

Efecto de la sulfasalazina sobre la capacidad funcional de los linfocitos T CD8⁺ de individuos con infección por el VIH

Alexander Bustamante Córdoba

Artículo de investigación presentado Para optar al título de Biólogo

Asesores

Natalia Taborda Vanegas, Doctor (PhD) en Ciencias Basicas Biomedicas

Maria Teresa Rúgeles López, Doctor (PhD) en Ciencias Basicas Biomedicas

Federico Perdomo Celis, PostDoctor (PostDoc)

Universidad de Antioquia

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Biología

El Carmen de Viboral, Antioquia, Colombia

2022

Cita	(Bustamante Alexander, 2022)
Referencia	BustamanteAlexander, (2022). <i>Efecto de la sulfasalazina sobre la capacidad funcional de los linfocitos T CD8⁺ de individuos con infección por el VIH.</i> [Trabajo de grado profesional]. Universidad de Antioquia, El Carmen de Viboral, Colombia.
Estilo APA 7 (2020)	



Grupo de Investigación Inmunovirología.
Sede de Investigación Universitaria (SIU).



Biblioteca Seccional Oriente (El Carmen de Viboral)

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

Universidad de Antioquia - www.udea.edu.co

Rector: John Jairo Arboleda Céspedes.

Decano/Director: Adriana Echevarria

Jefe departamento: Esperanza Franco

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.

EFFECTO DE LA SULFASALAZINA SOBRE LA CAPACIDAD FUNCIONAL DE LOS LINFOCITOS T CD8⁺ DE INDIVIDUOS CON INFECCIÓN POR EL VIH

Alexander Bustamante Córdoba, Federico Perdomo-Celis, Manuel G. Feria, María T. Rugeles, Natalia A. Taborda,

Resumen

Los individuos infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) exhiben un estado inflamatorio sistémico que inicia desde la fase aguda de la infección. Este proceso se explica particularmente por la translocación de productos microbianos desde el lumen intestinal hacia la circulación sistémica. Aunque la terapia antirretroviral (TAR) limita la replicación del VIH-1, no reconstituye completamente los niveles de activación ni las funciones inmunes en diferentes tipos celulares, incluyendo los linfocitos T (LT) CD8⁺. Dado que estos últimos son cruciales para el control de la replicación del VIH, se hace necesaria la búsqueda de estrategias que permitan modular el grado de activación inmune y que promuevan la capacidad efectora de estas células. Por lo tanto, en este estudio se evaluó el efecto *in vitro* de la sulfasalazina (SSZ) sobre la activación celular y la capacidad funcional de los LT CD8⁺. Se observó que la SSZ disminuye los niveles de IL-6 e IL-1 β y, además, aumenta la capacidad de degranulación y expresión de moléculas citotóxicas. Estos resultados sugieren que este medicamento podría tener potencial como terapia complementaria a la TAR, reduciendo la inflamación y promoviendo la restauración inmunológica.

Introducción

La infección por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) sigue siendo un problema de salud pública, con 38.4 millones de personas viviendo con el virus (ONUSIDA 2021) (1). Una de las principales características de esta infección consiste en la alteración de la integridad de la mucosa del tracto gastrointestinal, generando translocación de productos microbianos del lumen del intestino a la circulación sistémica y, en consecuencia, induciendo la activación de la respuesta inflamatoria; se han reportado niveles altos de lipopolisacárido (LPS) en circulación sistémica de individuos con infección por el VIH (2,3). El LPS es una molécula con capacidad de activar la respuesta inflamatoria mediante la unión al receptor tipo Toll-4 (TLR-4), lo que genera una cascada de señalización que conduce a la producción de citoquinas proinflamatorias como la interleuquina (IL) 1 β , la IL-6, el factor de necrosis tumoral (TNF)- α , y los interferones tipo I (IFN- α e IFN- β) (4). En conjunto, este ambiente inflamatorio lleva a un estado de activación inmune persistente que reduce progresivamente la capacidad funcional de diversas células del sistema inmune, lo que se conoce como agotamiento inmunológico (2,5).

Los linfocitos T (LT) CD8⁺ son críticos en la respuesta inmune contra la infección por el VIH, ya que ayudan en la eliminación de células infectadas y disminuyen los niveles de carga viral (6). Para lograr el control viral, los LT CD8⁺ producen citoquinas, con efecto antiviral, como el IFN- γ

y además, requieren de un programa citolítico con adecuada capacidad de degranulación y contenido óptimo de granzima B y perforina en los gránulos líticos o citotóxicos (7)(8)(9). Los gránulos líticos son lisosomas secretores cuyo núcleo está rodeado por una bicapa lipídica que contiene numerosas glicoproteínas de membrana asociadas a lisosomas (LAMP), que incluyen CD107a (LAMP-1), CD107b (LAMP-2) y CD63 (LAMP-3). Durante el proceso de degranulación, la membrana del gránulo lítico se fusiona con la membrana plasmática de los LT CD8⁺ activados y el contenido del gránulo se libera para atacar la célula blanco (10–12).

Los LT CD8⁺ se ven afectados por la persistencia antigénica y el aumento sostenido de citoquinas inflamatorias en individuos con infección por el VIH. Debido al estímulo continuo a través de su receptor de antígeno (TCR) o por receptores de citoquinas inflamatorias, los LT CD8⁺ adquieren una alta expresión de los marcadores de activación HLA-DR y CD38 (13), y experimentan una disminución en la producción de moléculas antivirales y una baja capacidad citolítica (14). Estudios de nuestro grupo de investigación han demostrado igualmente una baja capacidad de degranulación de LT CD8⁺ en individuos con infección por el VIH a pesar de la supresión viral inducida por la terapia antirretroviral (TAR), asociado al proceso inflamatorio sistémico (15), lo que podría afectar su actividad antiviral frente al VIH y el control de otros patógenos oportunistas.

Aunque la TAR suprime la replicación del VIH y disminuye parcialmente el estado de inflamación sistémica y de activación inmune, los individuos mantienen un grado de inflamación residual que se asocia con el desarrollo de comorbilidades (16). Estos trastornos se asocian con una alta carga de mortalidad en individuos con infección por el VIH que reciben TAR (17). Por lo tanto, diversos estudios actualmente se enfocan en la búsqueda de estrategias inmunomoduladoras que permitan contrarrestar la activación inmune generada por esta infección (18). Diversos agentes antiinflamatorios, tales como el ácido acetilsalicílico, estatinas e hidroxiclороquina, se han evaluado en individuos con infección por el VIH en tratamiento antirretroviral para modular la activación de monocitos (19), la expresión de marcadores de activación, el agotamiento funcional de los LT (20), y la expresión de IL-6 y el TNF- α (21), respectivamente. Además de estos agentes inmunomoduladores, recientemente ha cobrado importancia la sulfasalazina (SSZ). Este es un agente antiinflamatorio compuesto por el antibiótico sulfapiridina y el ácido 5-aminosalicílico, que se utiliza en el tratamiento de la artritis reumatoide y la enfermedad inflamatoria intestinal (22). Aunque su mecanismo de acción no ha sido completamente dilucidado, se ha demostrado que la SSZ inhibe la activación de macrófagos (23), la secreción de TNF- α (24), e induce la muerte de LT activados (25). Por lo tanto, la SSZ podría modular el estado inflamatorio en individuos con infección por el VIH, lo que podría ayudar a reconstituir las funciones inmunológicas. De hecho, estudios previos de nuestro grupo de investigación demuestran que el tratamiento *in vitro* con la SSZ disminuye la activación del complejo molecular conocido como inflamosoma, y la consecuente producción de IL-1 β (26). Adicionalmente, empleando células mononucleares de individuos con infección por el VIH que recibían TAR, se demostró que el tratamiento con SSZ *in vitro* induce la muerte de LT CD8⁺ activados y posiblemente con baja capacidad funcional, y aumenta la proporción de células productoras de IL-17 e IFN- γ (27). En conjunto, estos datos sugieren que la SSZ podría ser empleada como un complemento a la TAR, para modular los diversos trastornos inflamatorios en individuos con infección por el VIH, y para promover la capacidad funcional de los LT CD8⁺. Por lo tanto, en este trabajo se evaluó el efecto *in vitro* de la

SSZ sobre la producción de citoquinas proinflamatorias, la expresión de moléculas citotóxicas y la capacidad de degranulación de los LT CD8⁺ de individuos con infección por el VIH que reciben TAR.

Metodología

Pacientes

Este estudio fue aprobado por el comité de ética de la Sede de Investigación Universitaria de la Universidad de Antioquia (certificados 15-08-634 y 11-08-352). Los procedimientos siguieron los principios expresados en la Declaración de Helsinki. Todos los individuos firmaron el consentimiento informado previa inclusión al estudio. Se incluyeron individuos con infección por el VIH que recibían TAR (n= 10), mayores de 18 años, con carga viral <50 copias de ARN viral/mL durante más de un año, y con un conteo de LT CD4 >200 células/μL. Se excluyeron mujeres en estado de embarazo, individuos que presentaban falla terapéutica, o individuos con trastornos inflamatorios crónicos. Adicionalmente, se incluyeron como controles 10 voluntarios adultos seronegativos para VIH. En el momento de la inclusión al estudio, a cada individuo se le realizó un examen médico y un recuento sanguíneo completo para excluir falla terapéutica (en individuos con infección por el VIH) o alguna enfermedad activa (en individuos sanos).

Obtención de células mononucleares de sangre periférica

De cada individuo, se recolectaron 10 mL de sangre venosa en tubos con EDTA, de los cuales se tomaron 500μL para determinar el conteo de linfocitos total por medio de citometría de flujo. La sangre se centrifugó a 300 x g y con el plasma obtenido se determinó la carga viral en los individuos con infección por el VIH, con la prueba de diagnóstico clínico RT-PCR Ampliprep-Cobas (Roche, Indianapolis, IN, USA), siguiendo el protocolo del fabricante, con un límite de detección de 50 copias de ARN/mL. Las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) se obtuvieron por medio de un gradiente de densidad de Ficoll (Ficoll Histopaque 1077, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), seguido de conteo celular por medio de tinción de exclusión con azul de tripano en la cámara de Neubauer. Posteriormente, las células se lavaron con medio completo (RPMI 1640 suplementado con suero fetal bovino 10%, penicilina 100 U/mL, estreptomicina 100 ug/mL y L-glutamina 2mM).

Estimulación de CMSP y tratamiento con sulfasalazina

Las CMSP se depositaron en placas de cultivo de 48 pozos (Cellstar Greiner bio-one, GmbH, Kremsmuenster, Austria) a una densidad de 2×10^6 células/mL en un volumen total de 400 uL por pozo, y se incubaron durante 24 horas a 37°C en atmósfera de CO₂ del 5% en medio completo que contenía 100 ng/mL de LPS (Invivogen, San Diego, CA), así como en presencia o ausencia de SSZ 1mM (Sigma-Aldrich). Luego del tratamiento con SSZ, se recolectó el sobrenadante, y en una fracción de las células se realizó tinción por citometría de flujo para evaluar la viabilidad celular

utilizando un estuche comercial (Viability dye 506, Thermo Fisher, Cleveland, OH, USA). Posteriormente, las células se estimularon con forbol-12-miristato-13-acetato más ionomicina (PMA/iono) a una concentración de 50 y 500 ng/mL, respectivamente (ambos de Sigma-Aldrich), y se incubaron durante 6 horas a 37°C en 5% de CO₂, todas en presencia de una solución que contenía el anticuerpo anti-CD107a marcado con aloficocianina (APC), (BD FastImmune, San Diego, CA, USA), más 10 µg/mL de brefeldina A y 10 µg/mL monensina (Thermo Fisher).

Cuantificación de la producción de citoquinas proinflamatorias

Se evaluaron los niveles de IL-1β e IL-6 en sobrenadante de cultivo celular como indicador del ambiente inflamatorio, a través de citometría de flujo basada en esferas, usando los estuches comerciales IL-1β e IL-6 Flex Set (BD).

Evaluación de la capacidad funcional de los LT CD8⁺

Pasado el tiempo de incubación con SSZ y de la estimulación con PMA/iono, se recolectaron las células, se adicionaron a tubos de 12x75 mm de poliestireno, y se lavaron con 1 mL de PBS 1X, centrifugando a 364 x g por 5 minutos. Posteriormente, se añadieron dosis optimizadas de los siguientes anticuerpos de superficie, que se incubaron por 30 minutos a 4°C, protegidos de la luz: anti-CD3 marcado con el complejo de peridina-clorofila (PerCP) (BD), anti-CD8 marcado con Alexa Fluor 700. Luego, las células se lavaron con 1 mL de PBS 1X, se resuspendieron en 100 µL de buffer de fijación (Thermo Fisher) y se incubaron por 20 minutos a 4°C, protegidas de la luz. Se añadió 1 mL de buffer de permeabilización (Thermo Fisher), se centrifugaron, y se añadieron dosis optimizadas de los siguientes anticuerpos intracelulares, que se incubaron por 30 minutos a 4°C, protegidos de la luz: anti-Granzima B-FITC, anti-Perforina-PE (BD), y anti-IFN-γ-PE-Cy7 (Thermo Fisher). Finalmente, las células se lavaron con 1 mL de buffer de permeabilización, se resuspendieron en 400 µL de éste mismo buffer y se adquirieron en un citómetro LSR Fortessa (BD), utilizando el software FACS Diva v. 6.0, y con previa compensación automática del derrame espectral. Al menos 25,000 eventos CD3⁺ fueron obtenidos. Los datos fueron analizados con el Software FlowJo versión 10.4. Controles FMO (fluorescencia menos uno) y células no estimuladas se emplearon para determinar el umbral de la señal positiva para cada marcador.

Análisis estadístico

Dados los resultados de las pruebas de normalidad, se emplearon pruebas no paramétricas. Los datos se presentan como medianas y rangos intercuartílicos. Las pruebas de Mann-Whitney y Wilcoxon se usaron para comparar dos grupos de datos independientes o pareados, respectivamente. El grado de correlación entre las variables se determinó con la prueba de Spearman. La prueba de Fisher se usó para el análisis de frecuencias. Para fines estadísticos, en muestras con niveles no detectables de IL-1β e IL-6, se asignó un valor igual a la mitad del límite

de detección del ensayo. En todos los casos, un valor de $p < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo.

RESULTADOS

El tratamiento con Sulfasalazina disminuye el ambiente inflamatorio tras el estímulo con LPS

Pasadas 24 horas tras el estímulo con LPS y SSZ, se tomó una fracción del sobrenadante con el fin de cuantificar la producción de las citoquinas proinflamatorias IL-6 e IL-1 β . Como se muestra en la **Figura 1**, la concentración de IL-1 β e IL-6 se redujo drásticamente tras el estímulo en presencia de SSZ, tanto en células de individuos con infección por el VIH ($p=0.0156$ y $p=0.0156$, respectivamente), como en células de individuos seronegativos ($p=0.0313$ y $p=0.0313$, respectivamente). Cabe resaltar que la concentración de citoquinas proinflamatorias IL-1 β e IL-6 tiene una media más alta en individuos VIH+ comparado en los seronegativos, pero no existe diferencias significativas entre estos dos grupos ($p=0.3829$ y $p=0.1923$ respectivamente).

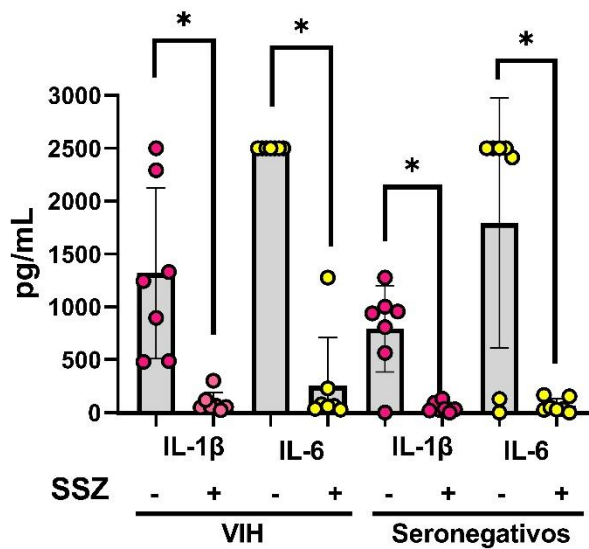


Figura 1. Concentración de las citoquinas proinflamatorias IL-6 e IL-1 β secretadas por CMSP estimuladas con LPS, en presencia o ausencia de SSZ. Los ensayos se realizaron en células de individuos seronegativos ($n=6$) y de individuos con infección por el VIH ($n=7$). Las comparaciones entre las condiciones se realizaron con la prueba de Wilcoxon ($*p \leq 0.05$).

La sulfasalazina promueve la capacidad funcional de los LT CD8⁺ de individuos con VIH

Luego del tratamiento con LPS en presencia o ausencia de SSZ, una fracción de los LT CD8⁺ fueron estimulados además con PMA/iono. Este estímulo induce la degranulación, la expresión de moléculas citotóxicas, y la producción de IFN- γ . Como se esperaba, el estímulo con PMA/iono indujo un incremento en la frecuencia de LT CD8⁺ que expresaban CD107a e IFN- γ (**Figura 3A y B**), mientras que la expresión intracelular de perforina y granzima B disminuyó, probablemente debido a su liberación durante la degranulación (**Figura 3C y D**) (9). De forma interesante, la capacidad de degranulación y la expresión de granzima B, pero no la expresión de IFN- γ ni perforina, por parte de LT CD8⁺ de individuos con infección por el VIH mostraron un aumento significativo cuando las células fueron estimuladas en presencia de SSZ, en comparación con células estimuladas en ausencia de SSZ (**Figura 3**). De notar, este efecto fue específico de células derivadas de individuos con infección por el VIH, ya que, a excepción del aumento de granzima B, no hubo un impacto significativo de la SSZ sobre las células de individuos seronegativos (**Figura 3**). Adicionalmente, para determinar la polifuncionalidad de los LT CD8⁺, se evaluó la coexpresión de los marcadores evaluados. De notar, la estimulación en presencia de SSZ indujo un aumento en la coexpresión de CD107a con IFN- γ , granzima B o perforina (**Figura 4A-C**). Sin embargo, no se observaron diferencias en la población granzima B⁺ perforina⁺ o en la población IFN- γ ⁺ granzima B⁺ (**Figura 4D y E**).

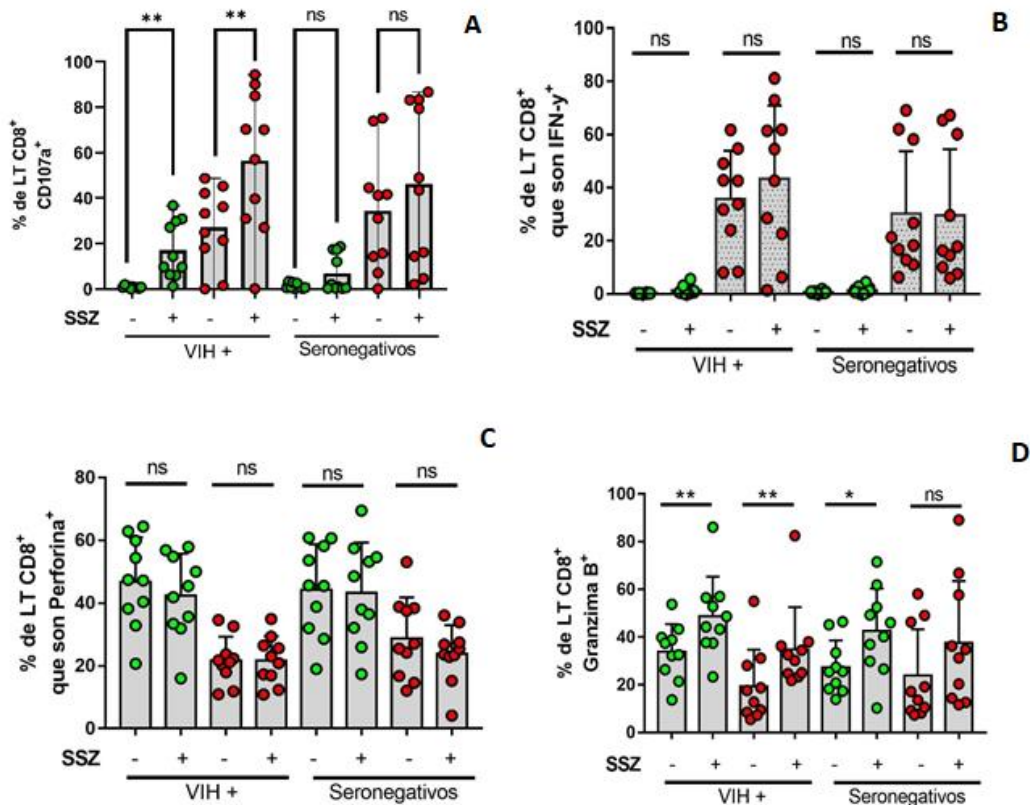


Figura 3. Frecuencia de LT CD8⁺ que expresan CD107a (A), IFN- γ (B), perforina (C) y granzima B (D) luego de la estimulación con LPS solo (verde), o con LPS seguido de PMA/iono (rojo), en presencia o ausencia de SSZ. Los ensayos se realizaron con células de individuos seronegativos (n=10) e individuos con VIH (n=10). Las comparaciones entre los grupos se realizaron con la prueba de Wilcoxon (*p \leq 0.05, **p \leq 0.01, ns: estadísticamente no significativo).

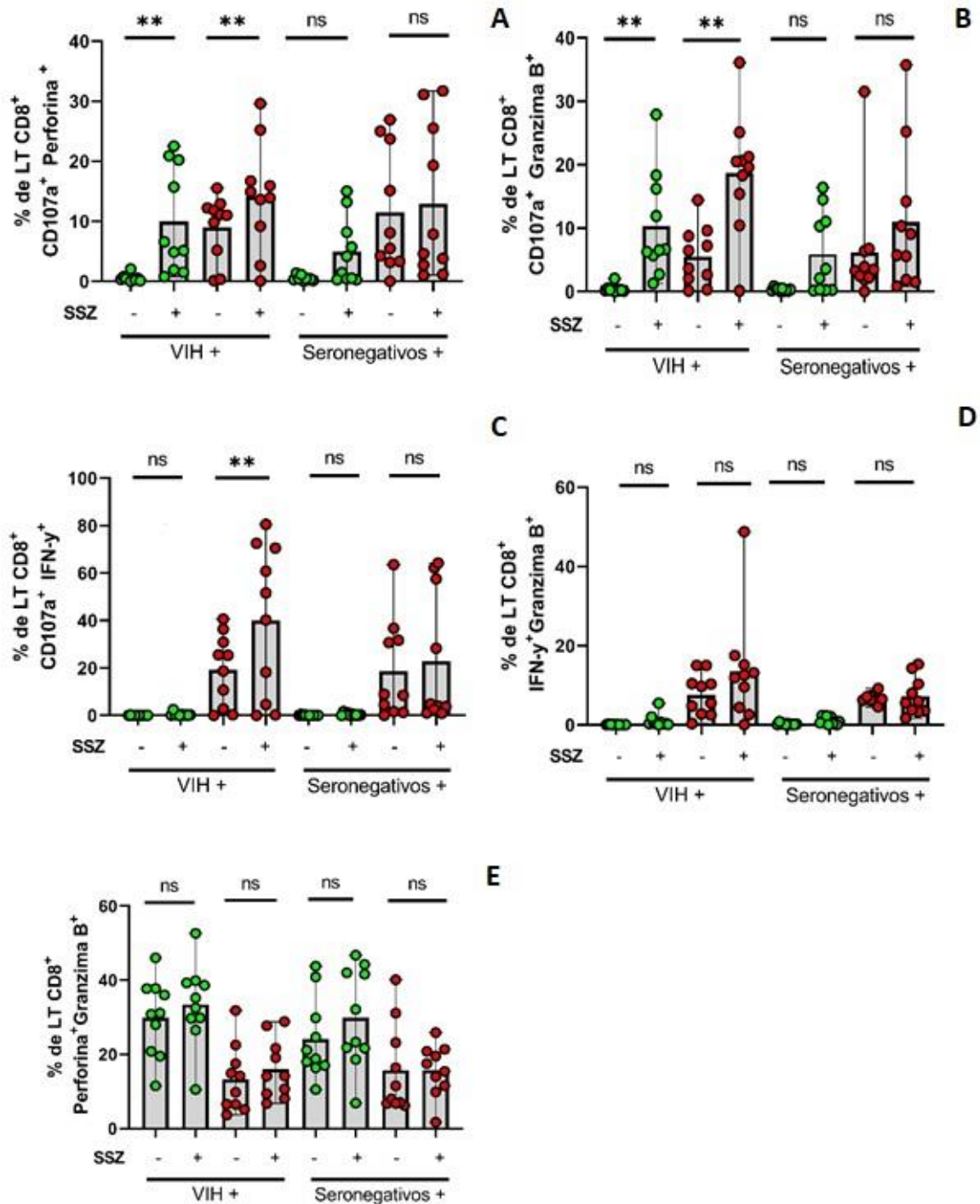


Figura 4. Frecuencia de LT CD8⁺ CD107a⁺ perforina⁺ (A), CD107a⁺ granzima B⁺ (B), CD107a⁺ IFN- γ ⁺ (C), granzima B⁺ IFN- γ ⁺ (D) y granzima B⁺ perforina⁺ (E), luego de estimulación con LPS solo (verde), o con LPS seguido de PMA/iono (rojo), en presencia o ausencia de SSZ. Los ensayos se realizaron con células de individuos seronegativos (n=10) e individuos con VIH (n=10). Las comparaciones entre los grupos se realizaron con la prueba de Wilcoxon (*p ≤ 0.05, **p ≤ 0.01, ns: estadísticamente no significativo).

Discusión

El proceso de degranulación por parte de los LT CD8⁺ conlleva a la liberación de moléculas citotóxicas en la sinapsis inmunológica, como la granzima B y la perforina, lo que contribuye a la muerte de la célula blanco (12). La liberación de los gránulos líticos, sumado a la producción de otras citoquinas como el IFN- γ , contribuyen a la eliminación de células infectadas por microorganismos intracelulares y la inducción de un estado antiviral (28). Estos procesos se ven afectados durante la infección por VIH, ya que la capacidad de degranulación de los LT CD8⁺ disminuye en individuos con infección por el VIH, lo que resulta en una menor liberación de gránulos citotóxicos y una mayor expresión intracelular de granzima B y perforina, lo cual no se restaura completamente con la TAR (13,15,29). Estas alteraciones se han asociado al fenómeno de inflamación sistémica, el cual se desencadena desde la etapa aguda de la infección por VIH y perdura durante la fase crónica de la infección (30). Por lo tanto, es importante evaluar estrategias que modulen los procesos inflamatorios y que promuevan la restauración de la función de los LT CD8⁺.

En el presente estudio se evaluó si el tratamiento *in vitro* con SSZ, reduce los niveles de citoquinas proinflamatorias y/o promueve la capacidad funcional de los LT CD8⁺. Observamos que el tratamiento con SSZ disminuyó la secreción de IL-1 β e IL-6 inducidos por LPS, tanto en células de individuos con infección por el VIH, como de individuos seronegativos.

Curiosamente los LT CD8⁺ de los individuos con VIH mostraron un aumento significativo en la expresión de CD107a que sólo ocurrió en las células de estos individuos, pero no en los seronegativos. Sin embargo, la granzima B aumentó significativamente también en los individuos seronegativos tras el estímulo con LPS + SSZ. Adicionalmente, este tratamiento también indujo un mayor porcentaje de LT CD8⁺ que coexpresan CD107a y granzima B, perforina o IFN- γ . La coexpresión de estos marcadores es relevante dado que indica la producción *de novo* de estas moléculas y el reclutamiento de gránulos citotóxicos. Cabe resaltar que esta expresión varió dependiendo del estímulo. En este sentido, el LPS indujo un aumento en la frecuencia de células positivas para granzima B y perforina, mientras que la estimulación con PMA/iono produjo mayor porcentaje de células CD107a⁺ e IFN- γ ⁺. Esto se debe en gran medida a que la degranulación de los LT CD8⁺ requiere la activación de las proteínas quinasas celulares (31), las cuales son activadas por los ésteres de forbol y los ionóforos de calcio (32). Además, la PMA/iono estimula la síntesis *de novo* y la acumulación de gránulos de moléculas citotóxicas en los LT CD8⁺ activados (8), y desencadena la lisis de las células diana que contienen antígenos (33,34). De la misma manera el estímulo con LPS a pesar de no ser directo como el del PMA/iono, es crucial para la activación de las células presentadoras de antígeno y para la liberación de citoquinas proinflamatorias. Cabe destacar que el LPS es un producto microbiano que se encuentra en alta concentración en

circulación sistémica de individuos con VIH, y se ha asociado con la inflamación sistémica y el posterior deterioro de la respuesta inmune (agotamiento inmunológico), que se evidencia en la infección por VIH (2). Dado que diversos estudios han evidenciado que las subpoblaciones de LT expresan niveles variables, pero significativos de TLR4 en sus membranas (35) (36), nuestros resultados sugieren que el tratamiento con SSZ podría reducir los efectos inflamatorios desencadenados por el LPS, y de esta forma se podría potenciar la restauración de las funciones celulares de los LT CD8⁺. De forma interesante, en los individuos seronegativos se evidenció una menor expresión de moléculas citotóxicas, sin observar un efecto del tratamiento con SSZ. Esta observación podría deberse principalmente a la capacidad funcional baja que se observa en los LT CD8⁺ vírgenes (37).

Nuestros hallazgos sugieren un efecto benéfico de la SSZ en la restauración de la función inmune en pacientes con VIH, contrarrestando los niveles de inflamación crónica y mejorando la funcionalidad de los LT CD8⁺. Estudios posteriores podrían dilucidar la eficiencia de la respuesta de los LT CD8⁺ inducida por la SSZ y los mecanismos respectivos de las células presentadoras de antígeno que conlleva a la disminución del ambiente inflamatorio, así como el potencial antiviral *in vivo* de los LT CD8⁺ en presencia de SSZ.

CONCLUSION

La SSZ disminuye los niveles de las citoquinas proinflamatorias IL-6 e IL-1 β , y aumenta la capacidad funcional de los LT CD8⁺ de individuos con infección por el VIH, particularmente su potencial de degranulación. Estos hallazgos sugieren que el tratamiento con SSZ podría ayudar a contrarrestar la inflamación exacerbada y, en consecuencia, potenciar la restauración de la función inmune en individuos con VIH que reciben TAR.

Referencias

1. ONUSIDA. Estadísticas mundiales sobre el VIH en 2021. Jt United Nations Program HIV/AIDS. 2021;2–9.
2. Brenchley JM, Price DA, Schacker TW, Asher TE, Silvestri G, Rao S, et al. Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nat Med*. 2006;12(12):1365–71.
3. Dinh DM, Volpe GE, Duffalo C, Bhalchandra S, Tai AK, Kane A V., et al. Intestinal Microbiota, microbial translocation, and systemic inflammation in chronic HIV infection. *J Infect Dis*. 2015;211(1):19–27.
4. Sandler NG, Douek DC. Microbial translocation in HIV infection: Causes, consequences and treatment opportunities. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2012;10(9):655–66. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2848>
5. Walker B, McMichael A. The T-cell response to HIV. *Cold Spring Harb Perspect Med* [Internet].

- 2012;2(11):1–19. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23002014>
6. McBrien JB, Kumar NA, Silvestri G. Mechanisms of CD8(+) T cell-mediated suppression of HIV/SIV replication. *Eur J Immunol*. 2018 Jun;48(6):898–914.
 7. Migueles SA, Osborne CM, Royce C, Compton AA, Joshi RP, Weeks KA, et al. Lytic Granule Loading of CD8+ T Cells Is Required for HIV-Infected Cell Elimination Associated with Immune Control. *Immunity* [Internet]. 2008;29(6):1009–21. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2008.10.010>
 8. Keith R. Lohse, PhD, Catherine E. Lang, PT PhD, and Lara A. Boyd PP, Hendrix, Abernethy, Sloane, Misuraca & M. Rapid upregulation and granule-independent transport of perforin to the immunological synapse define a novel mechanism of antigen-specific CD8+ T cell cytotoxic activity. *Bone*. 2013;23(1):1–7.
 9. Betts MR, Brenchley JM, Price DA, De Rosa SC, Douek DC, Roederer M, et al. Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8+ T cells by a flow cytometric assay for degranulation. *J Immunol Methods*. 2003;281(1–2):65–78.
 10. Peters PJ. Cytotoxic T lymphocyte granules are secretory lysosomes, containing both perforin and granzymes. *J Exp Med* [Internet]. 1991;173(5):1099–109. Available from: <http://www.jem.org/cgi/doi/10.1084/jem.173.5.1099>
 11. Fukuda M. Lysosomal Membrane Glycoproteins STRUCTURE, BIOSYNTHESIS, AND INTRACELLULAR TRAFFICKING*. *J Biol Chem* [Internet]. 1991;266(32):21327–30. Available from: <http://www.jbc.org/content/266/32/21327.full.pdf>
 12. Betts MR, Koup RA. Detection of T-Cell Degranulation: CD107a and b. *Methods Cell Biol*. 2004;75:497–512.
 13. Hunt PW, Martin JN, Sinclair E, Brecht B, Hagos E, Lampiris H, et al. T cell activation is associated with lower CD4+ T cell gains in human immunodeficiency virus-infected patients with sustained viral suppression during antiretroviral therapy. *J Infect Dis*. 2003;
 14. Zhang D, Shankar P, Xu Z, Harnisch B, Chen G, Lange C, et al. Most antiviral CD8 T cells during chronic viral infection do not express high levels of perforin and are not directly cytotoxic. *Blood*. 2003;
 15. Perdomo-Celis F, Velilla PA, Taborda NA, Rugeles MT. An altered cytotoxic program of CD8 + T-cells in HIV-infected patients despite HAART-induced viral suppression. *PLoS One*. 2019;14(1):4000000063–16.
 16. Wilson EMP, Sereti I. Immune Restoration After Antiretroviral Therapy: The Pitfalls Of Hasty Or Incomplete Repairs. *Immunol Rev*. 2013;254(1):343–54.
 17. Croxford S, Kitching A, Desai S, Kall M, Edelstein M, Skingsley A, et al. Mortality and causes of death in people diagnosed with HIV in the era of highly active antiretroviral therapy compared with the general population: an analysis of a national observational cohort. *Lancet Public Heal*. 2017;
 18. Bandera A, Colella E, Rizzardini G, Gori A, Clerici M. Strategies to limit immune-activation in HIV patients. *Expert Rev Anti Infect Ther* [Internet]. 2017;15(1):43–54. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/14787210.2017.1250624>
 19. O'Brien M, Montenont E, Hu L, Nardi MA, Valdes V, Merolla M, et al. Aspirin attenuates platelet activation and immune activation in HIV-1-infected subjects on antiretroviral therapy: a pilot

- study. *J Acquir Immune Defic Syndr* [Internet]. 2013;63(3):280–8. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3756489&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
20. Nakanjako D, Ssinabulya I, Nabatanzi R, Bayigga L, Kiragga A, Joloba M, et al. Atorvastatin reduces T-cell activation and exhaustion among HIV-infected cART-treated suboptimal immune responders in Uganda: A randomised crossover placebo-controlled trial. *Trop Med Int Heal*. 2015;20(3):380–90.
 21. Piconi S, Parisotto S, Rizzardini G, Passerini S, Terzi R, Argentero B, et al. Hydroxychloroquine drastically reduces immune activation in HIV-infected, antiretroviral therapy-treated immunologic nonresponders. *Blood*. 2011;118(12):3263–72.
 22. Plosker GL, Croom KF. Sulfasalazine: A review of its use in the management of rheumatoid arthritis. *Drugs*. 2005;65(13):1825–49.
 23. Hasko G, Szabo C, Nemeth ZH, Deitch E a. Sulphasalazine inhibits macrophage activation: inhibitory effects on inducible nitric oxide synthase expression, interleukin-12 production and major histocompatibility complex II expression. *Immunology*. 2001;103(4):473–8.
 24. Rodenburg RJ, Ganga a, van Lent PL, van de Putte LB, van Venrooij WJ. The antiinflammatory drug sulfasalazine inhibits tumor necrosis factor alpha expression in macrophages by inducing apoptosis. *Arthritis Rheum* [Internet]. 2000;43(9):1941–50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11014343>
 25. Liptay S, Bachem M, Häcker G, Adler G, Debatin KM, Schmid RM. Inhibition of nuclear factor kappa B and induction of apoptosis in T-lymphocytes by sulfasalazine. *Br J Pharmacol*. 1999;128(7):1361–9.
 26. Feria-Garzón MG, Rugeles MT, Hernandez JC, Lujan JA, Taborda NA. Sulfasalazine as an immunomodulator of the inflammatory process during HIV-1 infection. *Int J Mol Sci*. 2019;20(18):1–11.
 27. Perdomo-Celis F, Feria MG, Taborda NA, Rugeles MT. A Low Frequency of IL-17-Producing CD8+ T-Cells Is Associated With Persistent Immune Activation in People Living With HIV Despite HAART-Induced Viral Suppression. *Front Immunol* [Internet]. 2018;9(October). Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2018.02502/full>
 28. Gulzar N, Copeland K. CD8+ T-Cells: Function and Response to HIV Infection. *Curr HIV Res*. 2005;2(1):23–37.
 29. Cockerham LR, Jain V, Sinclair E, Glidden D V., Hartogenesis W, Hatano H, et al. Programmed death-1 expression on CD4+ and CD8+ T cells in treated and untreated HIV disease. *Aids*. 2014;28(12):1749–58.
 30. Muller-trutwin mirkoPaiardini and micheala. HIV-associated chronic immune activation Mirko. *Immunol Rev*. 2014;254(1):78–101.
 31. Pardo J, Buferne M, Martínez-Lorenzo MJ, Naval J, Schmitt-Verhulst AM, Boyer C, et al. Differential implication of protein kinase C isoforms in cytotoxic T lymphocyte degranulation and TCR-induced Fas ligand expression. *Int Immunol*. 2003;15(12):1441–50.
 32. Grybko MJ, Pores-Fernando AT, Wurth GA, Zweifach A. Protein kinase C activity is required for cytotoxic T cell lytic granule exocytosis, but the θ isoform does not play a preferential role. *J Leukoc Biol*. 2007;81(2):509–19.

33. Berrebi G, Takayama H, Sitkovsky M V. Antigen-receptor interaction requirement for conjugate formation and lethal-hit triggering by cytotoxic T lymphocytes can be bypassed by protein kinase C activators and Ca²⁺ ionophores. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987;84(5):1364–8.
34. Haridas V, McCloskey TW, Pahwa R, Pahwa S. Discordant expression of perforin and granzyme A in total and HIV-specific CD8 T lymphocytes of HIV infected children and adolescents. *Aids*. 2003;17(16):2313–22.
35. Tripathy A, Khanna S, Padhan P, Smita S, Raghav S, Gupta B. Direct recognition of LPS drive TLR4 expressing CD8⁺ T cell activation in patients with rheumatoid arthritis. *Sci Rep* [Internet]. 2017;7(1):1–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-01033-7>
36. Komia-Koma M, Gildchrist DS, Xu D. Direct recognition of LPS by human but not murine CD8⁺ T cells via TLR4 complex. *Eur J Immunol*. 2009;39(6):1564–72.
37. Wolint P, Betts MR, Koup RA, Oxenius A. Distinguishes Effector and Memory Subsets of CD8² T Cells *The Journal of Experimental Medicine*. 2004;199(7).