

TRABAJO DE FIN DE GRADO

Grado en Farmacia



**RESISTENCIA A LA
INFECCIÓN POR VIH A
TRAVÉS DE LA DELECIÓN
DEL CORRECEPTOR CCR5**

Autor: AINARA PINEDA SÁNCHEZ

Villaviciosa de Odón, (14/06/2022)

RESUMEN

Alrededor de 80 millones de personas se han infectado por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), desde que en 1983 fue descubierto por Luc Montagnier, considerándose una de las pandemias más importantes de la historia y que desgraciadamente no ha terminado. Este virus entra a los linfocitos T CD4+ a través del receptor CD4 y los correceptores CCR5/CXCR4, generando en los pacientes un estado de inmunodepresión progresiva. Hasta el momento, la administración crónica de la terapia antirretroviral (TAR) ha sido la única manera de paliar la infección. Ahora muchas investigaciones se centran en el correceptor CCR5 ya que presenta un papel imprescindible en el proceso de infección y además se han identificado personas resistentes al VIH de manera natural, debido a la presencia de lo que se conoce como la mutación CCR5- Δ 32. Se trata de una mutación poco habitual (presente en el 1% de la población caucásica) y que consiste en la delección de 32 pares de bases del gen CCR5. De esta forma, se impide la expresión de la proteína en la superficie celular y se consigue que el virus no entre en las células. El objetivo es producir esta condición en la población celular de los pacientes VIH-positivos a través de diferentes estrategias como herramientas de edición genética (CRISPR/Cas9, TALEN's, ZFN) o a través de trasplantes de células madre de donantes homocigóticos para CCR5- Δ 32. A pesar de los esfuerzos realizados, solo se ha logrado curar a tres personas: el paciente de Berlín, el paciente de Londres y el reciente caso de la paciente de Nueva York. No obstante, los hallazgos obtenidos impulsan al mundo de la ciencia a seguir investigando para alcanzar la erradicación completa del VIH.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Pandemia de VIH/SIDA.....	1
1.2. Descripción del ciclo vital del VIH	2
1.3. Papel del correceptor CCR5 y CXCR4	4
1.4. Deleción de CCR5 en una parte de la población: resistencia natural a la infección.....	5
1.5. Estrategias de curación	7
2. OBJETIVOS.....	8
3. METODOLOGÍA.....	9
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	11
4.1. Técnicas de interferencia del gen CCR5.....	11
4.1.1. Nucleasa de dedos de zinc (ZFN).....	11
4.1.2. Repeticiones palindrómicas cortas agrupadas regularmente interespaciadas (CRISPR/Cas9).....	14
4.2. Trasplante de células madre de médula ósea de donantes CCR5	16
4.3. Trasplante de células madre de médula ósea de donantes CCR5-Δ32: caso clínico de Timothy Brown y Adam Castillejo	17
4.4. Trasplante de células de cordón umbilical de donante CCR5-Δ32: caso clínico de la primera mujer curada de VIH	20
5. Conclusiones	21
6. Bibliografía.....	24

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Pandemia de VIH/SIDA

El virus de la inmunodeficiencia humana, conocido como VIH, es capaz de generar una inmunodepresión progresiva en los seres humanos, pudiendo producir el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (Sida) y en consecuencia ser letal si no se aplican medidas terapéuticas (Cordeiro et al., 2008).

Este virus, responsable de generar lo que se conoce como pandemia del VIH/Sida, no fue descubierto hasta 1983 por un científico francés, Luc Montagnier. Pese a que hoy en día, se tiene el conocimiento de que el primer caso de Sida en el mundo data en 1959 en la República Democrática del Congo, 1981 es el año en el que se considera que comienza la pandemia. En este momento, solo se sabía que había un gran número de personas infectadas que padecían de síntomas diversos como manchas rosáceas en la piel, neumonías provocadas por *Pneumocystis jirovecii* o Sarcoma de Kaposi (Gargantilla et al., 2020). Más tarde se observó que muchos de los pacientes compartían dos características principales: la homosexualidad y la inmunosupresión, específicamente un descenso abrupto en sangre de linfocitos T CD4+.

La evolución de los casos no era favorable, muchos de ellos acababan falleciendo. En 1985 ya se disponía de la técnica ELISA para detectar el virus y también en 1986 del primer tratamiento antirretroviral (TAR) efectivo, la zidovudina (Gargantilla et al., 2020). Pese a estos hallazgos, el Programa de Sida de las Naciones Unidas (ONUSIDA), estima que hubo más de 14.000 casos diarios en 1999, siendo 53 millones de personas el número de casos desde el comienzo de la pandemia y 19 millones de muertes (Casabona et al., 2001).

Son cifras verdaderamente desoladoras que desgraciadamente dos décadas después siguen siendo elevadas. Al terminar 2020, había un total de 37,7 millones de personas infectadas en el mundo, habiéndose contagiado 1,5 millones solo en ese año. En el cierre de 2021, cerca de 28 millones tenían acceso al TAR. Gracias al desarrollo científico que ha habido, las nuevas infecciones por el VIH han disminuido en un 52% con respecto 1997 y el número de muertes en un 47% en comparación al pico de 2004 (ONUSIDA).

Estos datos son esperanzadores y muestran el resultado de todos los avances realizados hasta la fecha, especialmente en cuanto al descubrimiento de las particularidades del virus que hacen que sea tan difícil solventar la infección y al TAR u otros tipos de tratamientos aplicados.

1.2. Descripción del ciclo vital del VIH

Para comprender adecuadamente los objetivos del trabajo, es esencial primero conocer aspectos básicos del VIH como es su estructura, su ciclo vital y el papel que juegan algunos elementos del virus.

El ciclo biológico del VIH se podría dividir en dos partes, una fase temprana que incluye la entrada en la célula e integración en el genoma celular y una fase tardía de transcripción del genoma viral y formación de la nueva progenie (Alcamí et al., 2001).

De esta forma, el virus entra a las células a través de la unión de la proteína gp120 a los dominios D1 y D2 de un receptor específico, la molécula CD4, que se encuentra principalmente en linfocitos T colaboradores. Debido a esta unión, ocurren cambios conformacionales que provocan la exposición del dominio V3 de la gp120 que interacciona con los correceptores CCR5 y/o CXCR4, provocándose entonces la exhibición del N-terminal de la gp41 (Figura 1). Esta proteína lo que genera es la fusión directa de la membrana celular y la viral, permitiendo que el virus penetre en el interior de la célula.

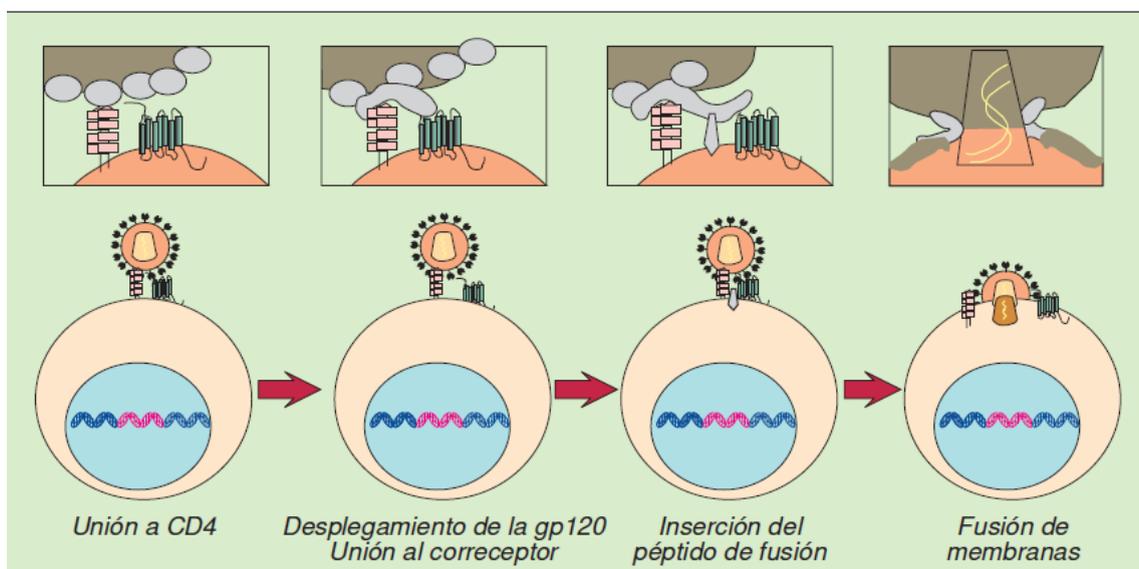


Figura 1. Fases de la entrada del VIH a la célula (Alcamí et al., 2001)

La cápside se desestructura y la enzima retrotranscriptasa queda liberada y activada para realizar la transcripción reversa en el complejo de preintegración (complejo ribonucleoproteico que se encuentra en el citoplasma de la célula), y posteriormente transportarlo al núcleo celular. En este proceso las dos cadenas de RNA se convierten en una doble cadena lineal de DNA que se transporta al núcleo de la célula ya infectada (Alcamí et al., 2001).

A continuación, el DNA del VIH se integra al azar en el genoma celular por la acción de la integrasa. Esta enzima lo que hace es eliminar dos pares de bases en el extremo 3' de cada cadena exponiéndose un dinucleótido citosina-adenina (C-A), muy habitual en todos los retrovirus (Santana et al., 2003). Asimismo, el extremo 5' del DNA se corta por transesterificación para poder unir ambos extremos (3' del DNA viral con el 5' del DNA celular).

Una vez integrado, hay que tener en cuenta que la infección por VIH puede seguir diferentes caminos: mantenerse de forma latente, seguir replicando de forma controlada o por el contrario de forma excesiva hasta producir daño citopático a la célula (Alcamí et al., 2001). Dependiendo del estado en el que se encuentre la célula infectada, se seguirá un camino u otro. Por lo que, si se encuentra en reposo, se mantendrá en latencia viral sin realizar replicación mientras que en el estado de activación comenzaría lo que se ha descrito anteriormente como fase tardía.

El genoma viral se encuentra cercado por repeticiones terminales largas (LTRs), teniendo en el LTRs 3' un sitio de poliadenilación y en el LTRs 5' un promotor (Santana et al., 2003). La RNA-polimerasa II celular comienza a transcribir el genoma requiriendo también la acción de la proteína reguladora Tat, y generando un transcrito primario que puede desempeñar dos funciones: actuar como RNA genómico o ser procesado para formar un único RNA mensajero (RNAm) que más tarde sufrirá un procesamiento para crear transcritos de distintos tamaños y la posterior traducción de cada uno para codificar proteínas (Figura 2). La regulación de estos procesos es indispensable, y es realizada por Rev.

Al estar sintetizadas ya las proteínas, comienza el ensamblaje con el fin de generar nuevos viriones. Vif y Vpu participan en la maduración postraduccional junto con la proteasa viral que tiene también un papel clave ya que procesa los precursores Gag y Gag-Pol en

las proteínas de la nucleocápside, la retrotranscriptasa y la proteasa viral. La maduración de los precursores de gp120 y gp41 la realiza una proteasa celular (Alcamí et al., 2001).

Estas partículas en formación son todavía no infecciosas, tiene que ocurrir la gemación (Budding), es decir, la expulsión de los viriones al medio extracelular para terminar de madurar y convertirse en virus ya infecciosos. Este paso se encuentra regulado por Vpu (Alcamí J., 2008).

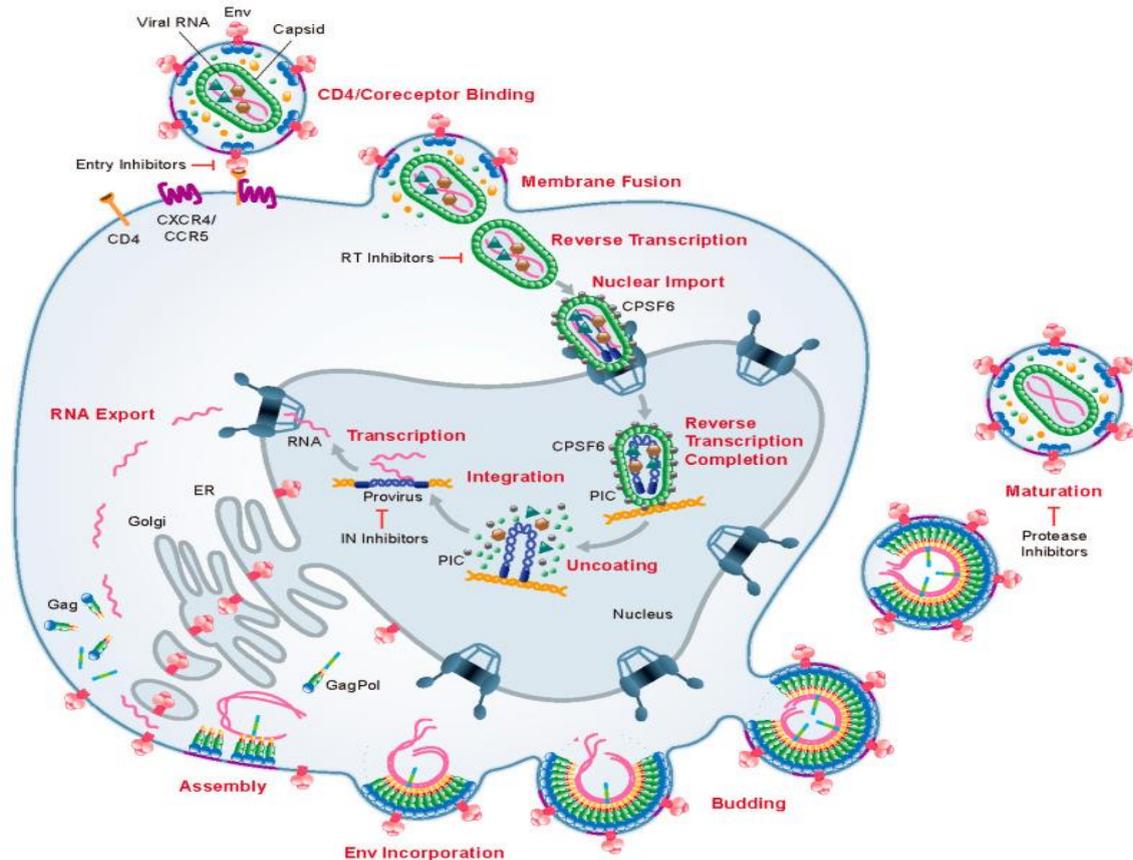


Figura 2. Esquema del ciclo de vida del VIH (Kleinpeter et al., 2020).

1.3. Papel del correceptor CCR5 y CXCR4

Como se ha mencionado con anterioridad, a parte del receptor específico CD4 se necesitan una serie de correceptores, CCR5 y CXCR4, fundamentales también para la infección. Especialmente se mencionará la implicación de CCR5 ya que es el correceptor que se ha usado para las estrategias de curación del VIH.

Ambos son receptores de quimioquinas de la familia de receptores acoplados a proteína G, por ello, contienen un dominio C-terminal intracitoplasmático y otro N-terminal

extracelular con siete regiones transmembranales. El VIH se une a este dominio N-terminal del CCR5, en cambio, los ligandos propios de este correceptor se unen a regiones superpuestas tratando de competir con el virus para poder llevar a cabo la unión.

CCR5 se localiza en las balsas lipídicas de la membrana plasmática en la superficie de algunas células como linfocitos T CD4+. Su expresión, que se regula por la correlación inversa con CCL5/RANTES (uno de los ligandos preferente), varía a lo largo del tiempo de la infección siendo mayoritaria en la primera etapa y estabilizándose durante al menos la fase asintomática (De Silva et al., 2004). Además de su función quimiotáctica, presenta capacidad para realizar la coactivación celular puesto que promueve que se expresen marcadores de activación e induce la proliferación y división celular.

De este modo, CCR5 presenta características suficientes para ser considerado una molécula clave en la infección por VIH ya que participa tanto en la entrada del virus como en el proceso de activación de la propia célula infectada. No obstante, el valor de este correceptor se encuentra también en la posibilidad que existe de modificarlo por la presencia de polimorfismos genéticos naturales o a través de estrategias que se han desarrollado con el fin de evitar su expresión y así reducir la propagación del virus.

1.4. Deleción de CCR5 en una parte de la población: resistencia natural a la infección.

En 1996 se descubrió una mutación del gen CCR5 que genera la ausencia de la expresión de la proteína correspondiente en la superficie de la célula. Esto se debe a la deleción de 32 pares de bases (pb) de la región codificante del gen y se estableció como la variante alélica CCR5- Δ 32 (De Silva et al., 2004).

El gen CCR5 se encuentra en el cromosoma humano 3p21.31 (OMIM) y es considerado altamente polimórfico. Al eliminarse 32 nucleótidos (Figura 3), durante el proceso de traducción, el codon de stop aparece más temprano y desencadena la formación de un péptido truncado que no tiene ni los últimos tres dominios transmembrana ni los bucles extracelulares e intracelulares típicos de la molécula CCR5 (De Silva et al., 2004). A razón de esto, la proteína mutada es incapaz de llegar a la superficie celular y permanece en el citoplasma, concretamente en el retículo endoplasmático de la célula.

Este aspecto genera mucho interés ya que lleva a preguntarse por qué las frecuencias alélicas de CCR5- Δ 32 varían entre las poblaciones. Existe discrepancia de opinión entre los diferentes autores en cuanto al tiempo que hace que surgió la primera delección, considerando que ocurrió en un rango de hace aproximadamente 700-1400 años. Sin embargo, sí coinciden en que la distribución de frecuencias puede estar influenciada por un proceso de selección natural. Muchos autores creen que este proceso en Europa se encuentra relacionado con la presencia de grandes epidemias como la peste y la viruela en aquellos años. Establecen que la presencia de este alelo es un factor de protección frente a ambas enfermedades, fundamentalmente frente a la viruela (De Silva et al., 2004). Asimismo, al afectar a personas jóvenes y al presentar similitud con respecto a la etiología del VIH, se considera esta enfermedad como un medio para forzar la selección natural de la mutación del gen CCR5. Además, la tendencia norte-sur de las frecuencias en Europa creen que se debe a que se generó en el norte (donde se alcanzan los niveles más altos) y después se extendió hacia el sur a causa de los desplazamientos vikingos en los siglos VIII-X.

Hay que resaltar que presentar esta delección proporciona ventajas como la mencionada antes, pero además resulta primordial en el caso de parejas serodiscordantes visto que una de las formas principales de transmisión es por vía sexual. Al ser serodiscordantes, es decir, un miembro es VIH positivo y otro VIH negativo, si la persona sana es CCR5wt/ Δ 32 o CCR5 Δ 32/ Δ 32 se puede decir que la susceptibilidad a infectarse es menor.

1.5. Estrategias de curación

Otro de los puntos relacionados con el VIH en el que se ha avanzado mucho, es en el tratamiento y curación de la infección. Tratar el VIH es necesario para evitar la evolución a Sida y por tanto conseguir que la persona viva adecuadamente, además de impedir con ello también; la transmisión del virus. Esto es lo que se denomina tratamiento funcional, ya que se disminuye la replicación viral a niveles indetectables y se obtiene un recuento adecuado de linfocitos T CD4+ (Rodríguez-Muñoz et al., 2019). Se logra a través del uso del TAR, que incluye 4 clases de fármacos dirigidos a diferentes puntos del ciclo vital del VIH, existiendo: (Alcamí J., 2008)

- Inhibidores de la retrotranscriptasa (análogos o no a nucleósidos)

- Inhibidores de proteasa
- Inhibidores de integrasa
- Inhibidores de la entrada

Lo más común es la combinación de dos inhibidores de la transcriptasa inversa análogos a nucleósidos y un tercer agente de clase diferente. Se deben de usar de por vida, dado que, si no se realiza la terapia de esta forma, se reactivará el desarrollo de la infección y volverá a ser el virus el que controle el sistema inmune.

Además, hay que tener en cuenta que el TAR no actúa sobre los reservorios de VIH latente, lo que hace que junto con la elevada adherencia que hay que tener, esta terapia sea efectiva pero incompleta.

Por otro lado, están las terapias centradas en la erradicación del virus, es decir, en eliminar de forma completa todos los virus del VIH que se encuentren en la persona infectada (Rodríguez-Muñoz et al., 2019). Están menos desarrolladas puesto que es un campo de investigación muy difícil debido a características propias de la infección por VIH como son la existencia de los reservorios, la aparición de multitud de resistencias; y la capacidad para evadir el sistema inmune.

Como consecuencia se sigue investigando para conseguir otras estrategias de curación, como la que se describirá en este trabajo, que puede considerarse tanto terapia funcional como de erradicación y se encuentra fundamentada en la importancia del correceptor CCR5.

2. OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo es analizar las diferentes estrategias de curación del VIH que se consiguen a través de la delección de CCR5.

En cuanto a los objetivos específicos, son los siguientes:

- a) Determinar en qué consiste la delección del gen CCR5.
- b) Investigar a nivel bibliográfico, diferentes técnicas realizadas para lograr la delección del gen CCR5.
- c) Describir casos clínicos de trasplante de médula ósea/cordón umbilical de donantes CCR5wt o CCR5 Δ 32.

3. METODOLOGÍA

Para la elaboración de este trabajo, se han realizado las búsquedas bibliográficas fundamentalmente en la base de datos de PubMed y a través del buscador de Google Scholar. En cada herramienta se ha usado una estrategia diferente ya que se puede dividir la búsqueda en dos apartados:

1. Información general sobre el VIH
2. La delección del correceptor CCR5 y las estrategias por las que se consigue

Para el primero de ellos se ha usado el motor de búsqueda Google Scholar, tratando de buscar artículos generales a cerca del VIH. Para ello se seleccionaron una serie de descriptores, a los que siempre se unía el término "vih", por ser el tema principal del trabajo. Los operadores booleanos "AND" y "OR" se utilizaron para ajustar los diferentes términos y generar la fórmula de búsqueda:

Descriptor y qualifier		Búsqueda formulada	Artículos encontrados	Artículos seleccionados
Retrovirus	+ vih	retrovirus AND vih	7600	1
Historia		(historia AND pandemia) AND (vih)	15000	2
Pandemia				
Ciclo biológico		ciclo biológico AND vih	11000	3
Cura funcional		cura funcional AND vih	11100	1

Tabla 1. Metodología aplicada en Google Scholar (fuente propia)

Todas estas búsquedas se acotaron por fecha de publicación y por idioma, seleccionando desde el año 2000 hasta 2022 y artículos disponibles en español. Además, se estableció la búsqueda por orden de relevancia y se seleccionaron aquellos artículos que tenían disponible el acceso completo al texto.

En cuanto a las búsquedas en PubMed, cabe destacar que en algunos casos se conocían datos de interés (como el autor principal) y en otros se realizaba la búsqueda como se ha mencionado antes, a través de descriptores combinados por el uso de operadores booleanos y restringiendo con distintos filtros:

Búsqueda formulada	Filtros aplicados	Artículos encontrados	Artículos seleccionados
resistance allele ccr5 AND hiv	Free full text Results by year: 2000-2022	74	3
(hiv[MeSH Terms]) AND (Tebas, Pablo[Author])	Free full text Publication date: 10 years	38	2
gene editing technologies ADN hiv	Free full text Results by year: 2012-2022	113	4
cycle maturation AND hiv	Free full text Article type: Review Publication date: 10 years	31	1
((stem cell transplantation- [MeSH Terms]) AND (hiv)) AND (Henrich TJ[Author])	Free full text	6	2
(Hütter G[Author]) AND (stem cell transplantation[MeSH Terms])	Free full text	14	1
Timothy Ray Brown	Free full text	1	1
CCR5 AND hematopoietic stem cell transplantation AND hiv	Free full text Publication date: 10 years	57	2

Tabla 2. Metodología aplicada en PubMed (fuente propia)

Cabe destacar que a través de la bibliografía de ciertos artículos como los del autor Pablo Tebas, se accedió a publicaciones de interés, referenciando tres de ellas en el presente trabajo.

Debido a la actualidad del tema, no se han encontrado publicaciones oficiales relacionadas con el caso de la primera mujer curada de VIH. Por ello, se ha accedido a la información consultando directamente los materiales disponibles de la Conferencia de Retrovirus e Infecciones Oportunistas realizada en febrero de este mismo año.

Asimismo, se han u otros recursos como la base de datos OMIM-Herencia mendeliana en línea en el hombre, buscando directamente el gen de interés CCR5 y seleccionando la primera entrada, que es la correspondiente al receptor 5 de quimioquinas con motivo CC. Mencionar igualmente el uso de ONUSIDA, la web oficial de las Naciones Unidas sobre el VIH/Sida, para consultar datos actuales y fiables del estado de la epidemia del SIDA.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Técnicas de interferencia del gen CCR5

4.1.1. Nucleasa de dedos de zinc (ZFN)

Pese a la administración de terapia antirretroviral, las células CD4+ de un paciente infectado por VIH, se encuentran limitadas funcionalmente. Por este motivo, se están tratando de desarrollar técnicas con las que editar el gen CCR5 con el fin de evitar la expresión de la proteína correspondiente en superficie y así lograr las ventajas que se han mencionado con anterioridad.

Las estrategias basadas en el reconocimiento de ADN-proteína, como son las nucleasas de dedos de zinc (ZFN) y nucleasas de tipo activador de transcripción (TALEN's), han sido las más utilizadas hasta el momento. El autor Pablo Tebas, junto con más compañeros, publicó en 2021 un estudio sobre el aumento de inmunidad que provoca la infusión de células CD4+ editadas con ZFN (Tebas et al., 2021), asimismo en 2014 realizó uno muy similar del que se toma como referencia el grupo control (Tebas et al., 2014).

Las ZFN, es una herramienta de ingeniería genética formada por motivos proteicos llamados dedos de zinc. Cada uno consta de alrededor de 30 aminoácidos que se pliegan en configuración $\beta\beta\alpha$ conservada y tienen capacidad para reconocer trinucleótidos de una secuencia determinada de ADN (por la hélice α). Se fusionan a una enzima de restricción

de la bacteria *Flavobacterium okeanokites*, la nucleasa Folk (Figura 5) modificada para solo unir el dominio de escisión que corta el ADN y de esta forma producir la delección de una parte del genoma, en este caso el gen CCR5. Más tarde se repara el ADN por unión de extremos no homólogos (Carrol D., 2011).



Figura 5. Representación esquemática de la técnica ZFN (Manjunath et al. 2013)

Para ello se seleccionaron a 14 personas infectadas de manera crónica por VIH y se dividieron en tres grupos (Tabla 3). Habían suprimido el TAR y recibieron tratamientos previos como ciclofosfamida (CTX) con el fin de provocar linfodepresión.

GRUPO	1	2	3
N.º participantes	3	6	5
Genotipo de los participantes	CCR5 wt/wt	CCR5 wt/wt	CCR5 wt/ Δ32
Tratamiento aplicado	Sin CTX + CD4+ autólogos editados	CTX=1g/m ² (dosis baja) + CD4+ autólogos editados	CTX=1,5g/m ² (dosis alta) + CD4+ autólogos editados

Tabla 3. Resumen de las características del estudio publicado por Tebas et al., 2021

El proceso por el cual se modificaron las células autólogas consistió en purificar los linfocitos T CD4+ y someterlos a electroporación para introducir los ARNm de ZFN (dirigidos a CCR5). Seguidamente se incubaron las células a 30°C, se activaron y se cultivaron ex vivo en condiciones de perfusión para finalmente lavarlas y ser crioconservadas.

A cada uno se le realizó una única infusión de 10.000 millones de células, a excepción de uno de los participantes del grupo 2 que recibió 6.600 millones por un problema durante el proceso de expansión de los linfocitos T CD4+ (Tebas et al., 2021). Este hecho no ha tenido relevancia ninguna con respecto a los resultados obtenidos.

Durante las 16 semanas de suspensión del tratamiento, en comparación con el grupo de control, todos los participantes tuvieron el rebote de viremia de VIH (carga viral > 200 copias/mL) más tarde, alcanzando el máximo en la octava semana. La disminución de células CD4+ durante este periodo fue mucho menor que la que se producía antes de aplicar el tratamiento. A su vez, el número específico de células editadas, es decir, de aquellas que no tienen expresión de CCR5, disminuyó también a lo largo de todo el tiempo de estudio (Tebas et al., 2021). Además, se observó que esta terapia no generaba un cambio en la cantidad de reservorio viral, el principal obstáculo de las estrategias de curación del VIH. Por estas últimas razones, se recomendó a los participantes a retomar el tratamiento antirretroviral una vez acabaran el tramo de suspensión del tratamiento en estudio.

El estudio expone resultados reveladores puesto que solo con el aumento del periodo de tiempo que tarda el VIH en volver a replicar, se indica que la delección del CCR5 provoca una mejora en la inmunidad de los pacientes. Esto se debe a que la infusión en sangre de células carentes del gen CCR5, genera dificultad al virus para propagarse ya que, en estas, no es capaz de entrar ni tampoco de replicar. Se produce entonces la disminución de la carga viral, únicamente de manera temporal pues se encuentra inversamente relacionada con el número de células CD4+ editadas presentes en sangre. A medida que pasa el tiempo de estudio, se reduce la cantidad de células genéticamente modificadas en circulación sanguínea, posiblemente a causa de muerte celular o transferencia a órganos, lo que conlleva al VIH a tener a su alcance más células aptas para poder replicar y por tanto conseguir un aumento de la carga viral.

El hecho de que cuantas más células editadas hay en sangre menos carga viral se detecta, respalda el pensamiento de que la interferencia del gen y la consecuente ausencia de la expresión del correceptor CCR5 en la superficie celular, provoca un retraso en la evolución de la enfermedad en personas ya infectadas, e incluso puede generar resistencia completa a la infección en personas que todavía no la padecen. No obstante, es probable que fuera necesario modificar al menos el 99.9% de las células CCR5+ para que se pudiera conseguir un efecto significativo sobre el tamaño del reservorio viral (Davenport et al., 2019.)

4.1.2. Repeticiones palindrómicas cortas agrupadas regularmente interespaciadas (CRISPR/Cas9)

En 2013 empezó a desarrollarse otra técnica con un fundamento diferente a las mencionadas anteriormente. Actualmente existe un auge en el uso de CRISPR/Cas9, concretamente el sistema II de *Streptococcus pyogenes* para realizar ediciones genéticas. De manera simplificada, su funcionamiento se basa en dos componentes (Figura 6): un ARN guía (ARNg), y la proteína Cas9 (Corrigan-Curay et al., 2014). Esta, es una endonucleasa con capacidad de escindir dobles cadenas de ADN, siempre y cuando exista un motivo adyacente protoespaciador (PAM). Por su parte, el ARNg se genera por la hibridación de ARN CRISPR complementario a la diana (ARNcr) y un ARN transactivador (ARNtracr). Contiene en el extremo 5' una región de reconocimiento y unión a la diana, mientras que en el 3' se encuentra el sitio por el que se une a Cas9. Así, la secuencia de ARNg se ensambla por complementariedad de bases al ADN, guiando a la proteína Cas9 al lugar donde ejecuta su función.

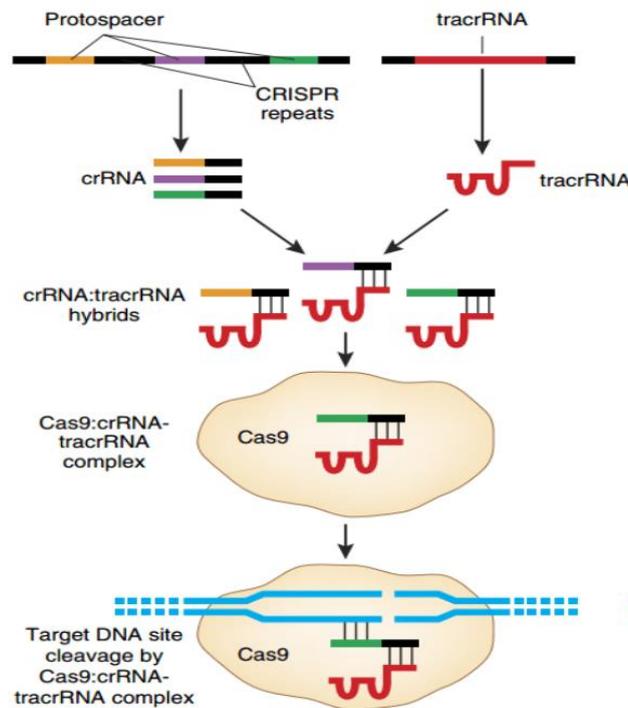


Figura 6. Representación de la técnica CRISPR/Cas9 (dos Anjos et al., 2020.)

Una de las ventajas que muestra esta técnica sobre las demás, es la capacidad de poder programar el sitio de corte con un cambio en el ARNg de forma mucho más fácil y sencilla que en ZFN o TALEN, haciendo posible la edición de cualquier molécula de ADN.

También es muy importante destacar que esta estrategia genera menos efectos fuera del objetivo marcado. Una vez que se une y escinde por ejemplo el gen CCR5, se degrada el sistema, por lo que se minimiza la posibilidad de que CRISPR/Cas9 ejecute su acción en otra parte del genoma (Allen et al., 2018). Como consecuencia, en los últimos años se han realizado numerosos estudios encaminados a encontrar una cura frente al VIH haciendo uso de este método, no solo para eliminar el gen del correceptor CCR5 sino también de CXCR4. En los artículos referenciados, se usan líneas celulares diferentes, pero se alcanzan resultados muy similares (Liu et al., 2017; Yu et al., 2018).

En el primero de ellos, se valoraron los niveles de CXCR4 y CCR5 tres días después de la transfección del vector lentiviral (que contenía el sistema CRISPR/Cas9 dirigido a ambas moléculas) a las células T_{ZM}-bl. Por citometría de flujo se obtuvo aproximadamente un 23% de eficacia de desactivación de los genes mencionados. Además, se estudió la capacidad de protección frente al VIH que ofrece esta modificación a las células, consiguiendo T_{ZM}-bl resistentes a la infección puesto que no se observó luminiscencia en los estudios de luciferasa (Liu et al., 2017). Se hizo lo mismo, pero en células T Jurkat, células T CD4⁺ primarias y en el segundo estudio en células de la línea GHOST (Yu et al., 2018), obteniendo en todas ellas las mismas conclusiones. Asimismo, en ninguna de las líneas celulares hubo diferencia en el nivel de apoptosis en relación con las células no modificadas y tampoco se demostraron efectos fuera del objetivo, confirmando la especificidad del sistema CRISPR/Cas9 creado (Liu et al., 2017).

Todos los estudios mencionados se han realizado ex vivo (Tebas et al., 2021) o in vitro (Liu et al., 2017; Yu et al., 2018), teniendo por tanto limitación en el número de células que pueden modificarse (Figura 7). Sin embargo, sirven como antecedente para aquellas investigaciones centradas en llevar a cabo estos hallazgos directamente en humanos.

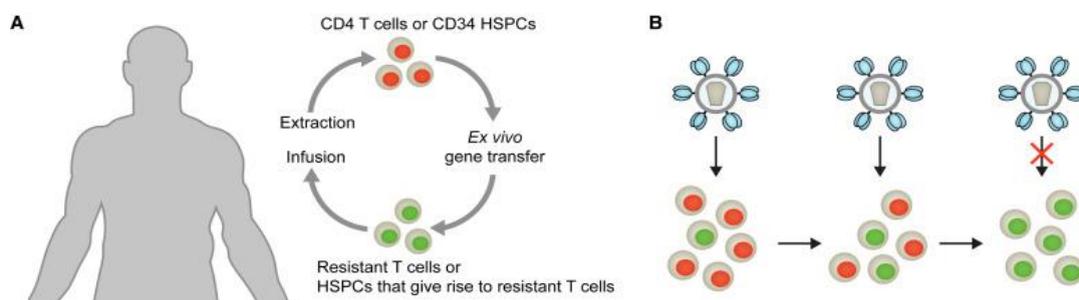


Figura 7. (A) Extracción, modificación y reinfusión de células modificadas genéticamente. (B) Selección positiva de células modificadas genéticamente (verde) y replicación del VIH en células susceptibles (rojo) (Falkenhagen et al., 2018.)

4.2. Trasplante de células madre de médula ósea de donantes CCR5

Otra de las posibilidades dentro del amplio abanico de opciones que se están probando a lo largo de estos últimos años en la busca de una cura frente al VIH, es la realización de trasplantes de células madre de médula ósea de distintos tipos de donantes a pacientes seropositivos.

En 2013 se publicó un artículo sobre el caso de los pacientes de Boston, dos hombres infectados de VIH (en tratamiento con TAR) y con cáncer, en concreto el paciente 1 presentaba linfoma de Hodking y el paciente 2 linfoma de no Hodking. Ambos fueron sometidos a un trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas (TCMH) y previamente tratados con diferentes inmunosupresores o antineoplásicos con el fin de evitar la enfermedad de injerto contra el huésped (EICH), es decir, que las células del donante rechacen al receptor (Henrich et al., 2013).

Lo que se pretende al realizar un TCMH es lograr la eliminación total de las células del paciente y remplazarlas así con las del donante, científicamente se conoce con el término de quimerismo completo. En este caso, el donante sano era de tipo salvaje para el gen CCR5, lo que llevaría a los pacientes a remplazar sus células por otras no infectadas, pero no resistentes al virus (Henrich et al., 2013). Se consiguió un 73% de quimerismo linfocitario a los 167 días con persistencia total hasta los 1266 días después del trasplante en el paciente 1, y 92% el día 206 en el paciente 2 hasta el final de los 562 días que duró el estudio.

Como consecuencia se redujo significativamente el recuento total de células T CD4+ al inicio, obteniendo después un aumento en el caso 1 y estabilidad en el caso 2. También pasaron a tener cargas virales indetectables en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) e incluso ausencia de expresión del antígeno p24 en las CD4+ que se purificaron en el análisis ejecutado al final del ensayo.

Estos acontecimientos sugieren entonces que los reservorios de VIH de los pacientes se remplazaron en gran medida por células sanas protegidas de la infección ya que ambos siguieron con el tratamiento antirretroviral durante todo el proceso y posteriormente.

Tras pasar casi cinco y tres años desde el trasplante (de forma respectiva al paciente 1 y 2), se decidió interrumpir la terapia antirretroviral (ATI) en los dos varones y realizar un estrecho seguimiento. Se detectó ARN plasmático y ADN viral en células, a las 12 y 32

semanas después de la omisión de tratamiento respectivamente (Henrich et al., 2014). Todos los síntomas clínicos se resolvieron al volver a iniciar el TAR, pero se observó en el primer paciente, el desarrollo de nuevas resistencias frente a antivirales como efavirenz y varios inhibidores de proteasa.

Al haber hecho el trasplante de células madre CCR5wt/wt, las células trasplantadas no son resistentes a la infección, lo que genera la posibilidad de que los reservorios no eliminados se activaran en algún momento y se transmitiera la infección al resto de células. Los autores (Henrich et al., 2013) sugieren que el remplazo de PMBC no es igual que el que sucede en tejidos, pudiendo quedar en estos compartimentos reservorios del VIH.

A pesar de los esfuerzos realizados, no se logró erradicar la infección en estos pacientes, que como se muestra en la figura 8, antes del TCMH eran heterocigotos para la mutación CCR5-Δ32 y después del quimerismo total de células del donante, resultan ser homocigotos de tipo salvaje.

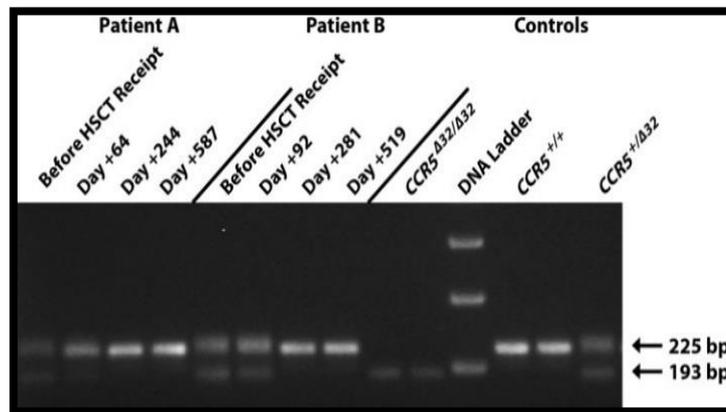


Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa de ADN de PMBC de un segmento de 225 pb del gen CCR5 antes y después de TCMH (Henrich et al., 2013).

4.3. Trasplante de células madre de médula ósea de donantes CCR5-Δ32: caso clínico de Timothy Brown y Adam Castillejo

Como se ha podido aclarar anteriormente, los alotrasplantes de células madre de donantes compatibles, es una opción terapéutica factible para aquellos pacientes que padecen tanto de VIH como de tumores hematológicos.

Así fue el caso de Timothy Brown (Figura 9), un hombre tratado con TAR desde hacía cuatro años y diagnosticado de leucemia mieloide aguda (LMA) (Hütter et al., 2009). Tras el paso de unos meses después de acabar dos ciclos de quimioterapia, recayó y se le planteó la posibilidad de realizar un trasplante de células madre de un donante histocompatible, que presentaba homocigosis para el alelo CCR5- Δ 32.



Figura 9. Fotografía de Timothy Ray Brown (CROI WEBCASTS)

El paciente se sometió a los procesos de acondicionamiento previos al trasplante y al régimen profiláctico para hacer frente a la enfermedad de injerto contra el huésped. Toda la preparación resultó ser más fuerte en comparación con la de los pacientes de Boston. Consistió en administrar tres inmunosupresores e irradiar de manera completa el cuerpo de Timothy Brown. Hasta el día anterior al TCMH, realizado el 6 de febrero de 2007 (Brown T.R., 2015) se le administró la terapia antirretroviral, suspendiéndola durante el resto del proceso. Se logró obtener quimerismo completo a los 61 días. No obstante, a los 332 días disminuyó alrededor de un 15% y el paciente volvió a ser diagnosticado de LMA. Por ello, se le realizó otra vez una irradiación corporal total para poder recibir un segundo trasplante proveniente del mismo donante en 2008 (Brown T.R., 2015), consiguiendo que el tumor estuviera en remisión incluso a los veinte meses del procedimiento (Hütter et al., 2009).

El proceso resultó ser exitoso en cuanto a la infección del VIH se refiere, puesto que, en los 20 meses de seguimiento posterior, no se detectó carga viral en sangre periférica, médula ósea o mucosa rectal.

Al pasar a tener células de tipo homocigotas para CCR5- Δ 32 (Figura 10), le confiere al individuo una resistencia casi total al VIH, evitando que los pocos reservorios virales que pudieran quedar en tejidos susceptibles de presentarlos (como la mucosa intestinal)

generaran de nuevo una infección (Hütter et al., 2009). Además, se realizaron pruebas para comprobar la ausencia de variantes trópicas para CXCR4 y descartar también así, la opción de una nueva infección por VIH con tropismo X4.



Figura 10. Genotipado de alelos CCR5 por electroforesis en gel de agarosa (Hütter et al., 2009).

La recuperación después del segundo alotrasplante no le resultó nada fácil al paciente. El efecto acumulativo de las quimioterapias y del régimen de acondicionamiento, generaron al que se conocía por aquel momento como el paciente de Berlín, una leucoencefalopatía que le hacía tener delirios, problemas para caminar y quedarse casi ciego. Mientras él se recuperaba, el mundo científico comentaba su caso al ser la primera persona curada de VIH. En 2010 pasó del anonimato a la fama dándose a conocer por su propio nombre, Timothy Ray Brown. Su objetivo principal, como declara en el artículo mencionado (Brown T.R., 2015), era dedicar su vida a apoyar a la investigación para encontrar una o varias curas frente al VIH.

Desgraciadamente después de más de 10 años curado de VIH, falleció a causa de la leucemia mieloide aguda en 2020. Cabe destacar todo el esfuerzo que dedicó a formar la Fundación Timothy Ray Brown junto con el Instituto Mundial del SIDA para seguir promoviendo la investigación de la cura del VIH.

También se debe mencionar a Adam Castillejo, conocido como el paciente de Londres. Se sometió igualmente en 2016 a un trasplante de células madre de médula ósea de un donante que no expresaba el correceptor CCR5. Se le realizó el 4 de marzo de 2020 la última prueba para comprobar la carga viral en plasma, manteniéndose indetectable después de treinta meses desde el TCMH (Gupta et al., 2020). Una vez más, la obtención

de estos resultados tan prometedores se debe principalmente a la reducción de los reservorios de VIH a través del proceso de acondicionamiento (previo al trasplante) y al propio trasplante, que también produce la disminución de la susceptibilidad del virus a infectar células con tropismo CCR5, ya que se utilizaron células madre con la mutación CCR5 $\Delta 32/\Delta 32$.

4.4. Trasplante de células de cordón umbilical de donante CCR5- $\Delta 32$: caso clínico de la primera mujer curada de VIH

Como consecuencia de la alta compatibilidad que tiene que existir entre donante y receptor para hacer un trasplante alogénico de células madre de médula ósea, StemCyte International Cord Blood Center aisló y conservó una muestra de sangre de células CCR5 $\Delta 32/\Delta 32$ de cordón umbilical, con el fin de utilizarlas en alotrasplantes de pacientes VIH-positivos. (Petz et al., 2015). Esta opción se plantea debido a que la compatibilidad necesaria para un trasplante de células madre de cordón umbilical, desciende en gran medida en comparación con la que se exige para realizar un trasplante procedente de médula ósea.

El Dr. Rafael F. Duarte, haciendo uso de las células criopreservadas de cordón umbilical, realizó en Barcelona un alotrasplante a un paciente con infección por VIH y linfoma difuso de células B grandes (Duarte et al., 2015). Este trasplante mezclaba células haploidénticas (de compatibilidad media) y las células mencionadas de cordón umbilical.

Después de 52 días se tuvo que hacer otra infusión de sangre de cordón umbilical puesto que el quimerismo obtenido hasta el momento de este tipo de células, resultaba ser menor al 5%. Tras once días del segundo procedimiento, se alcanzó el 100% y todas las células generadas por parte del paciente eran CCR5 $\Delta 32/\Delta 32$, es decir, resistentes al virus de la inmunodeficiencia humana (Petz et al., 2015). Sin embargo, el paciente murió debido a la progresión agresiva del linfoma, no pudiendo continuar con la evaluación y/o confirmación de otra posible persona curada de VIH.

Este no ha sido el único caso en el cual se han usado células de cordón umbilical para trasplantarlas a pacientes infectados por el virus. Con resultados tremendamente exitosos, el 15 de febrero de 2022 Yvonne Bryson anunció en la Conferencia anual de Retrovirus e Infecciones Oportunistas, el caso de la primera mujer curada de VIH. Padecía VIH desde 2013 y se la diagnosticó leucemia mieloide aguda en 2017. Al ser de raza

afroamericana, no se encontraron donantes compatibles de médula ósea que portaran la mutación homocigótica de ya que, como se ha descrito anteriormente, la frecuencia alélica de la mutación fuera de la población caucásica es muy baja (CROI WEBCASTS). Por ello, "la paciente de Nueva York", se sometió en agosto de 2017 a un trasplante de células de sangre de cordón umbilical con doble mutación CCR5-Δ32.

A su vez se le hizo una infusión de células madre de médula ósea haploidénticas por dos motivos:

1. El volumen necesario de células de sangre de cordón umbilical para hacer un trasplante a un adulto es mayor que el que existe almacenado
2. Este tipo de células tardan más tiempo en injertarse en el receptor para producir quimerismo completo

De esta manera, se consigue reforzar el sistema inmunitario y evitar por ejemplo infecciones oportunistas. Hay que tener en cuenta que previamente a estos procedimientos, se sometió a quimioterapia y radioterapia de cuerpo entero. Asimismo, hay que considerar que ha sido la única que no ha tenido ningún síntoma de EICH de todos los pacientes trasplantados mencionados durante el trabajo

En este caso la paciente dejó el tratamiento antirretroviral tres años después del trasplante. A día de hoy, la leucemia mieloide aguda continúa en remisión y no se ha detectado ningún rebote viral. Las pruebas realizadas declaran que presenta anticuerpos negativos contra el virus y resistencia in vitro. Por ende, se puede decir satisfactoriamente que, tras casi cinco años desde el trasplante, "la paciente de Nueva York" es valorada como la tercera persona en la cual se ha conseguido erradicar el VIH (CROI WEBCASTS; AIDS MAP).

5. Conclusiones

El VIH ha resultado ser un reto para los investigadores debido a sus características virológicas. Numerosas investigaciones se han llevado a cabo con el objetivo de encontrar una cura frente al VIH.

- a) Todas las descritas en este trabajo, se fundamentan en eliminar la expresión de una única molécula, el correceptor CCR5. Se ha demostrado que, independientemente de la estrategia que se utilice, siempre que se consiga eliminar a CCR5 de la superficie

celular, se alcanza un estado de remisión de la infección, que puede incluso terminar erradicándose por completo.

- b) La terapia antirretroviral ha sido el primer paso de todos los que se han dado en estas últimas dos décadas en cuanto a tratamientos se refiere. Pese a salvar multitud de vidas, se tiene que mantener de forma crónica para que resulte eficaz. Por ello, se realizan estudios usando diferentes técnicas para lograr la cura del VIH, pudiendo clasificarlos en dos grandes grupos: los basados en terapia génica y los basados en trasplantes de células madre.

Con la terapia genética ocurre algo similar a lo mencionado con el TAR. Se han obtenido resultados prometedores, pero no suficientes puesto que los pacientes volvían a tener rebotes de replicación del virus. La principal desventaja de este tipo de estrategias ya sea TALEN, ZFN o CRISPR/Cas9, es que únicamente se han realizado ex vivo, modificando el gen mencionado en un número limitado de células periféricas. Esto conlleva que las demás células se encuentran accesibles para el VIH y mantengan la replicación normal ya que los pacientes omiten la terapia antirretroviral durante la ejecución de estos procesos.

Por ahora, los estudios de terapia génica que se han elaborado son pruebas concepto con resultados esperanzadores para dirigir las investigaciones a conseguir que estas estrategias se conviertan en una cura eficaz frente al VIH. Una de las opciones, es producir in vivo la mutación CCR5 Δ 32/ Δ 32 en las células de la médula ósea para así, generar ya el resto de las células con esta modificación y por lo tanto que sean desde un inicio resistentes a la infección por VIH.

También hay que recordar que prácticamente todos los estudios se centran en bloquear a CCR5, generando entonces resistencia a las cepas con tropismo R5. No obstante, la mitad de las personas que padecen la infección presentan tropismo mixto, es decir, tanto cepas dirigidas a R5 como a X4. Existe una preocupación por los reservorios latentes que puedan quedar en el cuerpo tras la ejecución de estos procesos, al poder presentar tropismo X4, reactivarse y producir de nuevo la infección con una cepa para la que las células no presentan resistencia. Para resolver esta cuestión, se deben de realizar un mayor número de investigaciones como las efectuadas por los autores

Zhepeng Liu y Songlin Yu, para profundizar en cómo interrumpir ambos genes y generar esta modificación en toda la población celular del individuo.

El otro grupo de estrategias probadas, son los trasplantes de células madre. En los últimos años han salido a la luz los casos de diferentes pacientes oncohematológicos y seropositivos que son tratados con trasplantes. Algunos como los conocidos "pacientes de Boston", no acabaron siendo exitosos y sin embargo otros como "el paciente de Berlín", "el paciente de Londres" o la reciente "paciente de Nueva York", resultar ser las primeras personas curadas de VIH.

- c) La diferencia fundamental entre los distintos casos clínicos es el tipo de células madre que se usaron para hacer el trasplante. Teniendo en cuenta que se pretende obtener resistencia celular al virus, como la que presentan las personas con la mutación natural $CCR5\Delta32/\Delta32$, realizar el trasplante con células de tipo salvaje para CCR5 no resulta beneficioso para alcanzar este requerimiento. De modo que los pacientes de Boston tuvieron que reanudar el TAR y desgraciadamente no se remedió la infección.

Por el contrario, los otros tres pacientes mencionados anteriormente, fueron tratados con células de un donante homocigótico para la variante alélica $CCR5-\Delta32$. Consiguieron el quimerismo completo y, por consiguiente, curarse de VIH. Entre ellos se distinguen por el tipo de trasplante de células madre que recibieron. Timothy Brown y Adam Castillejo fueron trasplantados por la médula ósea, teniendo mucha suerte, ya que, la compatibilidad exigida para este tipo de procedimientos es muy elevada. Además, sumar el factor de que el donante también tiene que presentar homocigosis para la mutación, que solo se encuentra entorno al 1% de la población caucásica.

Visto que se necesita una compatibilidad menos estricta al recibir sangre de cordón umbilical, la paciente de Nueva York y los próximos pacientes que puedan ser tratados de esta forma, presentarán menos dificultades para encontrar el donante idóneo.

Es importante saber que los únicos candidatos establecidos para recibir trasplantes de células madre son los pacientes oncohematológicos que padezcan a su vez de VIH. Este hecho acota en gran medida la posibilidad de tratar y curar a los 38 millones de personas que presentan la infección en todo el mundo.

En un futuro se podrían mezclar los dos grandes tipos de estrategias explicadas, editando los genes CCR5 y/o CXCR4 de las células injertadas y así simplificar el proceso de búsqueda de donantes al simplemente requerir que sean compatibles con el receptor, pero no presentar la mutación CCR5 Δ 32/ Δ 32.

En conclusión, el VIH es un virus que ha generado grandes consecuencias poblacionales, llegando a infectar a 79,3 millones de personas desde el inicio. Tal y como se ha ido exponiendo a lo largo del presente trabajo, los avances científicos realizados han disminuido considerablemente el número de muertes y han mejorado la calidad de vida de los pacientes VIH-positivos, llegando incluso a curar a alguno de ellos. Son progresos esperanzadores que permiten al mundo de la ciencia pensar con ambición para alcanzar entre otras cosas, la forma de tratar a todos los afectados por el virus y la vacuna que termine con su transmisión, consiguiendo entonces la erradicación completa del VIH.

6. Bibliografía

- Alcamí et al. Inmunopatología del SIDA. Medicina Integral. 2001; vol. 37 (10): 428-442.
- Alcamí J. Ciclo replicativo del VIH. Dianas terapéuticas consolidadas y dianas potenciales. Enfermedades infecciosas y microbiología clínica. 2008; vol. 26: 3-10
- Allen et al. Gene Editing of HIV-1 Co-receptors to Prevent and/or Cure Virus Infection. Frontiers in Microbiology. 2018; vol. 9: 2940. doi: 10.3389/fmicb.2018.02940
- Brown TR. I am the Berlin patient: a personal reflection. AIDS Research and Human Retroviruses. 2015; vol. 31 (1): 2-3. doi:10.1089/AID.2014.0224
- Bryson Y et al. HIV-1 REMISSION WITH CCR5 Δ 32 Δ 32 HAPLO-CORD TRANSPLANT IN A US WOMAN: IMPAACT P1107 (ABSTRACT 65). CROI webcasts [Internet]. [citado 4 junio 2022]. Disponible en: <http://www.croiwebcasts.org/s/2022croi/Oral-05>
- Carroll D. Genome Engineering with Zinc-Finger Nucleases. Genetics. 2011; vol. 188 (4): 773-782. doi: 10.1534/genetics.111.131433
- Casabona et al. Evolución de la epidemia de la infección por el VIH en el siglo XXI. Medicina Integral. 2001; vol. 37 (10): 419-427.
- Codeiro et al. Retrovirus y VIH. Temas de Bacteriología y Virología Médica. 2008; 449-476.

- Corrigan-Curay et al. Genome Editing Technologies: Defining a Path to Clinic: Genomic Editing: Establishing Preclinical Toxicology Standards, Bethesda, Maryland. 10 June 2014. *Molecular Therapy*. 2015; vol. 23 (5): 796–806. doi: 10.1038/mt.2015.54
- CROI 2022: New York woman free of HIV 14 months after stem cell transplant, Wednesday 16 February 2022. *aidsmap* [Internet]. [citado 4 junio 2022]. Disponible en: <https://www.aidsmap.com/bulletin/conference-news/croi-2022/16-february-2022>
- Davenport et al. Functional cure of HIV: the scale of the challenge. *Nature Reviews Immunology*. 2019; vol. 19: 45–54. doi: 10.1038/s41577-018-0085-4
- De Silva et al. HIV and the CCR5-Δ32 resistance allele. *FEMS microbiology letters*. 2004; vol. 241 (1): 1-12. doi: 10.1016/j.femsle.2004.09.040
- dos Anjos et al. CRISPR/Cas9 fighting human immunodeficiency virus HIV-1 subtype in CD4+ T lymphocytes: a literature review. *Brazilian Journal of health Review*. 2020; vol. 3 (5): 12771-12784. doi: 10.34119/bjhrv3n5-114
- Duarte et al. CCR5 Δ32 homozygous cord blood allogeneic transplantation in a patient with HIV: a case report. *Lancet HIV*. 2015; vol. 2 (6): 236-242. doi: 10.1016/S2352-3018(15)00083-1
- Falkenhagen et al. Genetic Strategies for HIV Treatment and Prevention. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*. 2018; vol. 13: 514–33. doi: 10.1016/j.omtn.2018.09.018
- Gargantilla et al. Breve historia de las pandemias. *Tiempo de Paz*. 2020; vol. 37: 10-12.
- Gupta et al. Evidence for HIV-1 cure after CCR5Δ32/Δ32 allogeneic haemopoietic stem-cell transplantation 30 months post analytical treatment interruption: a case report. *The Lancet HIV*. 2020; vol. 7 (5) :340-347. doi: 10.1016/S2352-3018(20)30069-2
- Henrich et al. Editor's choice: Long-Term Reduction in Peripheral Blood HIV Type 1 Reservoirs Following Reduced-Intensity Conditioning Allogeneic Stem Cell Transplantation. *The Journal of Infectious Diseases*. 2013; 207 (11): 1694-1702. doi: 10.1093/infdis/jit086
- Henrich, Hanhauser et al. Antiretroviral-Free HIV-1 Remission and Viral Rebound Following Allogeneic Stem Cell Transplantation: A Report of Two Cases. *Annals of internal medicine*. 2014; vol. 161 (5): 319-327. doi: 10.7326/M14-1027
- Herencia mendeliana en línea en el hombre, OMIM. Universidad Johns Hopkins, Baltimore, Md. Número MIM: {601373}: {11/8/1996}. URL de la World Wide Web: <https://omim.org/>

- Hoja informativa-Últimas estadísticas sobre el estado de la epidemia de sida. ONUSIDA [Internet]. [citado 4 junio 2022]. Disponible en: <https://www.unaids.org/es/resources/fact-sheet>
- Hütter et al. Long-Term Control of HIV by CCR5 Delta32/Delta32 Stem-Cell Transplantation. *The New England Journal of Medicine*. 2009; vol. 360: 692-698. doi: 10.1056/NEJMoa0802905
- Kleinpeter et al. HIV-1 maturation: Lessons learned from inhibitors. *Viruses*. 2020; vol. 12 (940). doi: 10.3390/v12090940
- Liu et al. Genome editing of the HIV co-receptors CCR5 and CXCR4 by CRISPR-Cas9 protects CD4+ T cells from HIV-1 infection. *Cell and Bioscience*. 2017; vol. 7 (1): 1–15. doi: 10.1186/s13578-017-0174-2
- Lopalco et al. CCR5: From Natural Resistance to a New Anti-HIV Strategy. *Viruses*. 2010; vol. 2; 574-600. doi:10.3390/v2020574
- Manjunath et al. Newer Gene Editing Technologies toward HIV Gene Therapy. *Viruses*. 2013; vol. 5 (11): 2748-2766. doi: 10.3390/v5112748
- Petz et al. Progress toward curing HIV infection with hematopoietic cell transplantation. *Stem Cells and Cloning: Advances and Applications*. 2015; vol. 8: 109-116. doi: 10.2147/SCCAA.S56050
- Psomas et al. Antagonistes du récepteur CCR5 et infection par le VIH-1: bases et conséquences de cette approche thérapeutique. *Antibiotiques (Paris)*. 2010; vol. 12 (1): 27-41. doi: 10.1016/j.antib.2010.01.006
- Rodríguez-Muñoz et al. Estrategias de curación de la infección por VIH. *Enfermedades Infecciosas Microbiología Clínica*. 2019; vol. 37 (4): 265-273. doi: 10.1016/j.eimc.2018.01.007
- Santana et al. Biología celular y molecular del Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH). *Revista de Diagnóstico Biológico*. 2003; vol. 52 (1): 07-18.
- Tebas et al. CCR5-edited CD4+ T cells augment HIV-specific immunity to enable post-rebound control of HIV replication. *The Journal of clinical investigation*. 2021; vol. 131 (7). doi:10.1172/JCI144486
- Tebas et al. Gene editing of CCR5 in autologous CD4 T cells of persons infected with HIV. *The New England journal of medicine*. 2014; vol.370 (10): 901-910. doi: 10.1056/NEJMoa1300662

- Yu et al. Simultaneous Knockout of CXCR4 and CCR5 Genes in CD4+ T Cells via CRISPR/Cas9 Confers Resistance to Both X4-and R5-Tropic Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection. *Human Gene Therapy*. 2018; vol. 29 (1): 51-67. doi: 10.1089/hum.2017.032