



UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ
FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES
GRADO EN BIOTECNOLOGÍA



Caracterización de los reservorios de VIH en pacientes con diferentes respuestas al tratamiento antirretroviral

**TRABAJO DE FIN DE GRADO
CURSO 2026-2027**

Autora: Saba Qasir Qasir

Tutor: Luis Pérez García-Estañ

Cotutora: Melissa Loreto Belló Pérez

Departamento y Área: Bioquímica y Biología Molecular

ÍNDICE

Abreviaturas.....	4
1. INTRODUCCIÓN	6
1.1. Virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)	6
1.1.1. Estructura del VIH-1	6
1.1.2. Etapas de la infección del VIH-1	7
1.1.3. Latencia	8
1.1.4. El reservorio viral	8
1.2. Tratamiento antirretroviral (TAR)	10
1.2.1. Tratamiento antirretroviral inyectable de acción prolongada (LAI)	11
1.2.2. Controladores de élite (EC)	12
1.2.3. Viremia de bajo grado (VBG)	12
1.3. Relevancia del estudio de los reservorios del VIH-1	13
2. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS	14
2.1. Antecedentes.....	14
2.2. Objetivos.....	15
3. MATERIALES Y MÉTODOS	16
3.1. Diseño y procedimiento del estudio	16
3.2. Obtención y procesamiento de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs)....	16
3.3. Aislamiento de poblaciones de linfocitos CD4+ y CD8+	17
3.4. Extracción y cuantificación de ARN.....	17
3.5. Cuantificación del ARNm del VIH mediante RT-qPCR	18
3.6. Análisis estadístico	18
4. RESULTADOS	20
4.1. Características de los participantes	20
4.2. Control de calidad del aislamiento celular	21
4.3. Caracterización inmunológica de los grupos	21
4.4. Selección del control endógeno	22
4.5. Detección de VIH en las fracciones linfocitarias.....	23
4.6. Relación entre el tiempo de inicio del TAR y la presencia de VBG	24
5. DISCUSIÓN.....	26
6. CONCLUSIÓN Y PERSPECTIVAS FUTURAS	32
7. BIBLIOGRAFÍA.....	34

Resumen

Aunque la terapia antirretroviral consigue la supresión viral en la mayoría de las personas con VIH-1, algunos pacientes continúan presentando niveles bajos de viremia detectable en plasma. En este trabajo se evaluó la actividad transcripcional del VIH-1 y el perfil inmunológico en células mononucleares de sangre periférica de individuos tratados con cabotegravir/rilpivirina de acción prolongada con y sin viremia de bajo grado. Los resultados evidenciaron una tendencia hacia una mayor expresión viral en los pacientes sin viremia de bajo grado, especialmente en la fracción CD4+, mientras que los individuos con viremia de bajo grado mostraron una tendencia no significativa compatible con activación inmunológica residual, caracterizada por menores porcentajes de CD4+, un aumento relativo de CD8+ y un menor ratio CD4:CD8. En conjunto, los datos sugieren que la persistencia de viremia de bajo grado podría estar más relacionada con características funcionales del reservorio viral que con la magnitud absoluta de la transcripción viral intracelular.

Abstract

Although antiretroviral therapy achieves viral suppression in most people living with HIV-1, some patients continue to exhibit low levels of detectable plasma viremia. This study evaluated HIV-1 transcriptional activity and the immunological profile of peripheral blood mononuclear cells from individuals treated with long-acting cabotegravir/rilpivirine with and without low-level viremia. The results showed a trend toward higher viral expression in patients without low-level viremia, particularly within the CD4+ fraction, whereas individuals with low-level viremia exhibited a non-significant trend suggestive of residual immune activation, characterized by lower percentages of CD4+ cells, a relative increase in CD8+ cells, and a lower CD4:CD8 ratio. Taken together, the data suggest that the persistence of low-level viremia may be more closely related to functional characteristics of the viral reservoir than to the absolute magnitude of intracellular viral transcription.

Palabras clave: Virus de la inmunodeficiencia humana, viremia de bajo grado, reservorios virales, terapia antirretroviral de acción prolongada, células mononucleares de sangre periférica, expresión transcripcional viral

Abreviaturas

ADNc: ADN complementario
(*Complementary DNA, cDNA*)

ARNm: ARN mensajero

CA: Cápside

CCR5: Receptor de quimiocinas C-C tipo 5
(*C-C Chemokine Receptor Type 5*)

Ct: Ciclo umbral (*Cycle Threshold*)

CXCR4: Receptor de quimiocinas con
motivo C-X-C tipo 4 (*C-X-C Motif
Chemokine Receptor 4*)

DE: Desviación Estándar

DMSO: Dimetilsulfóxido (*Dimethyl
Sulfoxide*)

dsDNA: ADN de doble cadena (*Double-
Stranded DNA*)

EBV: Virus de Epstein-Barr

EC: Controladores de Élite (*Elite
Controllers*)

FBS: Suero Fetal Bovino (*Fetal Bovine
Serum*)

GALT: Tejido Linfoide Asociado al Intestino
(*Gut-Associated Lymphoid Tissue*)

HHV-6: Herpesvirus humano tipo 6

HLA: Antígeno leucocitario humano
(*Human Leukocyte Antigen*)

HMBS: Hidroximetilbilano sintasa
(*Hydroxymethylbilane Synthase*)

HPRT1: Hipoxantina
fosforribosiltransferasa 1
(*Hypoxanthine
Phosphoribosyltransferase 1*)

HSH: Hombres que tienen sexo con
hombres

HTLV-1: Virus linfotrópico de células T
humanas tipo 1

HTSX: Heterosexual

IN: Integrasa

INSTI: Inhibidor de la Transferencia de
Cadenas de la Integrasa (*Integrase
Strand Transfer Inhibitors*)

IQR: Rango intercuartílico (*Interquartile
Range*)

LAI: Antirretrovirales inyectables de acción
prolongada (*Long-Acting Injectables*)

LTRs: Repeticiones Terminales Largas (*Long
Terminal Repeats*)

MA: Matriz

NC: Nucleocápside

NNRTI: Inhibidor No Nucleósido de la
Transcriptasa Inversa (*Non-Nucleoside
Reverse Transcriptase Inhibitor*)

PBMCs: Células mononucleares de sangre periférica (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*)

PBS: Solución salina tamponada con fosfato (*Phosphate Buffered Saline*)

PR: Proteasa

PrEP: Profilaxis Preexposición

qPCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa Cuantitativa (*Quantitative Polymerase Chain Reaction*)

RPMI: *Roswell Park Memorial Institute*

RRM2B: Subunidad reguladora M2B inducible por TP53 de la ribonucleótido reductasa (*Ribonucleotide Reductase Regulatory TP53 Inducible Subunit M2B*)

RT: Transcriptasa inversa

SIDA: Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida

SIVcpz: Virus de inmunodeficiencia simia de chimpancés (*Simian Immunodeficiency Virus of Chimpanzees*)

SIVsmm: Virus de la inmunodeficiencia simia de mangabeyes tiznados (*Simian Immunodeficiency Virus of Sooty Mangabeys*)

TAF/FTC: Tenofovir Alafenamida/Emtricitabina

TAR: Tratamiento antirretroviral

TDF/FTC: Tenofovir Disoproxilo Fumarato/Emtricitabina

UDVP: Usuarios de Drogas por Vía Parenteral

VBG: Viremia de Bajo Grado

VIH: Virus de la Inmunodeficiencia Humana (*Human Immunodeficiency Virus, HIV*)

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)

Desde su identificación en 1983, el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) representa uno de los principales retos de salud pública a escala mundial ya que, hasta la fecha, no existe ninguna cura ni vacuna capaz de prevenir o erradicar este virus. El VIH comprende dos tipos principales, VIH-1 y VIH-2, originados por eventos independientes de transmisión zoonótica desde primates no humanos. El VIH-1 deriva del virus de inmunodeficiencia simia de chimpancés (SIVcpz), mientras que el VIH-2 procede del virus de la inmunodeficiencia simia de mangabeyes tiznados (SIVsmm) de África Occidental (Sharp & Hahn, 2011). Ambos virus comparten las mismas vías de transmisión, principalmente por contacto sexual, transmisión perinatal y exposición a sangre o fluidos corporales contaminados. Sin embargo, presentan diferencias relevantes en su distribución y evolución clínica. Mientras que el VIH-1 es responsable de la gran mayoría de las infecciones a nivel mundial y se caracteriza por cargas virales más elevadas y una progresión más rápida de la enfermedad, el VIH-2 permanece mayoritariamente restringido a África Occidental y suele presentar niveles de replicación viral más bajos y una depleción más lenta de los linfocitos T CD4+ (Magomere et al., 2025).

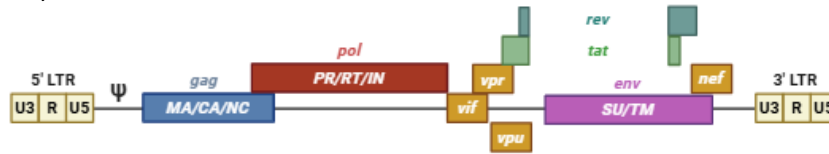
Debido a su amplia distribución y su impacto sanitario a escala mundial, el presente trabajo se centra en el VIH-1. Según datos de la Organización Mundial de la Salud, a finales de 2024, aproximadamente 40,8 millones de personas vivían con el virus y alrededor de 630.000 fallecieron por causas relacionadas a esta infección. En Europa, la situación continúa siendo significativa, con cerca de 3,2 millones de personas que vivían con VIH-1 ese mismo año, de las cuales únicamente el 63 % recibían tratamiento antirretroviral, lo que pone de manifiesto la necesidad de ampliar el acceso a las terapias disponibles (World Health Organization, 2025).

1.1.1. Estructura del VIH-1

El VIH-1 pertenece al género *Lentivirus* de la familia *Retroviridae*. Su genoma de ARN monocatenario de sentido positivo está flanqueado por repeticiones terminales largas (LTRs) y organizado en nueve genes. Al igual que todos los retrovirus, contiene los genes *gag*, *pol* y *env* (**Figura 1A**), que codifican respectivamente las proteínas estructurales (matriz [MA], cápside [CA] y nucleocápside [NC]), las enzimas replicativas (transcriptasa inversa [RT], integrasa [IN] y proteasa [PR]) y las glucoproteínas de la envoltura (gp120, gp41) (**Figura 1B**).

Además, el genoma incluye seis genes accesorios (*tat*, *rev*, *nef*, *vif*, *vpr*, *vpu*), de los cuales *tat* y *rev* desempeñan funciones regulatorias en la transcripción y exportación de ARN viral (Sawson & Malim, 2008).

A) Genoma del VIH-1



B) Virión maduro del VIH-1

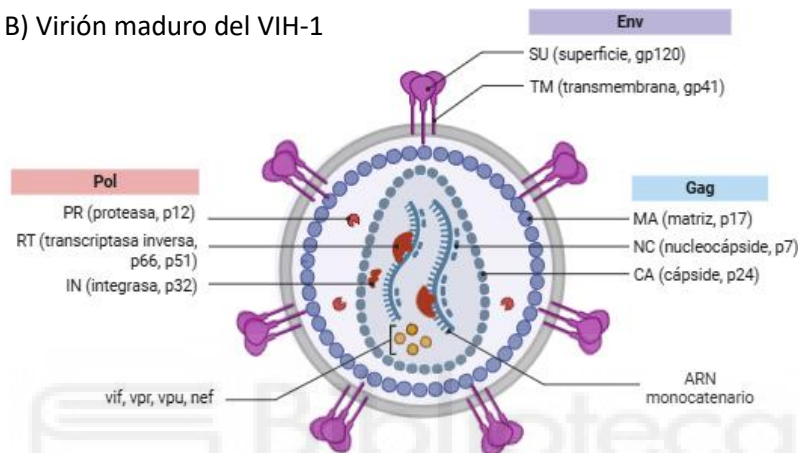


Figura 1. Organización genómica y estructural del VIH-1. A) Organización del genoma viral con sus principales genes, flanqueado por las LTRs. B) Estructura del virión maduro con las proteínas derivadas de *gag*, *pol* y *env*. Modificada de Biorender.

1.1.2. Etapas de la infección del VIH-1

En ausencia de tratamiento antirretroviral (TAR), la infección por VIH-1 se estructura habitualmente en tres fases clínicas bien diferenciadas. La primera, denominada **fase aguda**, corresponde al periodo inicial tras la infección (dos-diez semanas) y se caracteriza por una disminución brusca de los linfocitos T CD4+ en sangre periférica junto con un marcado aumento de la carga viral plasmática, como consecuencia de la elevada replicación viral (Hernández-Vargas & Middleton, 2013). A continuación, el individuo entra en la fase **crónica o de latencia clínica**, durante la cual puede permanecer sin síntomas significativos, aunque el virus continúa replicándose activamente e infectando nuevas células. Esta etapa suele prolongarse entre siete y diez años, si bien la progresión de la enfermedad presenta una notable variabilidad interindividual. Finalmente, la infección puede evolucionar hacia el **Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA)**, fase avanzada que se diagnostica cuando el recuento de linfocitos T CD4+ desciende por debajo de 200 células/mm³ y/o cuando

aparecen infecciones oportunistas indicativas de un deterioro inmunitario grave (Chou et al., 2024).

En este contexto de deterioro inmunológico progresivo, destaca el recuento nadir de linfocitos T CD4+, definido como el valor más bajo alcanzado durante la evolución de la infección. Este parámetro es un importante predictor clínico, ya que niveles de nadir más bajos se asocian con una peor respuesta inmunitaria y con un mayor riesgo de complicaciones, incluyendo eventos cardiovasculares y alteraciones neurodegenerativas (Buisker et al., 2015).

1.1.3. Latencia

La capacidad del VIH-1 de establecer una infección persistente está estrechamente vinculada al valor del nadir de linfocitos T CD4+, ya que una mayor depleción inmunitaria durante la infección activa suele asociarse con un mayor tamaño y una mayor persistencia del reservorio viral latente (Boulassel et al., 2012). Un de los pasos clave del ciclo replicativo del VIH-1 es la integración del ADN viral en el genoma de la célula huésped mediante la acción de la integrasa. Una vez integrado como provirus, este ADN viral se replica junto con el ADN celular, de modo que la propagación de la infección puede producirse tanto por la infección de nuevas células como por la proliferación clonal de células ya infectadas (Kirchhoff, 2018).

La latencia viral se define como un estado reversible y no productivo en el que el virus permanece dentro de la célula sin expresar activamente sus genes, salvo ciertos transcritos implicados en el mantenimiento de dicho estado (Perng & Jones, 2010). Aunque puede distinguirse una latencia preintegración, en la que el ADN viral no integrado persiste de forma transitoria en etapas tempranas del ciclo viral, es la latencia postintegración la que tiene mayor relevancia clínica. En este caso, el provirus ya integrado queda silenciado de forma reversible, constituyendo uno de los principales mecanismos de persistencia viral. Gracias a ello, puede mantenerse durante toda la vida de la célula y transmitirse a su descendencia (Colin & Van Lint, 2009).

1.1.4. El reservorio viral

La latencia postintegración descrita anteriormente es la que sustenta la formación y mantenimiento del reservorio viral, que puede definirse como un tipo celular o un compartimento anatómico en el que el virus competente para la replicación persiste durante periodos prolongados, superando en estabilidad a la población viral que se encuentra en

replicación activa (Blackson et al., 2002). En el contexto de la infección por VIH-1, este reservorio comprende específicamente las poblaciones celulares infectadas que albergan provirus con capacidad replicativa en individuos bajo TAR, siendo las células T CD4+ las más relevantes (Barton et al., 2016).

Aquí el virus persiste ya que pueden experimentar expansión clonal tras la estimulación antigénica, alternar dinámicamente entre estados activados y fases de latencia quiescente caracterizadas por inactividad transcripcional, y mantenerse en el tiempo mediante proliferación homeostática. No obstante, la activación de estas células no ocurre de manera uniforme sino de manera estocástica. Los niveles de activación de las células T se distribuyen a lo largo de un gradiente funcional, de modo que solo logra reactivar una fracción de las células infectadas (Yeh et al., 2021).

Se han propuesto al menos tres mecanismos principales que podrían explicar esta expansión clonal: la integración del provirus en o cerca de genes implicados en el crecimiento o la supervivencia celular, la proliferación homeostática mediada por citoquinas y la proliferación impulsada por antígenos. Es probable que la contribución relativa de cada uno de estos mecanismos varíe entre individuos y también a lo largo del curso de la infección (Cohn et al., 2020).

Además de los linfocitos T CD4+, se ha descrito la presencia de ADN proviral en otros tipos celulares, como monocitos, macrófagos y células madre hematopoyéticas, aunque su papel en el mantenimiento del reservorio se considera limitado. Asimismo, el material genético del VIH-1 se ha detectado en diversos compartimentos anatómicos protegidos o inmunológicamente privilegiados conocidos como santuarios, como ganglios linfáticos, líquido cefalorraquídeo, tejido adiposo, el tejido linfoide asociado al intestino (GALT) y, más recientemente, la uretra (Jacobs et al., 2019).

Más allá de la localización del virus, es importante tener en cuenta que la mayoría de estos provirus son defectuosos, ya que presentan grandes deleciones internas, hipermutaciones inducidas por APOBEC3G, alteraciones en la señal de empaquetamiento, defectos en el sitio donador del *splicing* principal o mutaciones puntuales, lo que compromete su funcionalidad (Ho et al., 2013). Por ello, únicamente las células que contienen provirus intactos y con capacidad replicativa se consideran parte del reservorio latente del VIH-1. Sin

embargo, la persistencia del ADN proviral bajo tratamiento no se limita exclusivamente a estas formas intactas, sino que coexiste con una abundante población de provirus defectuosos que permanecen integrados en el genoma celular. Aunque estas formas defectuosas no producen viriones infecciosos completos, permanecen integradas en el genoma celular y contribuyen al conjunto del ADN proviral detectable en individuos bajo TAR.

1.2. Tratamiento antirretroviral (TAR)

La TAR consiste en una combinación de medicamentos dirigidos al ciclo del VIH-1 para detener su replicación y preservar o restaurar la función inmune. Los regímenes iniciales recomendados incluyen dos inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos y un tercer fármaco que puede ser un inhibidor de la integrasa o un inhibidor de la proteasa potenciado (Günthard et al., 2014).

Tras el inicio de la TAR, la carga viral plasmática disminuye siguiendo una dinámica de varias fases (Dahl et al., 2010) (**Figura 2**). Inicialmente se observa un descenso rápido asociado a la eliminación de linfocitos T CD4⁺ activados infectados, células con una vida media corta de aproximadamente uno o dos días que producen nuevas partículas virales. Posteriormente, la reducción de la carga viral se ralentiza y refleja la contribución de poblaciones celulares con mayor longevidad, como macrófagos infectados, células dendríticas o linfocitos T CD4⁺ parcialmente activados, cuya vida media puede oscilar entre una y cuatro semanas. En una tercera fase intervienen células infectadas con una vida media estimada de alrededor de treinta y nueve semanas. Finalmente, la disminución de la carga viral alcanza una meseta, lo que se atribuye en parte a la reactivación ocasional de linfocitos T CD4⁺ de memoria en reposo, capaces de reanudar la producción viral.

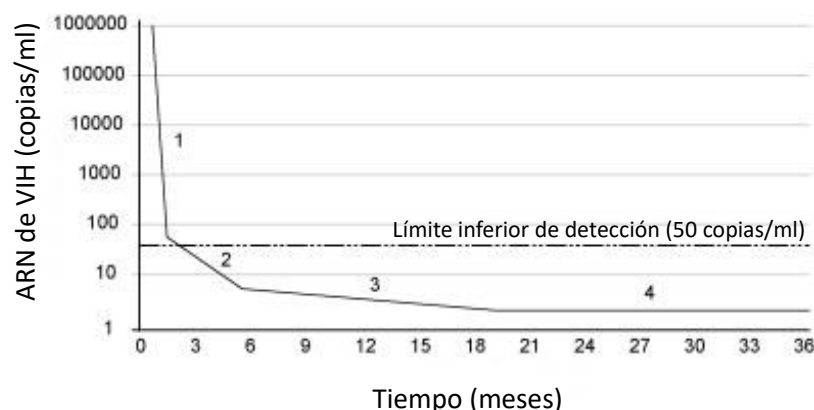


Figura 2. Dinámica de la carga viral plasmática durante la TAR. La gráfica muestra el descenso del ARN del VIH en plasma (escala logarítmica) a lo largo de 36 meses, estructurado en cuatro fases (1-4) que reflejan la contribución sucesiva de poblaciones celulares infectadas con vidas medias crecientes. La línea discontinua indica el límite inferior de detección (50 copias/ml). Modificada de Dahl et al. 2010.

Además de su uso terapéutico, algunos fármacos antirretrovirales se emplean como profilaxis preexposición (PrEP) en personas VIH-negativas con alto riesgo de infección. Las opciones más utilizadas incluyen las combinaciones orales de tenofovir disoproxilo fumarato/emtricitabina (TDF/FTC) y tenofovir alafenamida/emtricitabina (TAF/FTC), esta última con mayor seguridad renal y ósea. Más recientemente, el cabotegravir inyectable de acción prolongada ha mostrado mayor eficiencia que TDF/FTC oral y mejor adherencia gracias a su administración bimensual (Chou et al., 2023; Spinelli et al., 2024).

1.2.1. Tratamiento antirretroviral inyectable de acción prolongada (LAI)

A nivel mundial, solo alrededor del 62 % de los pacientes alcanzan una adherencia mayor o igual al 90 % del tratamiento prescrito (Ortego et al., 2011). Con el objetivo de mejorar la adherencia terapéutica, se han desarrollado formulaciones antirretrovirales inyectables de acción prolongada (LAI) que permiten la administración mensual o bimensual en sustitución del tratamiento oral diario (Hodge et al., 2021).

Un ejemplo es la combinación de cabotegravir y rilpivirina. La rilpivirina es un inhibidor no nucleósido de la transcriptasa inversa (NNRTI) que se une de forma no competitiva a esta enzima e impide la síntesis de ADN viral a partir del ARN del VIH-1 (Sanford, 2012). Por su parte, el cabotegravir es un inhibidor de la transferencia de cadenas de la integrasa (INSTI) que bloquea la integración del ADN viral en el genoma de la célula huésped (Leonard et al., 2022).

Aunque estas formulaciones de liberación prolongada ofrecen ventajas importantes, también presentan limitaciones. Una vez administradas, no pueden retirarse del organismo, lo

que puede prolongar posibles efectos adversos. Además, la exposición prolongada a concentraciones subterapéuticas (por retrasos en la administración o fracaso terapéutico) puede favorecer la aparición de resistencias virales (Nyaku et al., 2017).

1.2.2. Controladores de élite (EC)

Los controladores de élite (EC) son un subgrupo muy reducido de personas infectadas por VIH-1, que representan menos del 1 % de los casos y que, sin recibir TAR, mantienen un control natural de la replicación viral, con cargas virales plasmáticas indetectables o por debajo de los límites de detección habituales (menores de 50–70 copias de ARN/ml) (Deeks & Walker, 2007).

Diversos estudios han demostrado que determinados alelos de los antígenos leucocitarios humanos de clase I (HLA), como HLA-B57, HLA-B27 o HLA-B52 favorecen la presentación eficiente de péptidos virales a linfocitos T CD8+ específicos frente al VIH-1, que desempeñan un papel clave en la supresión de la replicación viral, pudiendo reducir la producción de virus en células T CD4+ infectadas entre un 60 y 80 %. No obstante, el control observado en estos individuos se debe a una combinación de respuestas inmunitarias innatas y adaptativas (Hartana & Yu, 2021).

A pesar de ello, los EC constituyen un grupo heterogéneo y algunos pueden perder el control inmunológico con el tiempo. Factores como la presencia de viremia residual, picos virales transitorios, mayor diversidad genética del virus o cambios en el tropismo viral de CCR5 a CXCR4 se han relacionado con esta pérdida de control (Navarrete-Muñoz et al., 2020).

1.2.3. Viremia de bajo grado (VBG)

La viremia de bajo grado (VBG) se define como la detección de ARN plasmático de VIH-1 entre 50-500 copias/ml en pacientes bajo TAR, aunque algunos autores amplían este rango hasta 1000 copias/ml. Cuando se observan al menos dos episodios consecutivos de viremia dentro de estos rangos, el fenómeno se denomina viremia de bajo grado persistente (Ryscavage et al., 2014). Su origen se atribuye a la activación ocasional de una pequeña fracción de células del reservorio viral latente, inducida por estímulos como antígenos o citoquinas. Esta activación puede dar lugar a la liberación de partículas virales detectables en plasma; sin embargo, la eficacia de la TAR impide que dichas partículas establezcan nuevas rondas de infección (Siliciano & Greene, 2011).

Además de la activación ocasional del reservorio latente, los santuarios tisulares también pueden contribuir a la viremia de bajo grado. En estos compartimentos, especialmente en el tejido linfóide, las concentraciones de antirretrovirales pueden no ser completamente supresivas, permitiendo una producción viral continua que puede difundirse a la sangre u otros tejidos y contribuir al mantenimiento de niveles bajos de viremia detectable. Sin embargo, estas condiciones no suelen favorecer la aparición de resistencia, ya que no confieren una ventaja competitiva clara (Lorenzo-Redondo et al., 2016).

Aunque la relevancia clínica de los episodios de la VBG continúa siendo objeto de debate, algunos estudios sugieren que la persistencia de niveles de viremia entre 50 y 200 copias/ml podría asociarse con un mayor riesgo de fracaso virológico, entendido como la incapacidad de la TAR para mantener la supresión de la replicación viral y evidenciado por una carga viral persistentemente elevada (Zhang et al., 2025).

1.3. Relevancia del estudio de los reservorios del VIH-1

A pesar de la supresión eficaz de la replicación viral en plasma, el VIH-1 no se elimina completamente del organismo. La persistencia de los reservorios virales, su heterogeneidad celular y su contribución a la viremia residual constituyen los principales obstáculos para alcanzar la cura (Castro-González et al., 2018). En situaciones de baja adherencia o interrupción del tratamiento, la reactivación de estas células puede desencadenar un rebote viral con consecuencias clínicas significativas (Deeks et al., 2016).

Sin embargo, la comprensión actual de estos reservorios sigue siendo incompleta. Especialmente, se desconocen los mecanismos que regulan su persistencia, su distribución en el organismo, su contribución a la VBG y las estrategias más eficaces para su detección y eliminación. Por ello, profundizar en el estudio de los reservorios virales resulta imprescindible para superar las limitaciones actuales del tratamiento y avanzar hacia el desarrollo de una cura funcional o esterilizante para el VIH-1 (Chen et al., 2022).

Este TFG se enmarca en el proyecto RESERVIH, financiado por la convocatoria UNISALUT, un estudio exploratorio orientado a la caracterización de los reservorios virales en pacientes con diferentes respuestas al TAR, con el objetivo de predecir la aparición de VBG y esclarecer si las diferencias en la activación del VIH desde los reservorios responden a factores virológicos y/o inmunológicos.

2. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

2.1. Antecedentes

A pesar de la transición hacia TAR de acción prolongada, que supone una mejora en la adherencia, la supresión virológica no siempre se mantiene de forma sostenida. Se han descrito episodios de VBG intermitente en pacientes con aparente adherencia óptima, lo que sugiere la persistencia de fuentes de producción viral residual no completamente controladas por el tratamiento (Gutiérrez et al., 2025).

Tradicionalmente, los linfocitos T CD4+ han sido considerados el principal reservorio del virus; sin embargo, se ha demostrado que otras poblaciones celulares del sistema inmune también pueden contener material genético del virus, incluyendo los linfocitos T CD8+. En estas células se han identificado diferentes formas de ADN viral, tanto integradas como no integradas. En determinados contextos experimentales *in vitro*, se ha descrito que la infección no citopática de linfocitos T CD8+ puede asociarse a la producción de partículas virales. Dado que el ADN viral no integrado se considera generalmente no competente para la producción de viriones infectivos, se ha propuesto que, al menos en parte, dicha producción podría derivar de provirus integrados con capacidad transcripcional. En este sentido, algunos estudios han sugerido que las partículas virales generadas por estas células puedan conservar capacidad infectiva sobre linfocitos CD4+, lo que apunta a una posible contribución de los CD8+ en la dinámica viral (Mercure et al., 1993).

Por otra parte, aunque la mayor parte de los provirus son defectuosos, debido a deleciones, mutaciones o alteraciones en marcos de lectura, muchos conservan actividad transcripcional e incluso translacional, expresando proteínas virales (Singh et al., 2023). Estas últimas pueden activar tanto la inmunidad innata como la adaptativa, contribuyendo a un estado de activación inmune persistente con posibles implicaciones clínicas a largo plazo. Asimismo, se ha planteado que las proteínas derivadas de estos provirus defectuosos podrían formar partículas similares a virus o incluso participar en eventos de recombinación que den lugar a virus completos competentes para la replicación (Imamichi et al., 2020).

En conjunto, estos hallazgos indican que la contribución al reservorio viral depende no solo del número de células infectadas, sino de su capacidad funcional de producir ARN viral. Así, aunque los linfocitos T CD4+ constituyen el principal reservorio, la presencia de ADN viral

integrado y actividad transcripcional en linfocitos T CD8+ sugiere que estos podrían contribuir activamente a la señal de ARN viral detectada en plasma. De este modo, la relevancia de los linfocitos T CD8+ no radicaría en su abundancia, sino en su potencial transcripcional, lo que plantea un posible vínculo entre la actividad del reservorio y la viremia de bajo grado.

2.2. Objetivos

Nuestra **hipótesis** inicial es que en pacientes con infección por VIH-1 bajo TAR inyectable de acción prolongada con cabotegravir/rilpivirina, la presencia de VBG se asocia con una mayor actividad transcripcional del reservorio viral en linfocitos T CD8+, sugiriendo que esta población celular contribuye activamente a la viremia de bajo grado detectada en plasma. El **objetivo principal** de este trabajo es caracterizar la actividad transcripcional del reservorio del VIH-1 en linfocitos T CD4+ y CD8+ en pacientes bajo TAR inyectable con cabotegravir/rilpivirina, comparando aquellos con VBG frente aquellos con supresión virológica completa.

Para alcanzar este objetivo principal, se plantearon los **siguientes objetivos específicos**:

1. Cuantificar y comparar la actividad transcripcional del reservorio viral, medida como ARN intracelular del VIH-1 en linfocitos T CD4+ y CD8+ entre pacientes con VBG y pacientes con supresión virológica completa bajo TAR inyectable.
2. Evaluar si la presencia de VBG se asocia con una mayor actividad transcripcional del VIH-1 en linfocitos T CD8+.
3. Analizar la relación entre parámetros clínicos, incluyendo el recuento nadir de linfocitos T CD4+ y el tiempo bajo TAR, y la actividad transcripcional del reservorio viral en linfocitos T CD4+ y CD8+.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Diseño y procedimiento del estudio

Este estudio prospectivo fue realizado en una cohorte de pacientes con VIH-1 bajo TAR inyectable (cabotegravir/rilpivirina) en la Unidad de Enfermedades Infecciosas del Hospital General Universitario de Elche (HGUE, Elche, España). El estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Investigación con Medicamentos (CEIM, 2024.019) y por el Comité de Ética e Integridad en la Investigación de la Universidad de Miguel Hernández (CEII, 2025/534). Todos los participantes incluidos en este estudio firmaron un consentimiento informado, para la toma de sangre periférica. Se excluyeron aquellos pacientes que presentaban un seguimiento del tratamiento inferior a 5 años.

Los participantes se clasificaron en dos grupos según los niveles de viremia en sangre registrados durante los últimos 5 años: con VBG y sin VBG. Se clasificaron dentro del grupo de VBG a aquellos participantes que presentaron valores de VIH-1 entre 50 y 1000 copias/ml en ese período. En cambio, se clasificó como sin VBG a quienes no presentaron ningún episodio de viremia en ese mismo período (<50 copias/ml). Las mediciones de las viremias se llevaron a cabo en el Servicio de Microbiología del Hospital General de Elche.

3.2. Obtención y procesamiento de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs)

Para el aislamiento de las PBMCs de los participantes, se extrajeron dos tubos de 10 ml de sangre total con EDTA como anticoagulante a cada participante y se realizó un gradiente con Histopaque[®]-1077 (Sigma-Aldrich, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las PBMCs se recuperaron de la interfase y se lavaron con PBS 1x. El pellet celular obtenido se resuspendió en 1 ml de una disolución crioprotectora (FBS/DMSO, en proporción 9:1). Finalmente, las muestras se almacenaron en nitrógeno líquido hasta su uso.

Para su uso, las PBMCs criopreservadas se descongelaron rápidamente a 37 °C durante dos minutos para minimizar el tiempo de exposición al DMSO, que resulta citotóxico a temperatura ambiente. A continuación, se realizaron dos lavados consecutivos resuspendiendo la muestra en 10 ml de medio RPMI 1640 suplementado con 10 % de suero fetal bovino (FBS) y centrifugando a 400 g durante diez minutos a 20 °C. Tras decantar el sobrenadante, el pellet

celular se resuspendió en 1 ml de PBS 1x. Se extrajeron 300 µl de esta suspensión para verificar la calidad del aislamiento mediante citometría de flujo con el panel Tetra-combo (BD Biosciences), que permite determinar el porcentaje de linfocitos T CD3+, CD4+ y CD8+ y la razón CD4+:CD8+. Se comprobó que el porcentaje de CD3 se encontraba entre el 50-90 %, que la suma de las poblaciones CD4+ y CD8+ se aproximaba al total de CD3+ y que la razón CD4+:CD8+ era coherente con el perfil inmunológico esperado en pacientes con infección por VIH-1 bajo TAR.

3.3. Aislamiento de poblaciones de linfocitos CD4+ y CD8+

La separación de las poblaciones linfocitarias se realizó de forma secuencial a partir de las PBMCs de cada participante mediante la selección positiva por columnas magnéticas. En primer lugar, se aislaron los linfocitos T CD4+ utilizando el kit ProteinTech KMS002 (Proteintech, Estados Unidos), que emplea anticuerpos conjugados con partículas magnéticas dirigidos frente a CD4+, de modo que estas células quedan retenidas en la columna mientras el resto de las poblaciones celulares pasan al eluido. A continuación, dicho eluido se utilizó como punto de partida para el aislamiento de linfocitos T CD8+ mediante el kit KMS001 (Proteintech, Estados Unidos), basado en el mismo principio de selección positiva. En ambos casos se siguieron las instrucciones del fabricante.

Para verificar la pureza de cada fracción, se analizaron las alícuotas de cada población aislada mediante citometría de flujo con el panel Tetra-combo (BD Biosciences), determinando el porcentaje residual de CD8+ en la fracción de CD4+ y el porcentaje residual de CD4+ en la fracción de CD8+. Se estableció un umbral de contaminación cruzada máximo del 20 %, por debajo del cual se consideró que la separación era adecuada para los análisis posteriores.

3.4. Extracción y cuantificación de ARN

El ARN total de las fracciones de los linfocitos T CD4+ y CD8+ de cada participante se extrajo mediante el RNeasy Mini Kit (Qiagen, Alemania), basado en la adsorción selectiva del ARN a una membrana de sílice en condiciones de alta concentración de sales y su posterior elución con agua libre de RNasas. Se siguieron las instrucciones del fabricante. La concentración de ARN se cuantificó mediante el sistema fluorimétrico QuantiFluor® RNA System (Promega, Estados Unidos), que permite una cuantificación específica del ARN mediante la unión de un

fluorocromo intercalante, siguiendo el protocolo High Standard (cuando se espera una concentración entre 10 y 500 ng/μl) del fabricante.

3.5. Cuantificación del ARNm del VIH mediante RT-qPCR

La síntesis de ADN complementario (ADNc) se llevó a cabo a partir de 100 ng de ARN purificado como molde, utilizando el Maxima H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit with dsDNase (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos) y hexámeros aleatorios.

La concentración de ADNc se cuantificó mediante el sistema fluorimétrico QuantiFluor® ONE dsDNA System (Promega, Estados Unidos), que permite una cuantificación específica del ADN mediante la unión de un fluorocromo intercalante y se espera una concentración entre 0,2 y 400 ng/μl. Posteriormente, se analizaron 2 μl de ADNc mediante qPCR en tiempo real para cuantificar el ARNm.

Con el fin de seleccionar el gen de referencia más adecuado para la normalización, se evaluó la estabilidad de expresión de tres genes endógenos candidatos, RRM2B, HPRT1 y HMBS mediante ensayos TaqMan. Dado que HPRT1 presentó una expresión más estable, el gen de la hipoxantina fosforribosiltransferasa 1 (HPRT1) se empleó como control endógeno para la normalización de los datos.

Para la amplificación se empleó la mastermix qPCRBIO Probe Mix No-Rox (PCR Biosystems, Reino Unido), junto con los ensayos TaqMan comerciales específicos (Hs00968432_m1 para RRM2B, Vi07922337_po para VIH, Hs02800695_m1 para HPRT1 y Hs00609297_m1 para HMBS).

Las reacciones de qPCR se realizaron en el sistema QuantStudio 5 (Applied Biosystems, Estados Unidos), utilizándose el software asociado para la adquisición y el análisis de los datos. Las cuantificaciones relativas se realizaron usando el método de $2^{-\Delta\Delta CT}$ y todas las medidas fueron realizadas por duplicado.

3.6. Análisis estadístico

Los datos se organizaron y procesaron inicialmente en Microsoft Excel 365, donde se calcularon las medianas y rangos intercuartílicos (IQR). El análisis estadístico y la generación de gráficas se realizaron con el software R (versión 4.6.0).

Se consideraron valores de $p < 0,05$ como estadísticamente significativos y $p < 0,1$ como indicativos de una tendencia hacia la significación, criterio aplicado en el contexto de muestras de pequeño tamaño y la variabilidad biológica inherente a las muestras humanas (Thiese et al., 2016; Greenland et al., 2016). Los resultados se interpretaron con cautela, evitando una interpretación basada únicamente en un umbral fijo de significación estadística.

1 PARTICIPANTES CON VIH-1 BAJO CABOTEGRAVIR + RILPIVIRINA LAI

2 CUANTIFICACIÓN DE CARGA VIRAL EN PLASMA
(Enviada al Servicio de Microbiología del Hospital General de Elche)

3 CLASIFICACIÓN SEGÚN VBG

SIN VBG
<50 copias/ml en los últimos 5 años
n = 7

CON VBG
50 - 1000 copias/ml en los últimos 5 años
n = 7

4 AISLAMIENTO DE PBMCs

5 SEPARACIÓN DE POBLACIONES

Linfocitos CD8+

Linfocitos CD4+

6 CUANTIFICACIÓN DE TRANSCRITOS (RT-qPCR)

Amplification

Amplification

Virión de HIV-1

Abreviaturas: VBG (Viremia de Bajo Grado); PBMCs (Células mononucleares de sangre periférica); LAI (Antirretrovirales inyectables de acción prolongada)

4. RESULTADOS

4.1. Características de los participantes

Entre enero y marzo de 2025, se reclutaron 14 participantes (7 con VBG y 7 sin VBG según su historia clínica de 5 años previos), de los cuales se obtuvieron muestras de sangre total para su inclusión en el estudio. La ausencia de VBG en el grupo control fue confirmada además mediante la carga viral determinada en el momento de la extracción, siendo indetectable en todos los participantes de dicho grupo. Del total, 13 (92,9 %) eran hombres y 1 (7,1 %) era mujer al nacer, con una mediana de edad de 54,5 años (IQR, 41—57,5). La mayoría (78,6 %, n = 11) eran caucásicos. En cuanto a la ruta de transmisión del VIH, el 71,4 % eran hombres que tienen sexo con hombres (HSH) y la mediana del recuento de CD4 nadir fue de 217 células/ μ L. Las características basales se detallan en la **Tabla 1**. No se observaron diferencias demográficas ni virológicas estadísticamente significativas entre ambos grupos. Sin embargo, se observó una tendencia hacia una mayor frecuencia de carga viral plasmática (>20 copias/ml) en los participantes con VBG respecto a aquellos sin VBG (57,1 % vs 0 %; p = 0,070).

CARACTERÍSTICAS	CON VBG (N=7)	SIN VBG (N=7)	TODOS LOS PARTICIPANTES (N=14)	P-VALUE
EDAD, MEDIANA (IQR)	40 (35-37)	55 (51-58,5)	54,5 (41-57,5)	0,222
SEXO, N (%)				1
HOMBRES	7 (100)	6 (85,7)	13 (92,9)	
MUJERES	0 (0)	1 (14,3)	1 (7,1)	
ORIGEN, N (%)				1
CAUCÁSICO	5 (71,4)	6 (85,7)	11 (78,6)	
OTRO	2 (28,6)	1 (14,3)	3 (21,4)	
RUTA DE TRANSMISIÓN HIV, N (%)				0,192
HSH	6 (85,7)	4 (57,1)	10 (71,4)	
HTSX	0 (0)	3 (42,9)	3 (21,4)	
UDVP	1 (14,3)	0 (0)	1 (7,1)	
CD4 NADIR, CÉLULAS/ μ L, MEDIANA (IQR)	180 (134-331)	254 (132,5-395)	217 (134-369,3)	0,874
CARGA VIRAL ACTUAL (>20 COPIAS/ML), N (%)	4 (57,1)	0 (0)	4 (28,6)	0,070

Tabla 1. Características basales de los participantes

Abreviaturas: VBG (Viremia de Bajo Grado); HSH (Hombres que tienen sexo con hombres); HTSX (Heterosexual); UDVP (Usuarios de Drogas por Vía Parenteral); IQR (Rango intercuartílico)

4.2. Control de calidad del aislamiento celular

De la sangre total se aislaron las PBMCs y, de ahí, las poblaciones CD4+ y CD8+. Con el fin de verificar la pureza de las fracciones celulares obtenidas, se determinó mediante citometría de flujo el porcentaje residual de CD8+ en la fracción de CD4+ y el porcentaje residual de CD4+ en la fracción de CD8+ de cada participante (**Figura 4**). En ambas fracciones, todos los valores se situaron por debajo del umbral establecido del 20 %, con una mediana de 12,43 % (IQR, 11,42—14,98) para la contaminación residual de CD8+ en CD4+, y de 3,66 % (IQR, 3,3—10,81) para la contaminación residual de CD4+ en CD8+. No se observaron diferencias en los porcentajes de contaminación cruzada entre los participantes con VBG y sin VBG, lo que indica que la calidad del aislamiento fue homogénea entre ambos grupos. Estos resultados confirman la idoneidad de las fracciones celulares obtenidas para los análisis posteriores.

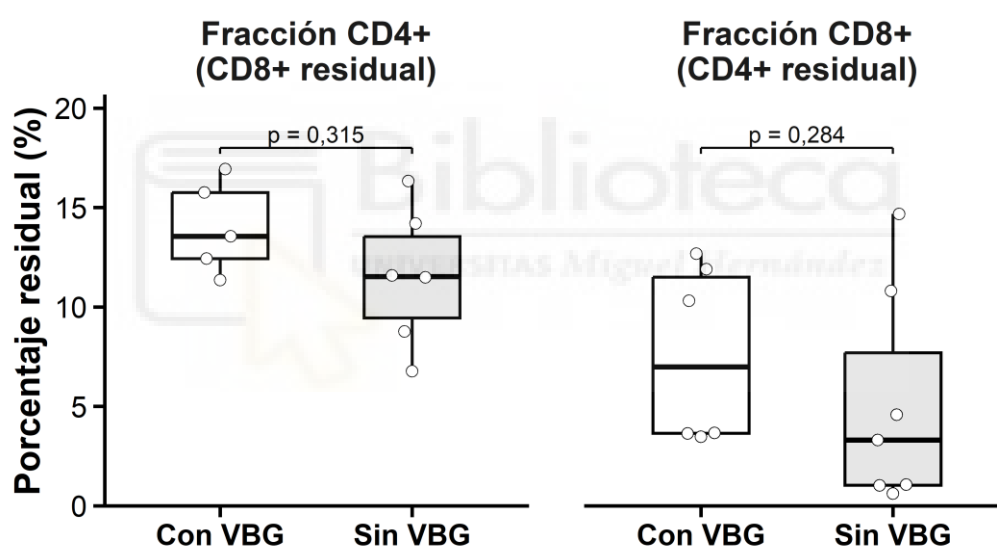


Figura 4. Porcentaje residual de contaminación cruzada en las fracciones CD4+ y CD8+ de participantes con y sin viremia de bajo grado (VBG). Los puntos representan los valores individuales, la línea central de cada caja corresponden a la mediana y las cajas representan el rango intercuartílico. Las comparaciones entre grupos se realizaron mediante la prueba de Mann—Whitney.

4.3. Caracterización inmunológica de los grupos

Con el fin de observar las diferencias inmunológicas entre ambos grupos, se analizó la distribución de las subpoblaciones de linfocitos T, expresada como porcentaje sobre el total de linfocitos T (CD3+), y el equilibrio inmunológico mediante el ratio CD4:CD8. Los resultados se recogen en la **Tabla 2**.

El porcentaje de linfocitos T CD4+ sobre CD3+ fue mayor en el grupo sin VBG en comparación con el grupo con VBG (47,42 % vs 37,33 %; $p = 0,053$), observándose una tendencia cercana a la significación estadística. De manera concordante, el ratio CD4:CD8 también mostró valores superiores en los individuos sin VBG (1,32 vs 0,82; $p = 0,073$).

Por el contrario, el porcentaje de linfocitos T CD8+ sobre CD3+ fue ligeramente superior en el grupo con VBG (51,64 % vs 43,43 %), aunque esta diferencia no alcanzó significación estadística ($p = 0,128$).

En conjunto, estos resultados sugieren un perfil inmunológico diferencial entre ambos grupos, con una tendencia hacia una mayor proporción de linfocitos T CD4+ y un ratio CD4:CD8 más elevado en los participantes sin VBG, aunque las diferencias no alcanzaron significación estadística.

CARACTERÍSTICAS	CON VBG (n=7)	SIN VBG (n =7)	TODOS LOS PARTICIPANTES (n =14)	P-VALUE
%CD4/CD3	37,33 (33,24-45,31)	47,42 (43,56-56,07)	43,56 (38,2-52,05)	0,053
%CD8/CD3	51,64 (48,27-60,27)	43,43 (34,27-46,50)	46,5 (40,71-52,32)	0,128
RATIO CD4:CD8	0,82 (0,6-1,05)	1,32 (0,92-1,51)	1,01 (0,81-1,28)	0,073

Tabla 2: Parámetros inmunológicos basales de los participantes, comparando los grupos con y sin viremia de bajo grado (VBG). Los valores se expresan como mediana (IQR).

4.4. Selección del control endógeno

Con el objetivo de seleccionar un gen endógeno adecuado para la normalización de los análisis de expresión relativa mediante RT-qPCR, se evaluó la estabilidad de expresión de los genes HPRT1, RRM2B y HMBS en las fracciones CD4+ y CD8+ de participantes con y sin VBG. Todas las determinaciones se realizaron por duplicado técnico y los valores representados corresponden al promedio de Ct de cada muestra.

Los tres genes evaluados mostraron valores de Ct comparables entre los grupos con y sin VBG, sin observarse diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los casos analizados ($p > 0,05$) (**Figura 5**). HPRT1 presentó una menor dispersión de los valores de Ct y una distribución más homogénea entre las muestras analizadas. Por el contrario, RRM2B presentó una mayor variabilidad en la fracción CD4+, especialmente en el grupo sin VBG. HMBS presentó valores próximos a la significación estadística ($p = 0,083$), lo que introduce cierta incertidumbre sobre su estabilidad de expresión entre grupos.

Considerando estos resultados, HPRT1 fue seleccionado como gen endógeno de referencia para los análisis posteriores por presentar la mayor estabilidad y homogeneidad de expresión entre los grupos y fracciones celulares analizados.

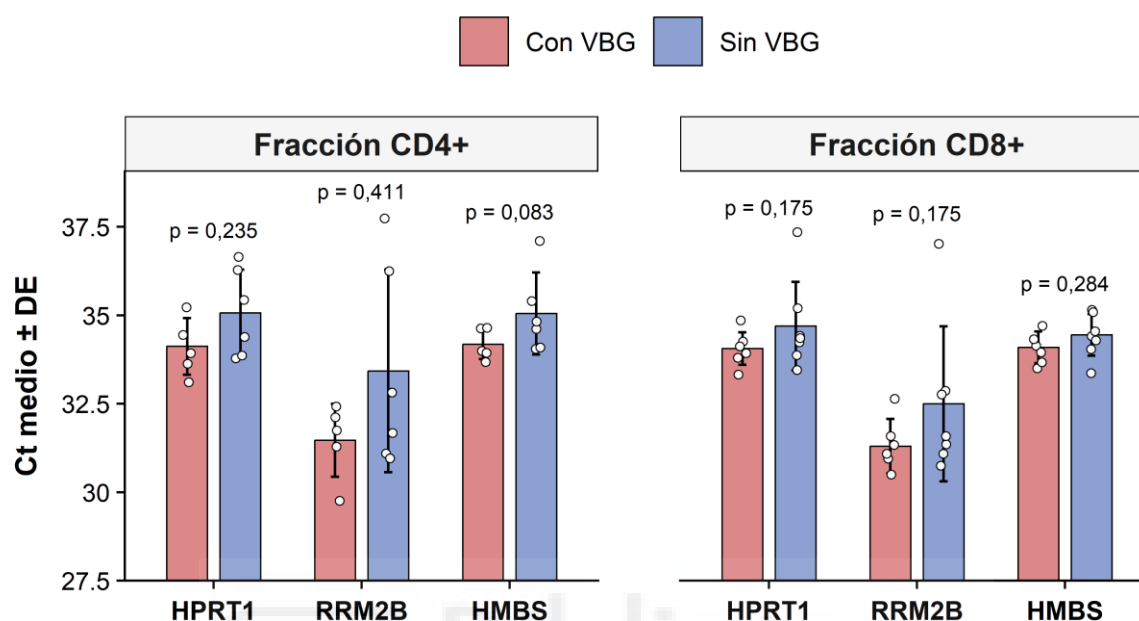


Figura 5. Expresión de los genes endógenos HPRT1, RRM2B y HMBS en las fracciones CD4+ y CD8+ de pacientes con y sin viremias de bajo grado (VBG). Los puntos representan los valores individuales y las barras indican la media $\pm$ desviación estándar (DE). El análisis estadístico se realizó mediante la prueba de Mann—Whitney.

4.5. Detección de VIH en las fracciones linfocitarias

Se analizó la expresión relativa del ARNm de VIH-1 en las fracciones CD4+ y CD8+ de los participantes con VBG respecto a los controles sin VBG, utilizando HPRT1 como gen endógeno de referencia para la normalización de los datos (**Figura 6**).

En la fracción CD4+, los participantes sin VBG mostraron niveles de expresión relativa del ARNm viral superiores a los del grupo con VBG (3,420 vs 1,046), observándose una tendencia hacia la significación estadística ($p = 0,083$).

En la fracción CD8+, los niveles de expresión relativa de ARNm de VIH-1 también fueron superiores en el grupo sin VBG respecto al grupo con VBG (2,615 vs 0,750), aunque en este caso no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,943$).

Estos resultados son contrarios a lo inicialmente esperado, ya que cabría anticipar una mayor expresión del ARNm viral en los participantes con VBG.

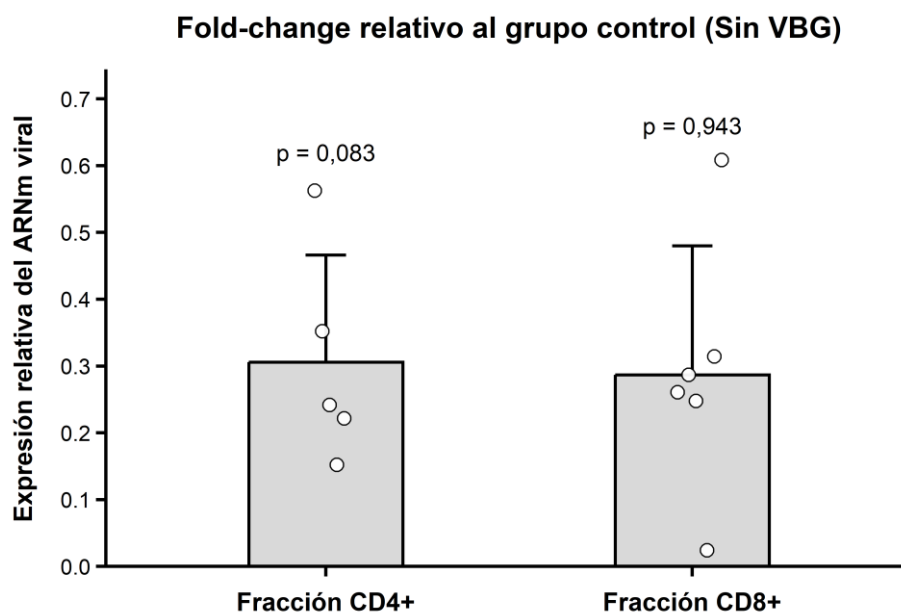


Figura 6. Expresión relativa de ARNm de VIH-1 en las fracciones CD4+ y CD8+ de pacientes con viremias de bajo grado (VBG) respecto a sus correspondientes controles sin VBG. Los puntos representan los valores individuales, las barras indican la media y la barra de error superior corresponde a la desviación estándar. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba de Mann—Whitney.

4.6. Relación entre el tiempo de inicio del TAR y la presencia de VBG

Se analizó el tiempo transcurrido entre el diagnóstico de la infección por VIH-1 y el inicio del TAR en pacientes con y sin VBG (**Figura 7**). Ambos grupos mostraron una elevada variabilidad interindividual. La mediana del tiempo hasta el inicio del TAR fue de 52 días (IQR, 28—104) en los pacientes con VBG y de 174 días (IQR, 16—244) en aquellos sin VBG. Aunque el grupo sin VBG presentó una mediana ligeramente superior, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos ($p = 0,798$).

Estos resultados sugieren que el tiempo transcurrido entre el diagnóstico y el inicio del TAR fue comparable entre los pacientes con y sin VBG.

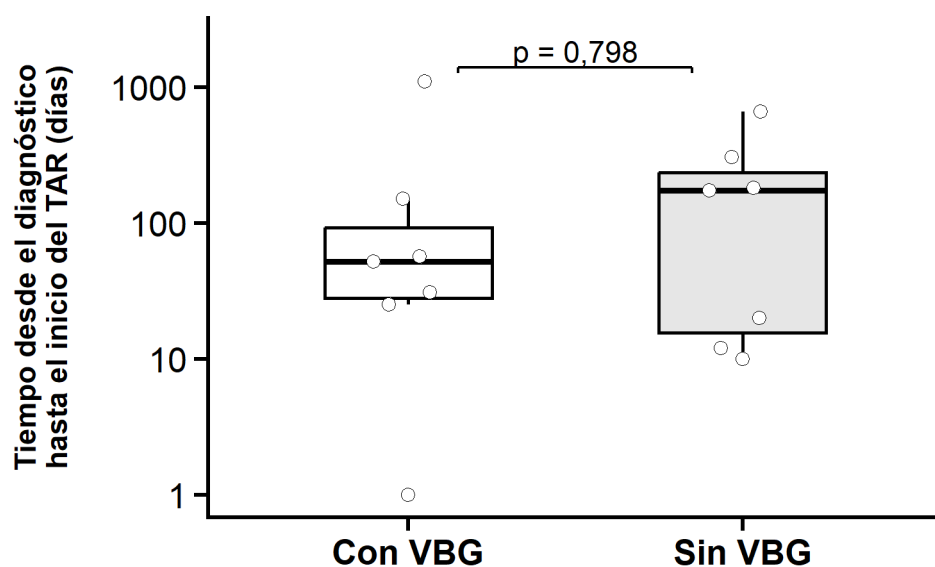
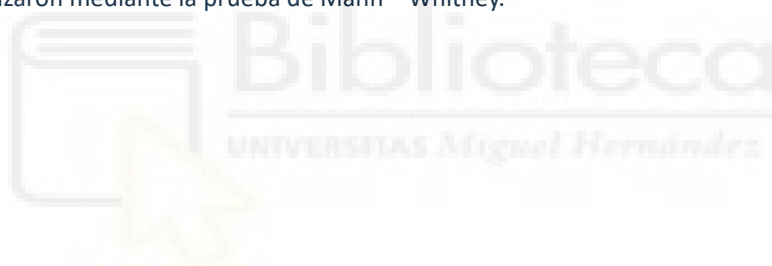


Figura 7. Tiempo transcurrido en días entre el diagnóstico de la infección por VIH-1 y el inicio del tratamiento antirretroviral (TAR) en pacientes con y sin viremias de bajo grado (VBG). Las cajas muestran el rango intercuartílico, la línea central la mediana y los puntos representan los valores individuales. Las comparaciones entre grupos se realizaron mediante la prueba de Mann—Whitney.



5. DISCUSIÓN

El presente estudio evaluó la posible relación entre la presencia de VBG y la actividad transcripcional del VIH-1 en fracciones celulares CD4+ y CD8+ de pacientes bajo TAR inyectable de acción prolongada con cabotegravir/rilpivirina. En conjunto, los resultados obtenidos sugieren la existencia de diferencias tendenciales en el perfil inmunológico de los pacientes con VBG respecto a aquellos sin VBG, caracterizadas por un menor porcentaje de linfocitos T CD4+, una mayor representación relativa de la población CD8+ y un ratio CD4:CD8 más reducido. Aunque ninguna de estas diferencias alcanzó la significación estadística, las tendencias observadas podrían reflejar una estimulación antigénica continua ejercida por la actividad viral residual persistente, que mantendría el sistema inmunitario en un estado de activación crónica de baja intensidad. De forma inesperada, el análisis de la expresión relativa del ARNm viral no evidenció un incremento de la actividad transcripcional en los pacientes con VBG, observándose una tendencia opuesta a la hipótesis inicial, con niveles superiores de expresión en la fracción CD4+ de los pacientes sin VBG. Este hallazgo contraintuitivo constituye el eje central de la discusión y apunta a que la relación entre transcripción viral intracelular y viremia plasmática de bajo grado es considerablemente más compleja de lo inicialmente planteado.

La tendencia hacia una mayor representación relativa de linfocitos T CD8+ en los pacientes con VBG, aunque no significativa, invita a reflexionar sobre el papel de estos linfocitos en el contexto de la infección por VIH-1 bajo TAR. Los linfocitos CD8+ constituyen uno de los principales mecanismos efectores de la respuesta inmunitaria frente al VIH-1, desempeñando un papel fundamental tanto en el control de la replicación viral como en la limitación de la progresión de la infección. La actividad citotóxica de estas células permite el reconocimiento y la eliminación de las células del reservorio viral. No obstante, aunque los linfocitos CD8+ pueden ejercer cierto grado de control sobre provirus defectivos o transcripcionalmente activos, diversos estudios sugieren que su capacidad para erradicar reservorios que contienen provirus intactos y potencialmente replicativos es considerablemente más limitada (Li et al., 2022).

Se ha descrito que la persistencia de recuentos elevados de linfocitos CD8+ acompañada de una recuperación incompleta de la población CD4+, incluso bajo TAR eficaz, refleja que el sistema inmunitario continúa respondiendo de forma crónica a antígenos residuales,

manteniéndose un estado de inflamación persistente de baja intensidad (Lu et al., 2015). De acuerdo con ello, la tendencia observada en el presente estudio hacia un mayor predominio relativo de linfocitos CD8+, junto con menores porcentajes de CD4+ y un ratio de CD4:CD8 más reducido en los pacientes con VBG, podría reflejar la existencia de una estimulación antigénica residual persistente pese a la supresión virológica mantenida. Asimismo, una disminución del ratio CD4:CD8 resultaría consistente con un estado de recuperación inmunológica incompleta y activación inflamatoria residual descrita en pacientes con supresión virológica prolongada (Garrido-Rodríguez et al., 2024).

En línea con esta complejidad inmunológica, algunos estudios recientes han señalado que un recuento nadir de CD4 inferior a 200 células/ μ l previo al inicio del TAR se asocia con un mayor riesgo de desarrollar VBG en personas que viven con VIH (Tan et al., 2025). Bajo esta premisa, cabría esperar que los pacientes con VBG presenten un menor recuento histórico de CD4 nadir. Aunque en el presente estudio no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos, la mediana de CD4 nadir fue ligeramente superior en los pacientes sin VBG, mostrando una tendencia concordante con lo descrito previamente en la literatura.

El tiempo transcurrido entre el diagnóstico y el inicio del TAR constituye una variable de interés debido a su potencial impacto sobre el establecimiento del reservorio viral. De hecho, el estudio MERLIN demostró que una proporción importante del reservorio de VIH-1 se establece durante las primeras semanas de infección y que el inicio del TAR dentro de los primeros treinta días favorece una disminución más rápida y sostenida de distintos marcadores del reservorio viral (Massanella et al., 2021). De acuerdo con estos hallazgos, cabría esperar que los individuos con VBG hubieran iniciado el tratamiento más tardíamente. Sin embargo, en la cohorte del presente estudio se observó la tendencia opuesta, los individuos con VBG tendieron a iniciar el tratamiento antes que aquellos sin VBG, aunque las diferencias entre ambos grupos no fueron estadísticamente significativas. Este conjunto, estos resultados sugieren que los mecanismos implicados en la aparición de VBG podrían no estar determinados exclusivamente por factores con el establecimiento inicial del reservorio viral.

El análisis de la expresión relativa del ARNm viral no evidenció un incremento de la actividad transcripcional asociada a la presencia de VBG, contrariamente a la hipótesis inicialmente planteada. De hecho, se observó una tendencia opuesta, con niveles promedio

de expresión relativamente superiores en los pacientes sin VBG. Esta misma tendencia fue observada en la fracción CD4+, donde las diferencias resultaron incluso más marcadas. Pese a la ausencia de significación estadística, los resultados sugieren que la expresión intracelular de ARNm viral no refleja por sí sola la capacidad del reservorio para generar VBG, sino que debe interpretarse conjuntamente con la integridad estructural y la competencia replicativa de los provirus que lo componen.

Para comprender este hallazgo, es importante distinguir entre el ARNm viral intracelular detectado mediante RT-qPCR en las PBMCs y el ARN viral extracelular detectado en plasma para definir la VBG. El primero refleja la actividad transcripcional del reservorio dentro de las células, independientemente de si esos transcritos dan lugar a partículas virales funcionales. El segundo, en cambio, representa partículas virales completas y competentes que han salido de las células infectadas y circulan libres en sangre. Por tanto, una mayor expresión intracelular de ARNm viral no implica necesariamente una mayor viremia plasmática, ya que la capacidad de un provirus para generar partículas virales funcionales depende de su integridad estructural y no únicamente de la cantidad de ARNm que produzca.

La persistencia viral en células inmunitarias no constituye un fenómeno exclusivo del VIH-1. Otros virus humanos capaces de establecer infecciones crónicas, como el virus de Epstein-Barr (EBV), el virus linfotrópico de células T humanas tipo 1 (HTLV-1) o el herpesvirus humano 6 (HHV-6), desarrollan mecanismos de latencia y persistencia a largo plazo en poblaciones celulares específicas. En el caso de EBV, el virus persiste principalmente en linfocitos B de memoria mediante programas de latencia reversible. Por su parte, HTLV-1 infecta preferentemente linfocitos T CD4+ colaboradores (*helper*), donde mantiene la infección a través de la expansión clonal de células infectadas y una expresión viral limitada e intermitente que favorece su persistencia a largo plazo. De manera similar, HHV-6 presenta un marcado tropismo por linfocitos T CD4+ y posee la capacidad de integrar su genoma en regiones teloméricas del ADN celular, permaneciendo en estado latente durante periodos prolongados y conservando la posibilidad de reactivarse bajo determinadas condiciones (Bangham 2023; Pantry & Medveczky, 2017; Thorley-Lawson, 2015). En conjunto, estos ejemplos ponen de manifiesto que la capacidad de persistir a largo plazo en poblaciones celulares específicas y mantener una actividad viral restringida constituye una estrategia común entre los distintos virus persistentes.

El ADN proviral del VIH-1 está constituido por una población heterogénea, en la que la mayor parte son defectivos y presentan delecciones, mutaciones o alteraciones estructurales que comprometen su capacidad replicativa (Yukl et al., 2018; Singh et al., 2023). Sin embargo, muchos de estos provirus conservan capacidad transcripcional e incluso capacidad traduccional parcial, permitiendo la producción de ARN viral y determinados antígenos sin generar necesariamente partículas virales competentes (Imamichi et al., 2020). En este sentido, Dubé *et al.* (2023) describieron, mediante la técnica RNAflow-FISH, que algunas células del reservorio son capaces de expresar ARN viral de forma espontánea durante TAR supresor, incluso sin necesidad de reactivación externa. Asimismo, observaron que no todas las células del reservorio se comportan igual: algunas mantienen una actividad transcripcional basal continua mientras que otras permanecen en estado de latencia más profunda. Por otro lado, aunque muchas de estas células transcripcionalmente activas alberguen provirus defectivos, dependiendo de dónde se localice el defecto, pueden seguir produciendo determinados antígenos virales, lo que contribuiría a mantener el sistema inmunitario en un estado persistente de activación.

De forma complementaria, distintos trabajos han demostrado que determinados reservorios persistentes pueden desarrollar mecanismos de resistencia frente a la eliminación mediada por células CD8+, especialmente aquellas células que albergan provirus intactos y expresan marcadores asociados a agotamiento inmunológico, un estado en el que los linfocitos T CD8+ pierden su capacidad de reconocer y eliminar células infectadas debido a la estimulación antigénica crónica sostenida (Takata et al., 2023). Esto pone en manifiesto que el reservorio viral no es una entidad estática ni homogénea, sino una población dinámica y heterogénea de células con distintos grados de latencia, actividad transcripcional, capacidad traduccional y competencia replicativa, cuya composición cualitativa podría ser más determinante para la aparición de VBG que la magnitud absoluta de la transcripción viral.

Bajo esta perspectiva, los mayores niveles de ARNm observados en los pacientes sin VBG, particularmente en la fracción CD4+, podrían corresponder predominantemente a transcritos derivados de provirus defectivos que, pese a mantener capacidad transcripcional, presentan alteraciones estructurales que limitarían el ensamblaje eficiente de partículas virales funcionales, favoreciendo la producción de viriones defectuosos, incompletos o rápidamente eliminados. Esto explicaría la ausencia de ARN viral detectable en plasma pese a una expresión

intracelular relativamente superior. Por lo contrario, los individuos con VBG podrían albergar un reservorio globalmente menos transcripcionalmente activo, pero relativamente enriquecido en provirus competentes. En consecuencia, cantidades menores de transcritos podrían resultar suficientes para generar partículas virales funcionales capaces de alcanzar la circulación plasmática y favorecer la detección de viremias de bajo grado (**Figura 8**).

En este contexto, factores como la integridad proviral, la eficiencia traduccional, la competencia replicativa de los provirus persistentes o la localización anatómica del reservorio podrían desempeñar un papel relevante en la aparición de VBG bajo TAR inyectable de acción prolongada, más allá de la magnitud absoluta de la transcripción viral intracelular. Asimismo, los datos obtenidos no evidenciaron una asociación clara entre la expresión viral en linfocitos T CD8+ y la presencia de VBG. En conjunto, estos hallazgos sugieren que la actividad transcripcional del VIH-1 en los linfocitos T CD8+ circulantes, al menos en las PBMCs analizadas, no parece constituir por sí sola un factor determinante en la aparición de VBG en pacientes tratados con cabotegravir/rilpivirina de acción prolongada. No obstante, la posible contribución de otros componentes del reservorio viral o de compartimientos anatómicos no evaluados en este estudio no puede descartarse.

Desde una perspectiva clínica, estos hallazgos contribuyen a ampliar el conocimiento sobre los mecanismos potencialmente implicados en la VBG bajo TAR de acción prolongada, sugiriendo que la aparición de VBG podría estar determinada en mayor medida por la competencia funcional de los provirus persistentes que por la magnitud absoluta de su actividad transcripcional. Una mejor caracterización molecular y funcional de estos reservorios podría resultar de interés para futuras estrategias de monitorización virológica más precisas y de aproximaciones terapéuticas dirigidas al control funcional o la eliminación del reservorio viral del VIH-1.

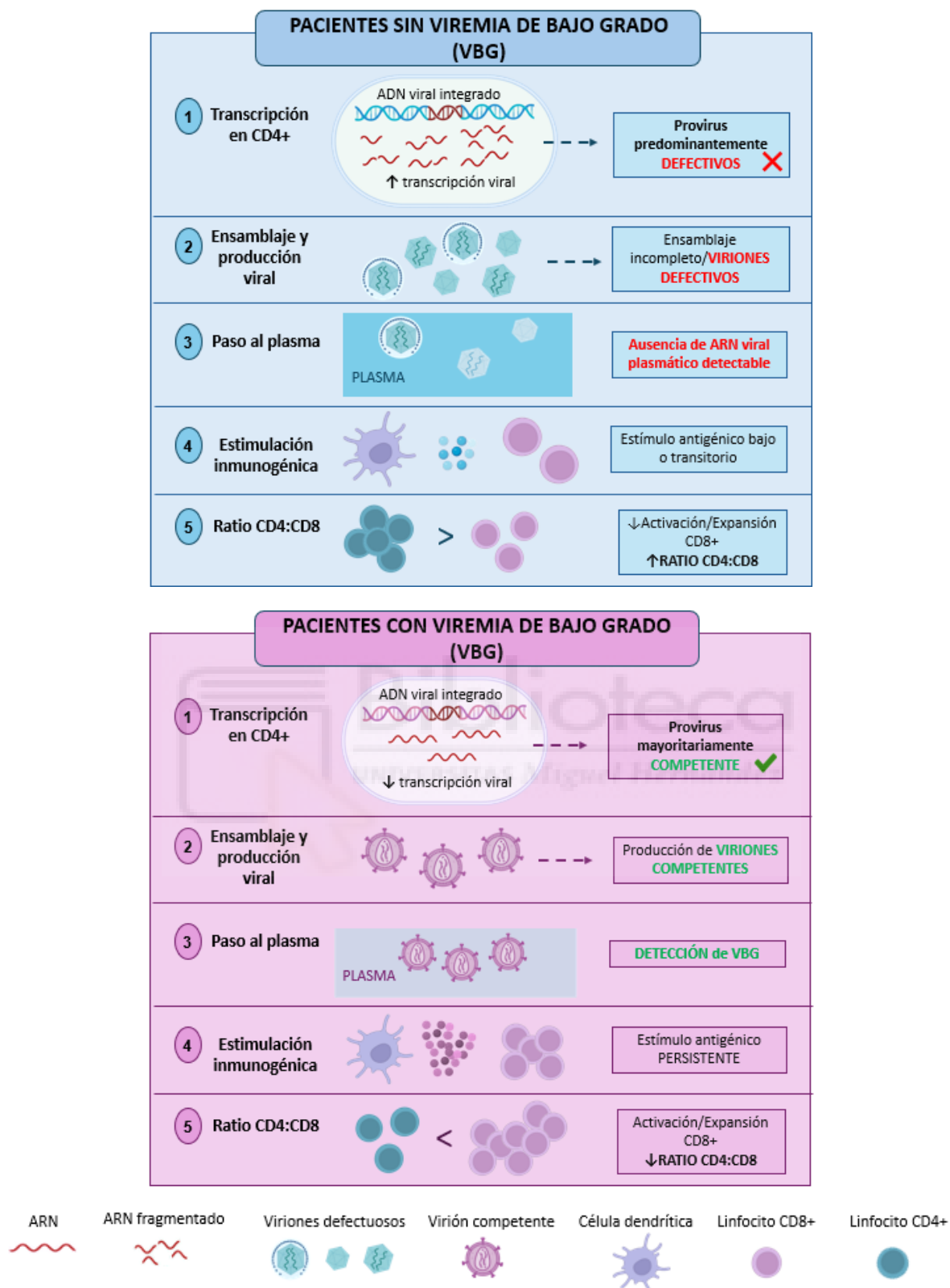


Figura 8. Modelo hipotético integrador propuesto para explicar la presencia o ausencia de viremia de bajo grado (VBG) en función de la competencia transcripcional y productiva del reservorio viral. En pacientes sin VBG, una mayor transcripción viral podría asociarse a productos defectuosos o no competentes, incapaces de generar viriones detectables en plasma. En cambio, en pacientes con VBG, una menor transcripción viral, pero potencialmente más competente, podría favorecer la producción de viriones funcionales, su detección plasmática y una mayor estimulación antigénica persistente. Creada mediante Biorender.

6. CONCLUSIÓN Y PERSPECTIVAS FUTURAS

Los principales hallazgos del presente estudio pueden resumirse en las siguientes conclusiones:

1. Los pacientes con VBG mostraron una tendencia hacia un perfil inmunológico diferencial, caracterizado por menos porcentajes de linfocitos CD4+, una expansión relativa de la población CD8+ y un ratio CD4:CD8 más reducido, aunque estas diferencias no alcanzaron significación estadística, probablemente debido al reducido tamaño muestral.
2. Se observó una tendencia hacia mayores niveles de transcripción viral en los individuos sin VBG, especialmente en la fracción CD4+, aunque sin alcanzar significación estadística. Asimismo, no se observó una asociación clara entre la expresión viral en linfocitos CD8+ y la presencia de VBG.
3. Los hallazgos del presente estudio refuerzan la complejidad biológica del reservorio viral del VIH-1 y sugieren que factores cualitativos, como la integridad proviral, la competencia replicativa o la eficiencia de producción viral, podrían desempeñar un papel relevante en la aparición de VBG bajo TAR inyectable de acción prolongada cabotegravir/rilpivirina.

En cuanto a las perspectivas futuras, los resultados obtenidos en este estudio abren nuevas líneas de investigación que podrían contribuir a esclarecer con mayor precisión los mecanismos implicados en la persistencia de VBG bajo TAR. Los futuros estudios deberían centrarse en ampliar el tamaño muestral con el objetivo de aumentar la potencia estadística y validar las tendencias observadas en esta cohorte. Además, resultaría de interés comparar estos hallazgos con cohortes de personas con TAR oral, con el fin de evaluar si las tendencias observadas entre la transcripción intracelular y la VBG son compartidas por distintas modalidades terapéuticas o si dependen específicamente de la formulación inyectable de acción prolongada.

Otra línea sería incorporar metodologías capaces de diferenciar entre provirus defectivos e intactos potencialmente competentes, como la secuenciación proviral de longitud completa, los ensayos de competencia replicativa o las aproximaciones basadas en PCR digital y caracterización molecular del reservorio. Asimismo, la cuantificación de ARN viral extracelular

en plasma mediante metodologías de alta sensibilidad permitiría esclarecer si existe una relación entre la actividad transcripcional intracelular observada y la liberación de material viral detectable en circulación.

La incorporación de metodologías complementarias, como análisis transcriptómicos y epigenéticos, podría aportar también información valiosa sobre los distintos estados funcionales y la posible heterogeneidad del reservorio entre individuos con y sin VBG. De forma paralela, también resultaría interesante explorar la relación entre la persistencia de VBG y variables clínicas o inmunológicas adicionales, como la evolución longitudinal del ratio CD4:CD8.

Finalmente, estos hallazgos sugieren que futuras estrategias de monitorización y seguimiento virológico podrían beneficiarse de enfoques más integradores que no se limiten a la cuantificación del ARN viral plasmático, sino que incorporen también información relacionada con la integridad proviral, la competencia replicativa y la actividad transcripcional del reservorio.



7. BIBLIOGRAFÍA

1. Barton, K., Winckelmann, A., & Palmer, S. (2016). HIV-1 Reservoirs During Suppressive Therapy. *Trends in microbiology*, 24(5), 345–355.
<https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.01.006>
2. Bangham C. R. M. (2023). HTLV-1 persistence and the oncogenesis of adult T-cell leukemia/lymphoma. *Blood*, 141(19), 2299–2306.
<https://doi.org/10.1182/blood.2022019332>
3. Blankson, J. N., Persaud, D., & Siliciano, R. F. (2002). The challenge of viral reservoirs in HIV-1 infection. *Annual review of medicine*, 53, 557–593.
<https://doi.org/10.1146/annurev.med.53.082901.104024>
4. Boulassel, M. R., Chomont, N., Pai, N. P., Gilmore, N., Sékaly, R. P., & Routy, J. P. (2012). CD4 T cell nadir independently predicts the magnitude of the HIV reservoir after prolonged suppressive antiretroviral therapy. *Journal of clinical virology: the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*, 53(1), 29–32.
<https://doi.org/10.1016/j.jcv.2011.09.018>
5. Buisker, T. R., Dufour, M. S., & Myers, J. J. (2015). Recall of Nadir CD4 Cell Count and Most Recent HIV Viral Load Among HIV-Infected, Socially Marginalized Adults. *AIDS and behavior*, 19(11), 2108–2116. <https://doi.org/10.1007/s10461-015-1018-x>
6. Castro-Gonzalez, S., Colomer-Lluch, M., & Serra-Moreno, R. (2018). Barriers for HIV Cure: The Latent Reservoir. *AIDS research and human retroviruses*, 34(9), 739–759.
<https://doi.org/10.1089/AID.2018.0118>
7. Chen, J., Zhou, T., Zhang, Y., Luo, S., Chen, H., Chen, D., Li, C., & Li, W. (2022). The reservoir of latent HIV. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 12, 945956.
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.945956>
8. Chou, R., Spencer, H., Bougatsos, C., Blazina, I., Ahmed, A., & Selph, S. (2023). Preexposure Prophylaxis for the Prevention of HIV: Updated Evidence Report and Systematic Review for the US Preventive Services Task Force. *JAMA*, 330(8), 746–763.
<https://doi.org/10.1001/jama.2023.9865>
9. Chou, T. C., Maggirwar, N. S., & Marsden, M. D. (2024). HIV Persistence, Latency, and Cure Approaches: Where Are We Now? *Viruses*, 16(7), 1163.
<https://doi.org/10.3390/v16071163>

10. Cohn, L. B., Chomont, N., & Deeks, S. G. (2020). The Biology of the HIV-1 Latent Reservoir and Implications for Cure Strategies. *Cell host & microbe*, 27(4), 519–530.
<https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.03.014>
11. Colin, L., & Van Lint, C. (2009). Molecular control of HIV-1 postintegration latency: implications for the development of new therapeutic strategies. *Retrovirology*, 6, 111.
<https://doi.org/10.1186/1742-4690-6-111>
12. Dahl, V., Josefsson, L., & Palmer, S. (2010). HIV reservoirs, latency, and reactivation: prospects for eradication. *Antiviral research*, 85(1), 286–294.
<https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2009.09.016>
13. Deeks, S. G., & Walker, B. D. (2007). Human immunodeficiency virus controllers: mechanisms of durable virus control in the absence of antiretroviral therapy. *Immunity*, 27(3), 406–416. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.08.010>
14. Deeks, S. G., Lewin, S. R., Ross, A. L., Ananworanich, J., Benkirane, M., Cannon, P., Chomont, N., Douek, D., Lifson, J. D., Lo, Y. R., Kuritzkes, D., Margolis, D., Mellors, J., Persaud, D., Tucker, J. D., Barre-Sinoussi, F., International AIDS Society Towards a Cure Working Group, Alter, G., Auerbach, J., Autran, B., ... Zack, J. (2016). International AIDS Society global scientific strategy: towards an HIV cure 2016. *Nature medicine*, 22(8), 839–850. <https://doi.org/10.1038/nm.4108>
15. Dubé, M., Tastet, O., Dufour, C., Sannier, G., Brassard, N., Delgado, G. G., Pagliuzza, A., Richard, C., Nayrac, M., Routy, J. P., Prat, A., Estes, J. D., Fromentin, R., Chomont, N., & Kaufmann, D. E. (2023). Spontaneous HIV expression during suppressive ART is associated with the magnitude and function of HIV-specific CD4⁺ and CD8⁺ T cells. *Cell host & microbe*, 31(9), 1507–1522.e5. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2023.08.006>
16. Garrido-Rodríguez, V., Bulnes-Ramos, Á., Olivas-Martínez, I., Pozo-Balado, M. D. M., Álvarez-Ríos, A. I., Gutiérrez, F., Izquierdo, R., García, F., Tiraboschi, J. M., Vera-Méndez, F., Peraire, J., Rull, A., Pacheco, Y. M., & CoRIS cohort (2024). The persistence of low CD4/CD8 ratio in chronic HIV-infection, despite ART suppression and normal CD4 levels, is associated with pre-therapy values of inflammation and thymic function. *Journal of microbiology, immunology, and infection = Wei mian yu gan ran za zhi*, 57(6), 854–867.
<https://doi.org/10.1016/j.jmii.2024.08.007>
17. Greenland, S., Senn, S. J., Rothman, K. J., Carlin, J. B., Poole, C., Goodman, S. N., & Altman, D. G. (2016). Statistical tests, P values, confidence intervals, and power: a guide

- to misinterpretations. *European journal of epidemiology*, 31(4), 337–350.
<https://doi.org/10.1007/s10654-016-0149-3>
18. Günthard, H. F., Aberg, J. A., Eron, J. J., Hoy, J. F., Telenti, A., Benson, C. A., Burger, D. M., Cahn, P., Gallant, J. E., Glesby, M. J., Reiss, P., Saag, M. S., Thomas, D. L., Jacobsen, D. M., Volberding, P. A., & International Antiviral Society-USA Panel (2014). Antiretroviral treatment of adult HIV infection: 2014 recommendations of the International Antiviral Society-USA Panel. *JAMA*, 312(4), 410–425.
<https://doi.org/10.1001/jama.2014.8722>
 19. Gutiérrez, F., Fernández-González, M., Ledesma, C., Losada-Echeberría, M., Barrajon-Catalán, E., García-Abellán, J., De Stefano, D., López, L., Bello-Pérez, M., Padilla, S., & Masiá, M. (2025). Virological History Predicts Non-sustained Viral Suppression With Long-Acting Cabotegravir and Rilpivirine Therapy, Independent of Pharmacokinetic Parameters. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 80(4), 842–853. <https://doi.org/10.1093/cid/ciae475>
 20. Hartana, C. A., & Yu, X. G. (2021). Immunological effector mechanisms in HIV-1 elite controllers. *Current opinion in HIV and AIDS*, 16(5), 243–248.
<https://doi.org/10.1097/COH.0000000000000693>
 21. Hernandez-Vargas, E. A., & Middleton, R. H. (2013). Modeling the three stages in HIV infection. *Journal of theoretical biology*, 320, 33–40.
<https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2012.11.028>
 22. Ho, Y. C., Shan, L., Hosmane, N. N., Wang, J., Laskey, S. B., Rosenbloom, D. I., Lai, J., Blankson, J. N., Siliciano, J. D., & Siliciano, R. F. (2013). Replication-competent noninduced proviruses in the latent reservoir increase barrier to HIV-1 cure. *Cell*, 155(3), 540–551. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.09.020>
 23. Hodge, D., Back, D. J., Gibbons, S., Khoo, S. H., & Marzolini, C. (2021). Pharmacokinetics and Drug-Drug Interactions of Long-Acting Intramuscular Cabotegravir and Rilpivirine. *Clinical pharmacokinetics*, 60(7), 835–853.
<https://doi.org/10.1007/s40262-021-01005-1>
 24. Imamichi, H., Smith, M., Adelsberger, J. W., Izumi, T., Scrimieri, F., Sherman, B. T., Rehm, C. A., Imamichi, T., Pau, A., Catalfamo, M., Fauci, A. S., & Lane, H. C. (2020). Defective HIV-1 proviruses produce viral proteins. *Proceedings of the National Academy of*

Sciences of the United States of America, 117(7), 3704–3710.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1917876117>

25. Jacobs, J. L., Halvas, E. K., Tosiano, M. A., & Mellors, J. W. (2019). Persistent HIV-1 Viremia on Antiretroviral Therapy: Measurement and Mechanisms. *Frontiers in microbiology*, 10, 2383. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02383>
26. Kirchhoff, F. (2018). HIV Life Cycle: Overview. En T. J. Hope, D. D. Richman y M. Stevenson (Eds.), *Encyclopedia of AIDS* (pp. 722–730). Springer, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7101-5_60
27. Leonard, A., Broussard, J., Wilson, N., & Dawson-Rose, C. (2022). Cabotegravir and rilpivirine: A long-acting injectable antiretroviral treatment for human immunodeficiency virus. *The Journal for Nurse Practitioners*, 18(1), 17-21. <https://doi.org/10.1016/j.nurpra.2021.11.022>
28. Li, S., Moog, C., Zhang, T., & Su, B. (2022). HIV reservoir: antiviral immune responses and immune interventions for curing HIV infection. *Chinese medical journal*, 135(22), 2667–2676. <https://doi.org/10.1097/CM9.0000000000002479>
29. Lorenzo-Redondo, R., Fryer, H. R., Bedford, T., Kim, E. Y., Archer, J., Pond, S. L. K., Chung, Y. S., Penugonda, S., Chipman, J., Fletcher, C. V., Schacker, T. W., Malim, M. H., Rambaut, A., Haase, A. T., McLean, A. R., & Wolinsky, S. M. (2016). Persistent HIV-1 replication maintains the tissue reservoir during therapy. *Nature*, 530(7588), 51–56. <https://doi.org/10.1038/nature16933>
30. Lu, W., Mehraj, V., Vyboh, K., Cao, W., Li, T., & Routy, J. P. (2015). CD4:CD8 ratio as a frontier marker for clinical outcome, immune dysfunction and viral reservoir size in virologically suppressed HIV-positive patients. *Journal of the International AIDS Society*, 18(1), 20052. <https://doi.org/10.7448/IAS.18.1.20052>
31. Magomere, E., Olwal, C. O., Tetteh, B. E., Appeaning, M., Ndung'u, T., Kyei, G. B., & Quashie, P. K. (2025). The Confluence of HIV-1 and HIV-2: Implications for Disease Progression and Insights for Therapy. *International journal of microbiology*, 2025, 3145677. <https://doi.org/10.1155/ijm/3145677>
32. Massanella, M., Ignacio, R. A. B., Lama, J. R., Pagliuzza, A., Dasgupta, S., Alfaro, R., Rios, J., Ganoza, C., Pinto-Santini, D., Gilada, T., Duerr, A., & Chomont, N. (2021). Long-term effects of early antiretroviral initiation on HIV reservoir markers: a longitudinal analysis

- of the MERLIN clinical study. *The Lancet. Microbe*, 2(5), e198–e209. [https://doi.org/10.1016/s2666-5247\(21\)00010-0](https://doi.org/10.1016/s2666-5247(21)00010-0)
33. Mercure, L., Phaneuf, D., & Wainberg, M. A. (1993). Detection of unintegrated human immunodeficiency virus type 1 DNA in persistently infected CD8+ cells. *The Journal of general virology*, 74 (Pt 10), 2077–2083. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-74-10-2077>
 34. Navarrete-Muñoz, M. A., Restrepo, C., Benito, J. M., & Rallón, N. (2020). Elite controllers: A heterogeneous group of HIV-infected patients. *Virulence*, 11(1), 889–897. <https://doi.org/10.1080/21505594.2020.1788887>
 35. Nyaku, A. N., Kelly, S. G., & Taiwo, B. O. (2017). Long-Acting Antiretrovirals: Where Are We now?. *Current HIV/AIDS reports*, 14(2), 63–71. <https://doi.org/10.1007/s11904-017-0353-0>
 36. Ortego, C., Huedo-Medina, T. B., Llorca, J., Sevilla, L., Santos, P., Rodríguez, E., Warren, M. R., & Vejo, J. (2011). Adherence to highly active antiretroviral therapy (HAART): a meta-analysis. *AIDS and behavior*, 15(7), 1381–1396. <https://doi.org/10.1007/s10461-011-9942-x>
 37. Pantry, S. N., & Medveczky, P. G. (2017). Latency, Integration, and Reactivation of Human Herpesvirus-6. *Viruses*, 9(7), 194. <https://doi.org/10.3390/v9070194>
 38. Perng, G. C., & Jones, C. (2010). Towards an understanding of the herpes simplex virus type 1 latency-reactivation cycle. *Interdisciplinary perspectives on infectious diseases*, 2010, 262415. <https://doi.org/10.1155/2010/262415>
 39. Ryscavage, P., Kelly, S., Li, J. Z., Harrigan, P. R., & Taiwo, B. (2014). Significance and clinical management of persistent low-level viremia and very-low-level viremia in HIV-1-infected patients. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 58(7), 3585–3598. <https://doi.org/10.1128/AAC.00076-14>
 40. Sanford M. (2012). Rilpivirine. *Drugs*, 72(4), 525–541. <https://doi.org/10.2165/11208590-000000000-00000>
 41. Sharp, P. M., & Hahn, B. H. (2011). Origins of HIV and the AIDS pandemic. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 1(1), a006841. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006841>
 42. Siliciano, R. F., & Greene, W. C. (2011). HIV latency. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 1(1), a007096. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a007096>

43. Singh, K., Natarajan, V., Dewar, R., Rupert, A., Badralmaa, Y., Zhai, T., Winchester, N., Scrimieri, F., Smith, M., Davis, I., Lallemand, P., Giglietti, A., Hensien, J., Buerkert, T., Goshu, B., Rehm, C. A., Hu, Z., Lane, H. C., & Imamichi, H. (2023). Long-term persistence of transcriptionally active 'defective' HIV-1 proviruses: implications for persistent immune activation during antiretroviral therapy. *AIDS (London, England)*, 37(14), 2119–2130. <https://doi.org/10.1097/QAD.0000000000003667>
44. Spinelli, M. A., Ngure, K., & Gandhi, M. (2024). Preexposure Prophylaxis (PrEP) for HIV. *JAMA*, 332(18), 1574–1575. <https://doi.org/10.1001/jama.2024.16984>
45. Swanson, C. M., & Malim, M. H. (2008). SnapShot: HIV-1 proteins. *Cell*, 133(4), 742–742.e1. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.05.005>
46. Takata, H., Mitchell, J. L., Pacheco, J., Pagliuzza, A., Pinyakorn, S., Buranapraditkun, S., Sacdalan, C., Leyre, L., Nathanson, S., Kakazu, J. C., Intasan, J., Prueksakaew, P., Chomchey, N., Phanuphak, N., de Souza, M., Haddad, E. K., Rolland, M., Tovanabutra, S., Vasan, S., Hsu, D. C., ... RV304/SEARCH013 (2023). An active HIV reservoir during ART is associated with maintenance of HIV-specific CD8⁺ T cell magnitude and short-lived differentiation status. *Cell host & microbe*, 31(9), 1494–1506.e4. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2023.08.012>
47. Tan, Y., Zheng, W., Wu, S., Zhao, D., Feng, Y., Zou, S., Chen, Q., Liu, J., Tang, H., & Liang, K. (2025). Low-level viremia and subsequent virologic failure among people living with HIV: a retrospective cohort study in China. *BMC infectious diseases*, 25(1), 1024. <https://doi.org/10.1186/s12879-025-11395-3>
48. Thiese, M. S., Ronna, B., & Ott, U. (2016). P value interpretations and considerations. *Journal of thoracic disease*, 8(9), E928–E931. <https://doi.org/10.21037/jtd.2016.08.16>
49. Thorley-Lawson D. A. (2015). EBV Persistence--Introducing the Virus. *Current topics in microbiology and immunology*, 390(Pt 1), 151–209. https://doi.org/10.1007/978-3-319-22822-8_8
50. World Health Organization. (2025). *WHO–IAS HIV statistics 2025*. https://cdn.who.int/media/docs/default-source/hq-hiv-hepatitis-and-stis-library/who-ias-hiv-statistics_2025-new.pdf

51. Yeh, Y. J., Yang, K., Razmi, A., & Ho, Y. C. (2021). The Clonal Expansion Dynamics of the HIV-1 Reservoir: Mechanisms of Integration Site-Dependent Proliferation and HIV-1 Persistence. *Viruses*, 13(9), 1858. <https://doi.org/10.3390/v13091858>
52. Yukl, S. A., Kaiser, P., Kim, P., Telwatte, S., Joshi, S. K., Vu, M., Lampiris, H., & Wong, J. K. (2018). HIV latency in isolated patient CD4⁺ T cells may be due to blocks in HIV transcriptional elongation, completion, and splicing. *Science translational medicine*, 10(430), eaap9927. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aap9927>
53. Zhang, H., Liu, J., Zhang, Z., Huo, Y., & Zeng, W. (2025). Risk factors for virologic failure and persistent low-level viremia in people with HIV experiencing low-level viremia: Chongqing ART cohort study, 2019-2023. *Frontiers in medicine*, 12, 1660030. <https://doi.org/10.3389/fmed.2025.1660030>

