35:03 y -B*35:04). El porcentaje de LT CD8+ con respuesta específica a variantes mutadas fue heterogéneo sin observarse diferencias entre pacientes que expresan los alelos HLA-B*35 Px, -B*35 Py u otros alelos que no se encuentran dentro de esta clasificación. En este estudio, se observó respuesta de LT CD8+ a epítomos derivados de Gag y sus respectivas variantes mutada, lo cual se ha asociado con control viral en diferentes escenarios [40].

El epítipo HSNQVSQNY (HY9) se ubica en la posición 124-132 de la proteína p17, siendo este reportado como una variante observada en secuencias de VIH pertenecientes al subtipo B [41]. La variante NSSKVSQNY es un epítipo perteneciente al subtipo A y presentado en el HLA-A*01:01. Un estudio realizado por Luo M y colaboradores, evaluó el reconocimiento de variantes pertenecientes a subtipos A, B y C del péptido HY9 en pacientes que expresan el HLA-A*01:01, observando que el 80% de los pacientes presentaban respuesta específica de LT CD8+ a las variantes mutadas con una producción media de IFN- γ de 79 SFU/millón de células, postulando tolerancia en los cambios aminoacídicos reportados en las variantes de los subtipos evaluados [42]. El epítipo NSSKVSQNY se definió como un epítipo óptimo del subtipo B de VIH, asociado con inducción de IL-2 e IFN- γ en LT CD8+ estimulados con dicho péptido [43]. Este es el primer reporte en el cual se evalúa la respuesta inducida en LT CD8+ por las variantes mutadas NNSQVSQNY (H214N/S125N/N126S) y NSSKVSQNY (H124N/S125N/N126S/Q127K), reportadas por Arcia y colaboradores, observándose que más del 1% de los LT CD8+ estimulados con los epítipos silvestres y las variantes mutadas presentaban una respuesta funcional asociada con producción de IFN- γ , IL-2, TNF- α , MIP1- β , CD107a y GrzB/ Perf.

El epítipo HPVHAGPIA (HA9) se localiza en la posición 84-92 de la proteína p24 y definido como un epítipo óptimo observado en secuencias pertenecientes a los subtipos B y D [41]. Los LT CD8+ estimulados con el epítipo HPVHAGPIA induce una alta producción de IFN- γ en pacientes que expresan el alelo HLA-B*35; sin embargo, se postula que las células restringidas a dicho epítipo carecen del potencial proliferativo en individuos crónicamente infectados, dado que no se reporta producción de IL-2 [44], citoquina esencial para la expansión de subpoblaciones de linfocitos T [45]. La variante mutada HPVHAGPVA (I223V) fue reportada por Jessen H y colaboradores [46]; sin embargo, no se ha reportado el perfil funcional de LT CD8+ restringido a esta variante mutada, al igual que para las variantes mutadas HPVHAGPAA (I223A) y HPAQAGPVA (V218A/H219Q/I223V). Este es el primer estudio en el que se evalúa la producción de citoquinas y moléculas citotóxicas, observándose LT CD8+ IL-2+ en el 50% de los pacientes estimulados con el epítipo HA9; además, la producción de IL-2 no se limitó a epítipos silvestres, también se cuantificaron células productoras de esta citoquina al estimular con las variantes mutadas derivadas del epítipo HA9.

La adecuada unión del epítipo a la molécula HLA es requerido para el reconocimiento por parte del TCR del LT CD8+ [47]. Un estudio realizado en un modelo murino sugiere que la unión

estable del epítipo viral a la molécula HLA puede contribuir a la inmunogenicidad del epítipo [48] ; además, se ha reportado que la afinidad de unión del péptido al HLA correlaciona con inmunodominancia [47] . Un estudio realizado por Hebeisen y colaboradores reportó que uniones epítipo-HLA dentro de los rangos fisiológicos ($KD=100-1 \mu M$) potencian la unión TCR-pMHC, relacionándose directamente con la funcionalidad de linfocito T [49] ; además, se ha sugerido que la polifuncionalidad en LT CD8+ puede correlacionarse con el control del virus [50] . En este estudio se observó una asociación entre el perfil funcional de LT CD8+ y el estímulo con variantes mutadas de alta afinidad de unión a moléculas HLA. Las variantes de alta afinidad de unión al HLA-B*35, presentan una mayor respuesta polifuncional a expensas de la expresión de dos, tres y cinco mecanismos efectores e inducen un mayor porcentaje de LT CD8+ GrzB+ Perf+ comparado con los epítipos silvestres. Estos hallazgos plantean la importancia de la afinidad de unión de epítipos al HLA en la inducción de una respuesta efectora de LT CD8+ con actividad antiviral.

La afinidad de unión de los péptidos a moléculas MHC es el resultado de una continua asociación y disociación de la molécula HLA [51] , donde sustituciones aminoacídicas en sitios críticos de epítipos de VIH puede afectar la presentación antigénica, reduciendo dicha afinidad de unión y debilitando el complejo TCR-HLA-epítipo [52, 53] . Las variantes mutadas con alta afinidad de unión al HLA-B*35 presentan cambios en el extremo C-terminal del péptido, postulando que dichas variaciones en la secuencia de aminoácidos podrían estar aportando a la disminución en la tasa de disociación de estos epítipos, y por lo tanto a mantener la estabilidad de presentación por un mayor tiempo, lo cual permitiría que clones de LT CD8+ específicos puedan reconocer y activarse apropiadamente a través del reconocimiento por parte del TCR [54, 55] .

La habilidad de LT CD8+ para sintetizar moléculas citotóxicas como la Granzima B y la Perforina, posterior al encuentro con un epítipo específico, juega un papel importante en la eliminación de células infectadas por virus [56] . La expresión de Granzima B, una de las más potentes granzimas proapoptóticas, por LT CD8+ específicas para epítipos de VIH se asocia con control de la replicación [57] lo cual se ha asociado con la capacidad de mediar rápidamente la eliminación de LT CD4+ infectados con VIH [39] . En el caso de perforina, su expresión se ha observado en LT CD8+ específicos para VIH de individuos controladores elites/no progresores a largo término, presentando una correlación inversa entre la replicación del virus y la proliferación de esta subpoblación celular [58, 59].

Conclusiones

Los resultados de este estudio indican que variantes mutadas derivadas de los epítomos HA9 HY9, reportadas por Arcia y colaboradores [19] , inducen una respuesta en los LT CD8+ de pacientes que expresan el alelo HLA-B*35. Sumado a lo anterior, se observó que las variantes mutadas de alta afinidad derivadas del epítomo HPVHAGPIA inducen un mayor porcentaje de LT CD8+ con perfil polifuncional y, los LT CD8+ específicos para I223V presentan una respuesta efectora citotóxica, la cual podría participar en la eliminación de células infectadas. Estos hallazgos plantean la necesidad de identificar las mutaciones dentro de epítomos restringidos al HLA-B*35 con el fin de identificar potenciales péptidos que aporten al desarrollo de una respuesta antiviral y puedan ser incluidos en el diseño de una vacuna para la región.

Limitaciones

En el presente estudio, no se realizaron análisis de TCR para definir el repertorio de clones de LT CD8+, lo cual podría aportar al entendimiento de la respuesta de esta subpoblación a variantes mutadas y su aporte a los mecanismos de co-adaptación del virus frente a respuestas de LT CD8+ a nivel del complejo epítipo-HLA-TCR. Sumado a lo anterior, no se realizaron ensayos de estabilidad de unión entre epítipos-HLA-B*35.

Referencias

1. UNAIDS: “Joint United Nations Programme on HIV/AIDS (UNAIDS.” Unaid. 2020.
2. UNAIDS: “Joint United Nations Programme on HIV/AIDS (UNAIDS.” Unaid. 2019.
3. K.L. Clayton, D.R. Collins, J. Lengieza, M. Ghebremichael, F. Dotiwala, J. Lieberman, and B.D. Walker: “Resistance of HIV-infected macrophages to CD8 + T lymphocyte-mediated killing drives activation of the immune system article.” *Nat. Immunol.* 2018.
4. M.P. Martin and M. Carrington: “Immunogenetics of HIV disease.” *Immunol. Rev.* 2013.
5. P. Kiepiela, A.J. Leslie, I. Honeyborne, D. Ramduth, C. Thobakgale, S. Chetty, P. Rathnavalu, C. Moore, K.J. Pfafferott, L. Hilton, P. Zimbwa, S. Moore, T. Allen, C. Brander, M.M. Addo, M. Altfeld, I. James, S. Mallal, M. Bunce, L.D. Barber, J. Szinger, C. Day, P. Klenerman, J. Mullins, B. Korber, H.M. Coovadia, B.D. Walker, and P.J. Goulder: “Dominant influence of HLA-B in mediating the potential co-evolution of HIV and HLA.” *Nature.* vol. 432, no. 7018, pp. 769–775, 2004.
6. A. Leslie, P.C. Matthews, J. Listgarten, J.M. Carlson, C. Kadie, T. Ndung’u, C. Brander, H. Coovadia, B.D. Walker, D. Heckerman, and P.J.R. Goulder: “Additive Contribution of HLA Class I Alleles in the Immune Control of HIV-1 Infection.” *J. Virol.* 2010.
7. P.J.R. Goulder and B.D. Walker: “HIV and HLA Class I: An Evolving Relationship.” *Immunity.* vol. 37, no. 3, pp. 426–440, 2012.
8. P. Kiepiela, A.J. Leslie, I. Honeyborne, D. Ramduth, C. Thobakgale, S. Chetty, P. Rathnavalu, C. Moore, K.J. Pfafferott, L. Hilton, P. Zimbwa, S. Moore, T. Allen, C. Brander, M.M. Addo, M. Altfeld, I. James, S. Mallal, M. Bunce, L.D. Barber, J. Szinger, C. Day, P. Klenerman, J. Mullins, B. Korber, H.M. Coovadia, B.D. Walker, and P.J.R. Goulder: “Dominant influence of HLA-B in mediating the potential co-evolution of HIV and HLA.” *Nat.* 2005 4327018. vol. 432, no. 7018, pp. 769–775, 2004.

9. B. Mothe, A. Llano, J. Ibarondo, M. Daniels, C. Miranda, J. Zamarreño, V. Bach, R. Zuniga, S. Pérez-Álvarez, C.T. Berger, M.C. Puertas, J. Martinez-Picado, M. Rolland, M. Farfan, J.J. Szinger, W.H. Hildebrand, O.O. Yang, V. Sanchez-Merino, C.J. Brumme, Z.L. Brumme, D. Heckerman, T.M. Allen, J.I. Mullins, G. Gómez, P.J. Goulder, B.D. Walker, J.M. Gatell, B. Clotet, B.T. Korber, J. Sanchez, and C. Brander: “Definition of the viral targets of protective HIV-1-specific T cell responses.” *J. Transl. Med.* 2011.
10. T. Hanke: “Conserved immunogens in prime-boost strategies for the next-generation HIV-1 vaccines,” (2014).
11. L.M. Rodríguez, M.C. Giraldo, N. García, L. Velásquez, S.C. París, C.M. Álvarez, and L.F. García: “Human leucocyte antigen gene (HLA-A, HLA-B, HLA-DRB1) frequencies in deceased organ donor.” *Biomedica.* vol. 27, no. 4, pp. 537–547, 2007.
12. C. M, N. GW, M. MP, K. T, V. D, G. JJ, K. R, B. S, H. K, and O. SJ: “HLA and HIV-1: heterozygote advantage and B*35-Cw*04 disadvantage.” *Science.* vol. 283, no. 5408, pp. 1748–1752, 1999.
13. J.M.C. Angulo, T.A.C. Cuesta, E.P. Menezes, C. Pedroso, and C. Brites: “A SYSTEMATIC REVIEW ON THE INFLUENCE OF HLA-B POLYMORPHISMS ON HIV-1 MOTHER-TO-CHILD-TRANSMISSION,” (2019).
14. P.C. Matthews, M. Koyanagi, H.N. Kløverpris, M. Harndahl, A. Stryhn, T. Akahoshi, H. Gatanaga, S. Oka, C.J. Molina, H.V. Ponce, S.A. Rios, D. Cole, J. Carlson, R.P. Payne, A. Ogwu, A. Bere, T. Ndung’u, K. Gounder, F. Chen, L. Riddell, G. Luzzi, R. Shapiro, C. Brander, B. Walker, A.K. Sewell, G.R. Teran, D. Heckerman, E. Hunter, S. Buus, M. Takiguchi, and P.J.R. Goulder: “Differential Clade-Specific HLA-B*3501 Association with HIV-1 Disease Outcome Is Linked to Immunogenicity of a Single Gag Epitope.” *J. Virol.* vol. 86, no. 23, pp. 12643, 2012.
15. X. Gao, G.W. Nelson, P. Karacki, M.P. Martin, J. Phair, R. Kaslow, J.J. Goedert, S. Buchbinder, K. Hoots, D. Vlahov, S.J. O’Brien, and M. Carrington: “Effect of a Single Amino Acid Change in MHC Class I Molecules on the Rate of Progression to AIDS.” <http://dx.doi.org/10.1056/NEJM200105313442203>. vol. 344, no. 22, pp. 1668–1675, 2009.

16. X. Gao, G.W. Nelson, P. Karacki, M.P. Martin, J. Phair, R. Kaslow, J.J. Goedert, S. Buchbinder, K. Hoots, D. Vlahov, S.J. O'Brien, and M. Carrington: "Effect of a Single Amino Acid Change in MHC Class I Molecules on the Rate of Progression to AIDS." *N. Engl. J. Med.* 2001.
17. C.B. Willberg, K.E. Garrison, R.B. Jones, D.J. Meiklejohn, G. Spotts, T.J. Liegler, M.A. Ostrowski, A.C. Karlsson, F.M. Hecht, and D.F. Nixon: "Rapid Progressing Allele HLA-B35 Px Restricted Anti-HIV-1 CD8+ T Cells Recognize Vestigial CTL Epitopes." *PLoS One.* 2010.
18. J. Huang, J.J. Goedert, E.J. Sundberg, T.D.H. Cung, P.S. Burke, M.P. Martin, L. Preiss, J. Lifson, M. Lichterfeld, M. Carrington, and X.G. Yu: "HLA-B*35-Px-mediated acceleration of HIV-1 infection by increased inhibitory immunoregulatory impulses." *J. Exp. Med.* 2009.
19. D. Arcia, R. Ochoa, J.C. Hernández, C.M. Álvarez, F.J. Díaz, P.A. Velilla, and L. Acevedo-Sáenz: "Potential immune escape mutations under inferred selection pressure in HIV-1 strains circulating in Medellín, Colombia." *Infect. Genet. Evol.* 2019.
20. B. Sahay, C.Q. Nguyen, and J.K. Yamamoto: "Conserved HIV Epitopes for an Effective HIV Vaccine." *J. Clin. Cell. Immunol.* 2017.
21. G. Turk, M.M. Gherardi, N. Laufer, M. Saracco, R. Luzzi, J.H. Cox, P. Cahn, and H. Salomon: "Magnitude, Breadth, and Functional Profile of T-Cell Responses during Human Immunodeficiency Virus Primary Infection with B and BF Viral Variants." *J. Virol.* 2008.
22. J. Vitallé, I. Terrén, L. Gamboa-Urquijo, A. Orrantia, L. Tarancón-Díez, M. Genebat, M. Leal, E. Ruiz-Mateos, F. Borrego, and O. Zenarruzabeitia: "Polyfunctional HIV-1 specific response by CD8+ T lymphocytes expressing high levels of CD300a." *Sci. Rep.* 2020.
23. B.J.C. Macatangay and C.R. Rinaldo: "Preserving HIV-specific T cell responses: Does timing of antiretroviral therapy help?," (2015).
24. N. Goonetilleke, M.K.P. Liu, J.F. Salazar-Gonzalez, G. Ferrari, E. Giorgi, V. V. Ganusov, B.F. Keele, G.H. Learn, E.L. Turnbull, M.G. Salazar, K.J. Weinhold, S. Moore, N. Letvin, B.F. Haynes, M.S. Cohen, P. Hraber, T. Bhattacharya, P. Borrow, A.S. Perelson, B.H. Hahn, G.M. Shaw, B.T.

Korber, and A.J. McMichael: “The first T cell response to transmitted/founder virus contributes to the control of acute viremia in HIV-1 infection.” *J. Exp. Med.* vol. 206, no. 6, pp. 1253–72, 2009.

25. V. Appay, L. Papagno, C.A. Spina, P. Hansasuta, A. King, L. Jones, G.S. Ogg, S. Little, A.J. McMichael, D.D. Richman, and S.L. Rowland-Jones: “Dynamics of T Cell Responses in HIV Infection.” *J. Immunol.* vol. 168, no. 7, pp. 3660–3666, 2002.

26. R.B. Jones and B.D. Walker: “HIV-specific CD8⁺ T cells and HIV eradication,” (2016).

27. V. R, M. S, O. JA, D. SK, M. S, C. JR, W. DK, S. A, and P. B: “The Immune Epitope Database (IEDB): 2018 update.” *Nucleic Acids Res.* vol. 47, no. D1, pp. D339–D343, 2019.

28. Y. JW: “Confronting complexity: real-world immunodominance in antiviral CD8⁺ T cell responses.” *Immunity.* vol. 25, no. 4, pp. 533–543, 2006.

29. Y. Yagita, N. Kuse, K. Kuroki, H. Gatanaga, J.M. Carlson, T. Chikata, Z.L. Brumme, H. Murakoshi, T. Akahoshi, N. Pfeifer, S. Mallal, M. John, T. Ose, H. Matsubara, R. Kanda, Y. Fukunaga, K. Honda, Y. Kawashima, Y. Ariumi, S. Oka, K. Maenaka, and M. Takiguchi: “Distinct HIV-1 Escape Patterns Selected by Cytotoxic T Cells with Identical Epitope Specificity.” *J. Virol.* 2013.

30. A. Košmrlj, E.L. Read, Y. Qi, T.M. Allen, M. Altfeld, S.G. Deeks, F. Pereyra, M. Carrington, B.D. Walker, and A.K. Chakraborty: “Effects of thymic selection of the T cell repertoire on HLA-class I associated control of HIV infection.” *Nature.* vol. 465, no. 7296, pp. 350, 2010.

31. P. Kiepiela, K. Ngumbela, C. Thobakgale, D. Ramduth, I. Honeyborne, E. Moodley, S. Reddy, C. De Pierres, Z. Mncube, N. Mkhwanazi, K. Bishop, M. Van Der Stok, K. Nair, N. Khan, H. Crawford, R. Payne, A. Leslie, J. Prado, A. Prendergast, J. Frater, N. McCarthy, C. Brander, G.H. Learn, D. Nickle, C. Rousseau, H. Coovadia, J.I. Mullins, D. Heckerman, B.D. Walker, and P. Goulder: “CD8⁺T-cell responses to different HIV proteins have discordant associations with viral load.” *Nat. Med.* vol. 13, no. 1, pp. 46–53, 2007.

32. H. Chen, A. Piechocka-Trocha, T. Miura, M.A. Brockman, B.D. Julg, B.M. Baker, A.C. Rothchild, B.L. Block, A. Schneidewind, T. Koibuchi, F. Pereyra, T.M. Allen, and B.D. Walker:

“Differential Neutralization of Human Immunodeficiency Virus (HIV) Replication in Autologous CD4 T Cells by HIV-Specific Cytotoxic T Lymphocytes.” *J. Virol.* vol. 83, no. 7, pp. 3138, 2009.

33. B. Julg, K.L. Williams, S. Reddy, K. Bishop, Y. Qi, M. Carrington, P.J. Goulder, T. Ndung’u, and B.D. Walker: “Enhanced Anti-HIV Functional Activity Associated with Gag-Specific CD8 T-Cell Responses.” *J. Virol.* vol. 84, no. 11, pp. 5540–5549, 2010.

34. H. Tomiyama, K. Miwa, H. Shiga, Y.I. Moore, S. Oka, A. Iwamoto, Y. Kaneko, and M. Takiguchi: “Evidence of presentation of multiple HIV-1 cytotoxic T lymphocyte epitopes by HLA-B*3501 molecules that are associated with the accelerated progression of AIDS.” *J. Immunol.* vol. 158, no. 10, 1997.

35. J. Salido, M.J. Ruiz, C. Trifone, M.I. Figueroa, M.P. Caruso, M.M. Gherardi, O. Sued, H. Salomón, N. Laufer, Y. Ghiglione, and G. Turk: “Phenotype, polyfunctionality, and antiviral activity of in vitro stimulated CD8+ T-Cells From HIV+ subjects who initiated cART at different time-points after acute infection.” *Front. Immunol.* 2018.

36. S.A. Migueles, K.A. Weeks, E. Nou, A.M. Berkley, J.E. Rood, C.M. Osborne, C.W. Hallahan, N.A. Cogliano-Shutta, J.A. Metcalf, M. McLaughlin, R. Kwan, J.M. Mican, R.T. Davey, and M. Connors: “Defective Human Immunodeficiency Virus-Specific CD8 + T-Cell Polyfunctionality, Proliferation, and Cytotoxicity Are Not Restored by Antiretroviral Therapy .” *J. Virol.* 2009.

37. A.K. Pau and J.M. George: “Antiretroviral therapy: Current drugs,” (2014).

38. M. Rehr, J. Cahenzli, A. Haas, D.A. Price, E. Gostick, M. Huber, U. Karrer, and A. Oxenius: “Emergence of Polyfunctional CD8 + T Cells after Prolonged Suppression of Human Immunodeficiency Virus Replication by Antiretroviral Therapy .” *J. Virol.* 2008.

39. S.A. Migueles, C.M. Osborne, C. Royce, A.A. Compton, R.P. Joshi, K.A. Weeks, J.E. Rood, A.M. Berkley, J.B. Sacha, N.A. Cogliano-Shutta, M. Lloyd, G. Roby, R. Kwan, M. McLaughlin, S. Stallings, C. Rehm, M.A. O’Shea, J.A. Mican, B.Z. Packard, A. Komoriya, S. Palmer, A.P. Wiegand, F. Maldarelli, J.M. Coffin, J.W. Mellors, C.W. Hallahan, D.A. Follman, and M. Connors: “Lytic Granule Loading of CD8+ T Cells Is Required for HIV-Infected Cell Elimination Associated with Immune Control.” *Immunity.* 2008.

40. R. Zuniga, A. Lucchetti, P. Galvan, S. Sanchez, C. Sanchez, A. Hernandez, H. Sanchez, N. Frahm, C.H. Linde, H.S. Hewitt, W. Hildebrand, M. Altfeld, T.M. Allen, B.D. Walker, B.T. Korber, T. Leitner, J. Sanchez, and C. Brander: “Relative Dominance of Gag p24-Specific Cytotoxic T Lymphocytes Is Associated with Human Immunodeficiency Virus Control.” *J. Virol.* vol. 80, pp. 3122–3125, 2006.
41. A.A.R. Antar, K.M. Jenike, S. Jang, D.N. Rigau, D.B. Reeves, R. Hoh, M.R. Krone, J.C. Keruly, R.D. Moore, J.T. Schiffer, B.A.S. Nonyane, F.M. Hecht, S.G. Deeks, J.D. Siliciano, Y.-C. Ho, and R.F. Siliciano: “Longitudinal study reveals HIV-1–infected CD4+ T cell dynamics during long-term antiretroviral therapy.” *J. Clin. Invest.* vol. 130, no. 7, pp. 3543, 2020.
42. M. Luo, C.A. Daniuk, T.O. Diallo, R.E. Capina, J. Kimani, C. Wachihi, M. Kimani, T. Bielawny, T. Peterson, M.G.R. Mendoza, S. Kiazzyk, T.B. Ball, and F.A. Plummer: “For Protection from HIV-1 Infection, More Might Not Be Better: a Systematic Analysis of HIV Gag Epitopes of Two Alleles Associated with Different Outcomes of HIV-1 Infection.” *J. Virol.* vol. 86, no. 2, pp. 1166, 2012.
43. Y. Peretz, O. Marra, R. Thomas, D. Legault, P. Côté, M.-R. Boulassel, D. Rouleau, J.-P. Routy, R.-P. Sékaly, C.M. Tsoukas, C. Tremblay, and N.F. Bernard: “Relative Contribution of HIV-Specific Functional Lymphocyte Subsets Restricted by Protective and Non-Protective HLA Alleles.” *Viral Immunol.* vol. 24, pp. 189–198, 2011.
44. W. SJ, G. N, and I. N: “Novel approach to recognition of predicted HIV-1 Gag B3501-restricted CD8 T-cell epitopes by HLA-B3501(+) patients: confirmation by quantitative ELISpot analyses and characterisation using multimers.” *J. Immunol. Methods.* vol. 341, no. 1–2, pp. 76–85, 2009.
45. T.R. Malek: “The Biology of Interleukin-2.” <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.immunol.26.021607.090357>. vol. 26, pp. 453–479, 2008.
46. H. Jessen, T.M. Allen, and H. Streeck: “How a Single Patient Influenced HIV Research — 15-Year Follow-up.” *N. Engl. J. Med.* 2014.

47. E. Assarsson, J. Sidney, C. Oseroff, V. Paschetto, H.-H. Bui, N. Frahm, C. Brander, B. Peters, H. Grey, and A. Sette: "A Quantitative Analysis of the Variables Affecting the Repertoire of T Cell Specificities Recognized after Vaccinia Virus Infection." *J. Immunol.* 2007.
48. D.H. Busch and E.G. Pamer: "MHC class I/peptide stability: implications for immunodominance, in vitro proliferation, and diversity of responding CTL." *J. Immunol.* 1998.
49. M. Hebeisen, M. Allard, P.O. Gannon, J. Schmidt, D.E. Speiser, and N. Rufer: "Identifying individual T cell receptors of optimal avidity for tumor antigens," (2015).
50. C. Riou, W.A. Burgers, K. Mlisana, R.A. Koup, M. Roederer, S.S. Abdool Karim, C. Williamson, and C.M. Gray: "Differential Impact of Magnitude, Polyfunctional Capacity, and Specificity of HIV-Specific CD8⁺ T Cell Responses on HIV Set Point." *J. Virol.* 2014.
51. S.H. van der Burg, M.J. Visseren, R.M. Brandt, W.M. Kast, and C.J. Melief: "Immunogenicity of peptides bound to MHC class I molecules depends on the MHC-peptide complex stability." *J. Immunol.* 1996.
52. P.J.R. Goulder and D.I. Watkins: "HIV and SIV CTL escape: Implications for vaccine design," (2004).
53. J.D. Altman and M.B. Feinberg: "HIV escape: There and back again," (2004).
54. V. Levitsky, Q.J. Zhang, J. Levitskaya, and M.G. Masucci: "The life span of major histocompatibility complex-peptide complexes influences the efficiency of presentation and immunogenicity of two class I-restricted cytotoxic T lymphocyte epitopes in the Epstein-Barr virus nuclear antigen 4." *J. Exp. Med.* 1996.
55. M. Harndahl, M. Rasmussen, G. Roder, I. Dalgaard Pedersen, M. Sørensen, M. Nielsen, and S. Buus: "Peptide-MHC class I stability is a better predictor than peptide affinity of CTL immunogenicity." *Eur. J. Immunol.* 2012.
56. A. Malyguine, S. Strobl, L. Zaritskaya, M. Baseler, and K. Shafer-Weaver: "New approaches for monitoring CTL activity in clinical trials." *Advances in Experimental Medicine and Biology* (2007).

57. I. Voskoboinik, J.C. Whisstock, and J.A. Trapani: “Perforin and granzymes: Function, dysfunction and human pathology,” (2015).

58. S.A. Migueles, A.C. Laborico, W.L. Shupert, M.S. Sabbaghian, R. Rabin, C.W. Hallahan, D. Van Baarle, S. Kostense, F. Miedema, M. McLaughlin, L. Ehler, J. Metcalf, S. Liu, and M. Connors: “HIV-specific CD8+ T cell proliferation is coupled to perforin expression and is maintained in nonprogressors.” *Nat. Immunol.* 2002.

59. A.R. Hersperger, F. Pereyra, M. Nason, K. Demers, P. Sheth, L.Y. Shin, C.M. Kovacs, B. Rodriguez, S.F. Sieg, L. Teixeira-Johnson, D. Gudonis, P.A. Goepfert, M.M. Lederman, I. Frank, G. Makedonas, R. Kaul, B.D. Walker, and M.R. Betts: “Perforin expression directly ex vivo by HIV-specific CD8+ T-cells is a correlate of HIV elite control.” *PLoS Pathog.* vol. 6, no. 5, pp. 1–13, 2010.