

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER
MÁSTER UNIVERSITARIO EN INVESTIGACIÓN Y DIAGNÓSTICO DE
ENFERMEDADES TROPICALES

2020-2021

**LA COMPLEJIDAD DEL RESERVORIO
DE LATENCIA VIRAL DEL VIH.
IMPLICACIONES EN LAS ESTRATEGIAS PARA LA CURA
FUNCIONAL Y ERRADICACIÓN DEL VIRUS.**

Autora:

Thaiane Machado

Graduada en Medicina por la ULL

Tutor:

Dr. Agustín Valenzuela Fernández

Profesor Facultad de Ciencias de la Salud, Sección de Medicina de la ULL
Experto en Virología, Inmunología y Farmacología.

ÍNDICE

1. Índice de tablas y figuras	3
2. Resumen	4
3. Abstract	4
4. Material y Métodos	5
5. Justificación	6
6. Introducción	6
7. Hipótesis	14
8. Objetivos	14
9. Resultados y Discusión	15
9.1. Reservorio de latencia viral	15
9.2. Factores condicionantes del reservorio viral	16
9.3. Estrategias de erradicación del reservorio viral	17
10. Conclusiones	21
11. Perspectivas	22
12. Bibliografía	23

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Figura 1. Estimación de mujeres y niñas infectadas por VIH a nivel global y por país en el año 2020.....	7
Figura 2. Relación filogenética entre los lentivirus en primates humanos y no humanos.....	7
Figura 3. Representación de la organización del genoma del VIH-1.....	8
Figura 4. Representación del ciclo viral del VIH-1.....	9
Figura 5. Diagrama representando la topología de CCR5 e identificando las posiciones ocupadas por los residuos ausentes (en rojo) en los polimorfismos delta 24 y delta 32.....	10
Figura 6. Vías de transmisión de la infección por VIH.....	10
Figura 7. Esquema de las etapas de Fiebig.....	11
Figura 8. Esquema de las distintas fases de la infección por VIH desde la primoinfección.....	12
Tabla 1. Fármacos antirretrovirales disponibles en España.....	13
Figura 9. Reservorios de latencia viral del VIH.....	15
Figura 10. Representación del mecanismo de acción del Lenacapavir.....	17
Figura 11. Estrategia “Shock and Kill” para la eliminación de células infectadas de forma latente por el VIH.....	18
Figura 12. Representación de la evolución de la CVP con TAR sin dCA y con dCA.....	18
Figura 13. Representación de las distintas posibles dianas para la acción de CRISPR-Cas9 en el ciclo viral.....	19
Figura 14. Representación de la edición génica con los correceptores CCR5 o CXCR4 como diana.....	20

RESUMEN

La infección por VIH (virus de inmunodeficiencia humana) supone una emergencia de salud pública mundial, sobre todo en países en vías de desarrollo. Que el VIH sea un retrovirus implica que tras el ingreso del virus en las células diana se produzca la retrotranscripción del ARN viral a ADN proviral, que se integra al genoma celular, donde persiste indefinidamente, conformando los reservorios de latencia viral. La TAR (terapia antirretroviral) inhibe la replicación del VIH y controla la CVP (carga viral plasmática), pero NO es curativa debido, principalmente, a la existencia de reservorios de latencia viral. El reservorio de latencia es complejo a nivel anatómico, celular y molecular. A nivel anatómico podemos localizar reservorios de latencia en distintos órganos y tejidos, no sólo tejidos con abundantes estructuras linfoides; a nivel celular el VIH permanece en todos los tipos de células CD4+ y a nivel molecular, el provirus integrado en el genoma celular puede variar desde transcripcionalmente latente hasta activo y capaz de producir viriones o activo con replicación defectuosa, no llegando a producir viriones, pero sí proteínas virales inmunogénicas. Además, la complejidad del reservorio se encuentra condicionada por factores como el subtipo y el tropismo viral, el sexo biológico, la edad, la presencia de inflamación crónica y el control excepcional de la infección. Actualmente se plantean varias estrategias con el fin de alcanzar la erradicación de la infección, incluso a nivel de los reservorios, lo que supondría la curación de la infección. Dos ejemplos son el diseño de nuevos fármacos dirigidos contra nuevas dianas terapéuticas, actuando sobre la formación del virión, con mejor farmacodinámica y unido al inicio temprano de la TAR, y, aparte, la edición génica para generar precursores hematopoyéticos con el polimorfismo CCR5Δ32 o CCR5Δ24, otorgando resistencia frente al VIH R5 trópico.

ABSTRACT

The HIV (human immunodeficiency virus) infection is a global public health emergency, especially in developing countries. The fact that HIV is a retrovirus implies that after the entry of the virus into the target cells, the viral RNA is retrotranscribed to proviral DNA, which is integrated into the cellular genome, where it persists indefinitely, forming the latent HIV reservoirs. ART (antiretroviral therapy) inhibits HIV replication and controls PVL (plasma viral load), but it is NOT curative, mainly due to the existence of latent reservoirs. The latent reservoir is complex at the anatomical, cellular and molecular levels. Anatomically, the latent reservoirs can be located in different organs and tissues, not only tissues with abundant lymphoid structures; at the cellular level, HIV remains in all types of CD4+ cells, and at the molecular level, the provirus integrated can vary from transcriptionally latent to active and capable of producing virions or active with defective replication, not producing virions, but immunogenic viral proteins. In addition, the complexity of the reservoir is conditioned by factors such as viral subtype and tropism, biological sex, age, the presence of chronic inflammation and exceptional control of infection. Currently, several strategies are proposed to achieve the eradication of the infection, including at the reservoir level, which would mean the cure of the infection. Two examples are the design of new drugs directed against new therapeutic targets, acting on the virion assembly, with better pharmacodynamics and linked to the early start of ART, and, additionally, gene editing to generate hematopoietic precursors with the polymorphism CCR5Δ32 or CCR5Δ24, granting resistance against HIV R5 tropic.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para la elaboración de este trabajo, se realizó una búsqueda bibliográfica en la base de datos PubMed (National Library of Medicine) bajo los términos de búsqueda “HIV”, “HIV RESERVOIR”, “HIV LATENCY”, “HIV ART”; orden por fecha de publicación y con los filtros de publicaciones de los últimos 5-10 años, dependiendo de la información buscada. Se analizaron artículos y revisiones científicas, así como documentos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), ONUSIDA y GeSIDA, además de literatura académica.



ELSEVIER

JUSTIFICACIÓN

La infección por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), agente etiológico del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), sigue siendo un problema de salud pública mundial, acrecentado por el aumento en la morbilidad por eventos NO SIDA entre los pacientes tratados con terapia antirretroviral (TAR). La TAR inhibe la replicación del VIH y controla la carga viral plasmática (CVP), pero no afecta a los reservorios del virus y, por lo tanto, no es curativa. Durante la TAR, el genoma integrado del VIH persiste indefinidamente en las células T CD4+, así como en otros tipos celulares o tejidos santuarios para el virus. Este “Trabajo de Fin de Máster (TFM)” propone analizar los mecanismos que contribuyen a la persistencia del VIH y al fracaso terapéutico para erradicar el virus del organismo, como es la propia proliferación celular inmunitaria. Asimismo, se abordarán las implicaciones que pudiera llegar a tener la biología del reservorio viral sobre la eficacia y el éxito de las actuales estrategias e intervenciones curativas que se están desarrollando y sobre las que recaen las esperanzas de cura funcional o erradicación del VIH.

INTRODUCCIÓN

La infección por VIH y el SIDA suponen uno de los retos de salud pública más importantes de nuestro tiempo (“Blueprint” de la Organización Mundial de la Salud (OMS) en el programa ONUSIDA), sobre todo, en los países en vías de desarrollo. Gracias a los continuos avances en la TAR y al creciente acceso a la misma, se observa un descenso progresivo en la morbilidad y en la transmisión de la infección (1,2,3) (Figura 1).

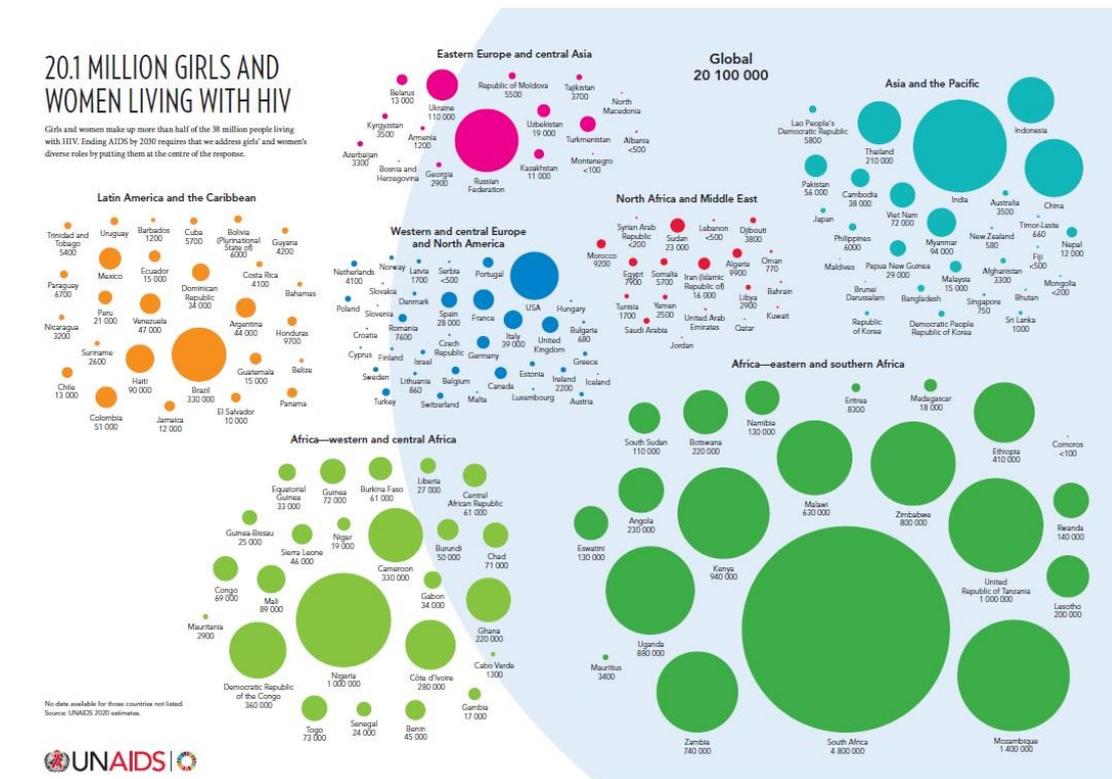


Figura 1. Estimación de mujeres y niñas infectadas por VIH a nivel global y por país en el año 2020. Según los últimos datos proporcionados por ONUSIDA, cerca de 26 millones de personas tenían acceso a la terapia antirretroviral al cierre de junio 2020 y 38 millones se encontraban infectadas, de las cuales 20,1 millones eran mujeres y niñas; 1,7 millones contrajeron la infección y 690.000 fallecieron a causa de enfermedades relacionadas con el SIDA. Se calcula que aproximadamente 75,7 millones de personas contrajeron la infección y 32,7 millones de personas fallecieron a causa de enfermedades relacionadas con el SIDA desde la identificación de la epidemia (1). Fuente: UNAIDS (<https://www.unaids.org/en> ; <https://www.unaids.org/en/resources/infographics/girls-and-women-living-with-HIV>).

El VIH pertenece al grupo VI de la clasificación de Baltimore, clasificándose como virus ARN monocatenario retrotranscrito, pertenece al género Lentivirus (Figura 2), familia *Retroviridae*, subfamilia *Orthoretrovirinae*. Todos los retrovirus se caracterizan por la presencia de la transcriptasa inversa, que cataliza la síntesis de ADN a partir de un molde de ARN, esencial para la integración del genoma viral en el genoma de la célula huésped (4).

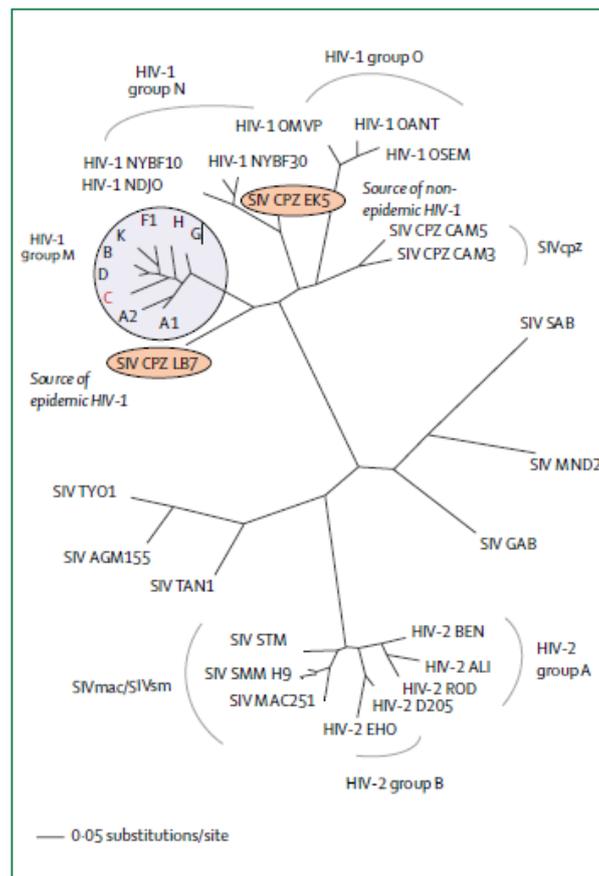


Figura 2. Relación filogenética entre los lentivirus en primates humanos y no humanos. Se han descrito dos tipos principales de VIH, el VIH-1 y el VIH-2. A su vez, el VIH-1 se clasifica en cuatro grupos distintos: M, N, O y P (5). Los virus del grupo M son causantes de la mayoría de las infecciones diagnosticadas y presentan al menos nueve subtipos denominados desde la A hasta la D y desde la F hasta la H, J y K (4,5). Fuente: Simon *et al.* (2006) "HIV/AIDS epidemiology, pathogenesis, prevention, and treatment." *Lancet* 368(9534):489-504. doi:10.1016/S0140-6736(06)69157-5.

Centrándonos en el VIH-1, su genoma (Figura 3) comprende nueve genes que pueden diferenciarse entre genes estructurales, de proteínas reguladoras y de proteínas accesorias (5), además de una proteína antisentido (“AntiSense Peptide”; ASP) (6,7).

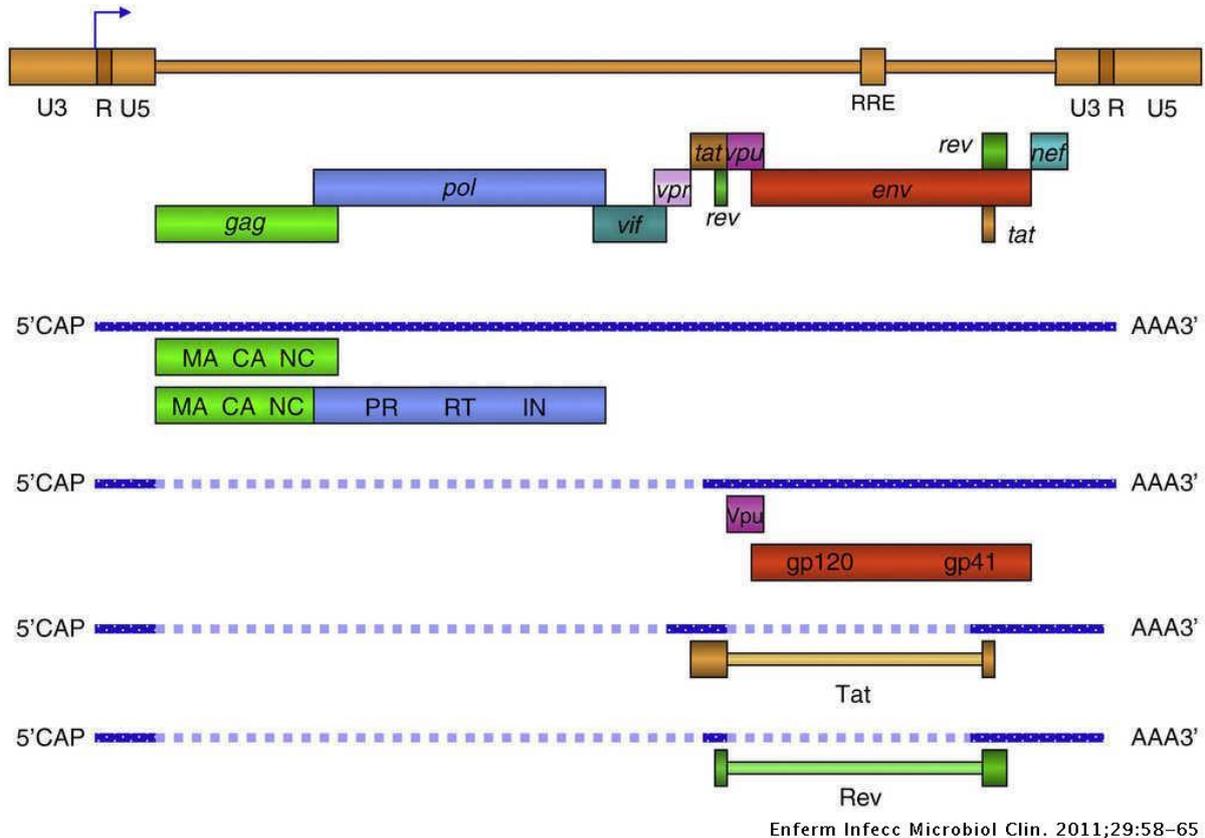


Figura 3. Representación de la organización del genoma del VIH-1. Encontramos tres genes estructurales: *gag* (que codifica principalmente para proteínas de la matriz (MA), cápside (CA) y nucleocápside (NC)), *pol* (que codifica para las enzimas proteasa (PR), transcriptasa inversa (RT), RNasa e integrasa (IN)) y *env* (que codifica para las glucoproteínas de envoltura viral gp41/gp120); dos genes que codifican las proteínas reguladoras: *tat* y *rev* y cuatro genes que codifican las proteínas accesorias: *vpu*, *vpr*, *vif* y *nef* (5). Además, en su forma proviral el VIH posee un marco de lectura (ORF) en la hebra ADN antisentido que codifica para una proteína antisentido (“AntiSense Peptide”; ASP por sus siglas en inglés) (6,7), que podría estar involucrada en la alteración de la función inmunitaria de células dendríticas (8,9) además de interactuar con la estructura genómica de ARN antisentido no codificante (“HIV antisense long noncoding RNA” (HIV lncRNA, por sus siglas en inglés)) cuya función podría consistir en la modulación de la transcripción viral al interactuar con la ADN metiltransferasa 3a (DNMT3a) en el extremo 5’LTR del genoma viral (10,11,12), regulando la latencia del VIH (13). Fuente: Delgado *et al.* (2011) “Virological characteristics of HIV.” *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 29(1):58-65 doi:10.1016/j.eimc.2010.10.001.

El VIH infecta al sistema inmunitario, principalmente a células CD4+, como las T auxiliares (“helper” en inglés, Th), monocitos, macrófagos y células dendríticas. El ingreso del VIH en las células CD4+ (Figura 4) implica la interacción de las glicoproteínas de envoltura viral (mediante la subunidad gp120) con la molécula CD4 y un correceptor, CCR5 o CXCR4, ambos receptores de quimiocinas (14,15,16,17). Esta doble interacción confiere a la unión una mayor estabilidad, permitiendo la fusión de las

membranas viral y celular mediante gp41 (14,17). Los VIH-1 se distinguen entre CCR5 trópicos (R5-trópicos), CXCR4 trópicos (X4-trópicos) y duales (dual-trópicos, R5X4) (18), pudiendo existir verdadero tropismo dual (partículas virales capaces de utilizar indistintamente ambos correceptores) o mezclas compuestas de aislados virales que utilizan exclusivamente el correceptor CCR5 o el CXCR4 (19). En fases iniciales de la infección prevalecen cepas CCR5 y los polimorfismos CCR5 Δ 32 (18,20,21), y CCR5 Δ 24 (22) profieren protección natural frente la infección (Figura 5). Tras la fusión de la membrana celular y la envoltura viral, se libera la nucleocápside viral al citoplasma (23), se produce la retrotranscripción del ARN viral (vRNA) a ADN proviral (vDNA), y la integración del vDNA al genoma celular. La transcripción de los genes virales da origen al ARN viral mensajero (ARNm), formando las proteínas que formarán los viriones inmaduros, y la proteasa viral (PR) es la encargada de producir las proteínas virales que darán origen al virión maduro.

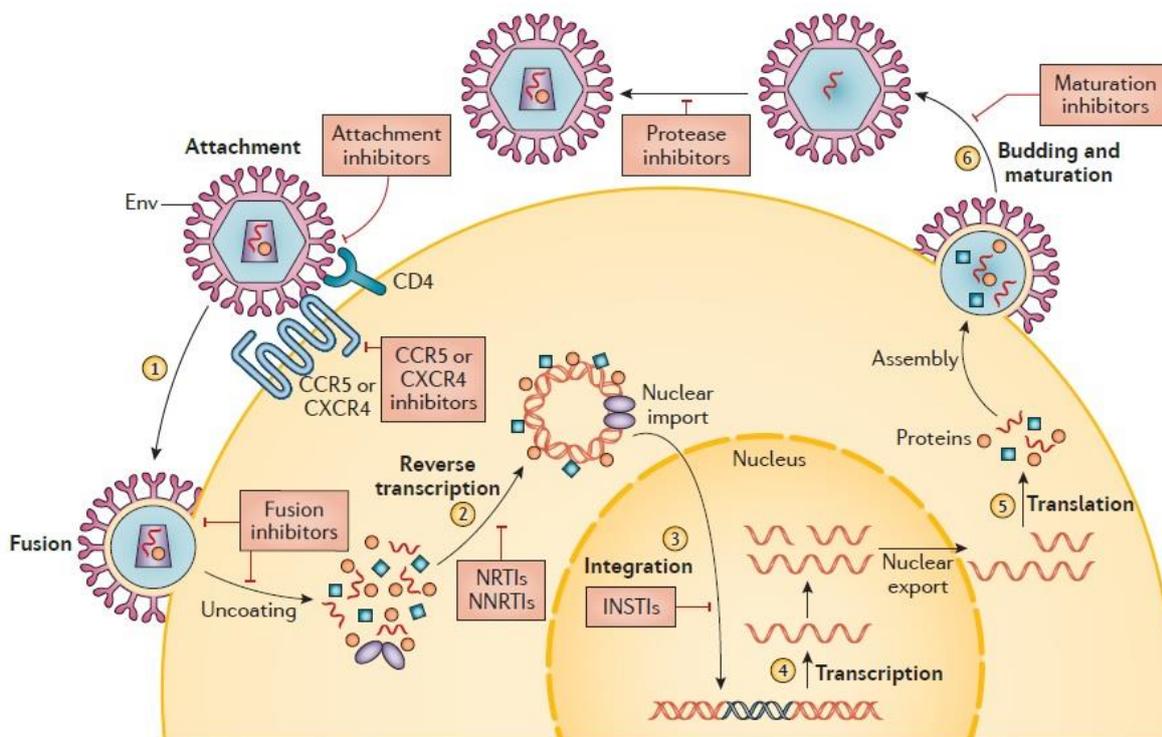


Figura 4. Representación del ciclo viral del VIH-1. El VIH ingresa a la célula gracias a la interacción de los receptores CD4 y CCR5 o CXCR4 con las glicoproteínas de envoltura viral mediante la subunidad gp120, posibilitando un cambio conformacional que expone el dominio N-terminal hidrofóbico de gp41 a la membrana celular, lo que permite la fusión de las membranas viral y celular. Tras la fusión de la membrana celular y la envoltura viral, se libera la nucleocápside viral al citoplasma (23). En el mismo citoplasma o una vez alcanzado el núcleo celular, en el interior de la nucleocápside (core viral) tiene lugar la retrotranscripción del ARN viral (vRNA en inglés) a doble hebra de ADN proviral (vDNA en inglés), con el fin de que se produzca la integración del vDNA al genoma celular. La doble cadena de vDNA recién sintetizada formará el complejo de pre-integración (CPI) junto con la integrasa viral, proteínas de la cápside y otras proteínas celulares (24). El sitio de inserción del vDNA depende de la composición de la cromatina con la ayuda de algunos factores de anclaje celular como LEDGF (“Lens-epithelium derived growth factor”) y CPSF6 (“Cleavage and polyadenylation specificity factor 6”) que se unen a la cápside viral (25, 26). Una vez integrado, la maquinaria enzimática celular transcribe los genes virales para dar origen al ARN viral mensajero (ARNm) que formará las proteínas estructurales

y funcionales. Durante el ensamblaje, el ARN viral (vRNA) y las proteínas estructurales forman los viriones inmaduros que salen a la superficie de la célula y la proteasa viral (PR) es la encargada de producir las proteínas virales que darán origen al virión maduro. Fuente: Deeks. *et al.* (2015) "HIV infection." *Nat Rev Dis Primers* 1, 15035 doi:10.1038/nrdp.2015.35.

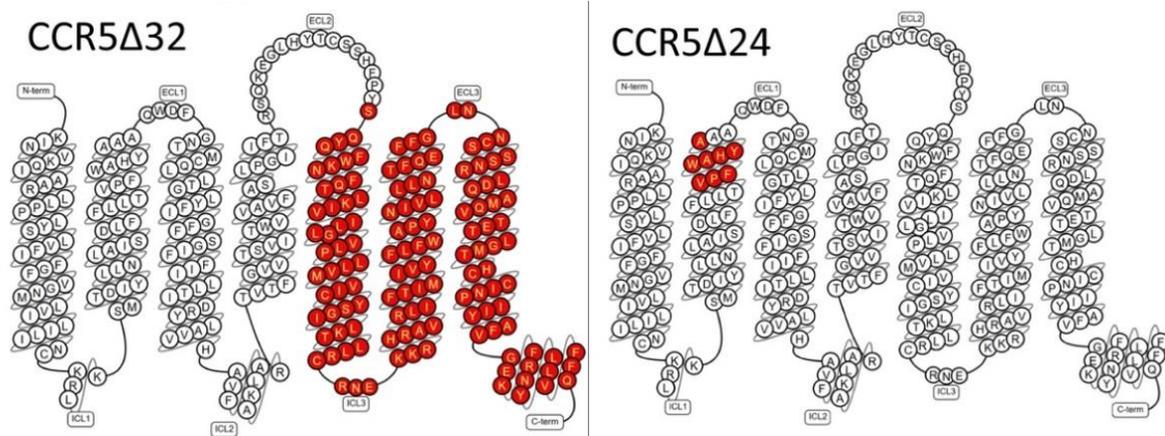


Figura 5. Diagrama representando la topología de CCR5 e identificando las posiciones ocupadas por los residuos ausentes (en rojo) en los polimorfismos delta 24 y delta 32. La mutación/delección homocigota CCR5Δ32 es la más importante descrita, por conferir protección natural frente la infección y evitar la evolución de la infección a la fase SIDA (18,20,21), junto a la delección CCR5Δ24 heterocigota, descrita como protectora en pacientes africanos (22). Fuente: Arendt *et al.* (2019) "Predominance of the heterozygous CCR5 delta-24 deletion in African individuals resistant to HIV infection might be related to a defect in CCR5 addressing at the cell surface." *J Int AIDS Soc.* 22(9), 25384 doi:10.1002/jia2.25384.

Las principales formas de transmisión de la infección (Figura 6) consisten en la transmisión sexual, la transmisión vertical durante el embarazo, el parto y la lactancia, y la transmisión mediante agujas hipodérmicas infectadas y mediante transfusión de productos sanguíneos contaminados.

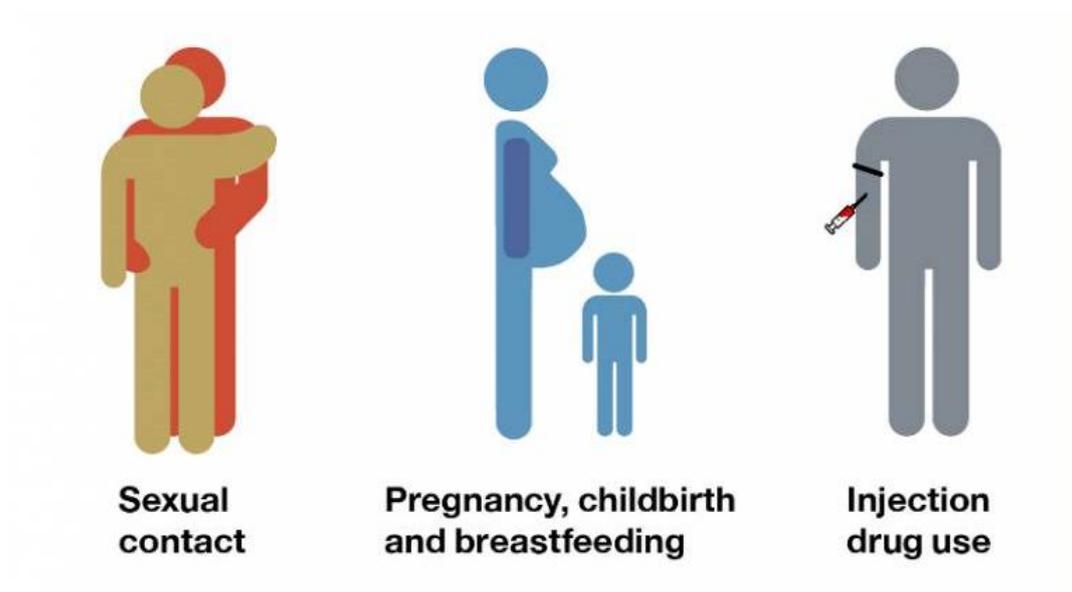


Figura 6. Vías de transmisión de la infección por VIH. La principal vía de transmisión del VIH en el mundo es la sexual, a pesar de ser relativamente ineficaz en ausencia de otros factores amplificadores (27, 28), como la viremia elevada, el coito anal receptivo, el coito durante la menstruación, la ausencia de circuncisión masculina y la presencia de otras ETS (enfermedades de transmisión sexual), especialmente las que producen úlceras genitales, siendo la carga viral el determinante más importante del riesgo de transmisión en las parejas serodiscordantes (29, 30) y la supresión de la carga viral mediante el TAR reduce la transmisión del VIH en un 96% (31, 32). La transmisión vertical (TV) durante el embarazo, el parto o la lactancia constituye una forma muy importante de transmisión principalmente en países en vías de desarrollo (33, 34). Existe una TV residual intraútero en las madres que empiezan el TAR a lo largo de la gestación, siendo las tasas de TV del 0,2% en mujeres que inician TAR preconcepcional y 0,4%, 0,9% y 2,2% según comenzaran en el primer, segundo o tercer trimestre de la gestación, respectivamente. (35, 36, 37). El VIH también puede transmitirse mediante la transfusión de sangre y derivados sanguíneos (sangre entera, plasma fresco congelado, concentrados de eritrocitos, crioprecipitados, factores de coagulación y plaquetas). Por último, la causa principal de transmisión del VIH en Usuarios de Drogas Vía Parenteral es la utilización compartida de agujas y jeringas contaminadas (38, 39). Fuente: Institute of Immunity and Transplantation, UCL (<https://www.ucl.ac.uk/immunity-transplantation/clinical-services/diseases-treatments/chronic-infections/hiv>).

Las distintas etapas de la infección se clasifican en etapas de Fiebig (42) (Figura 7). La primoinfección abarca las primeras 12 semanas, en las que se completa la seroconversión (Figura 8). Durante la fase aguda, se produce una replicación viral masiva en las células CD4+. En fase crónica el desarrollo de una respuesta inmunitaria específica logra una disminución de la carga viral (CV) hasta alcanzar un valor estable, denominado "set point", cuya magnitud determina la progresión a fase SIDA. La fase SIDA se caracteriza por enfermedades oportunistas gracias a la disminución de la cantidad y la calidad de las células CD4+ (40,41). Aunque la respuesta inmunitaria limita la tasa de replicación viral, no alcanza una inmunidad esterilizante, con un impacto negativo en el sistema inmunitario, originando una activación crónica resultando en inflamación inespecífica y translocación bacteriana (38).

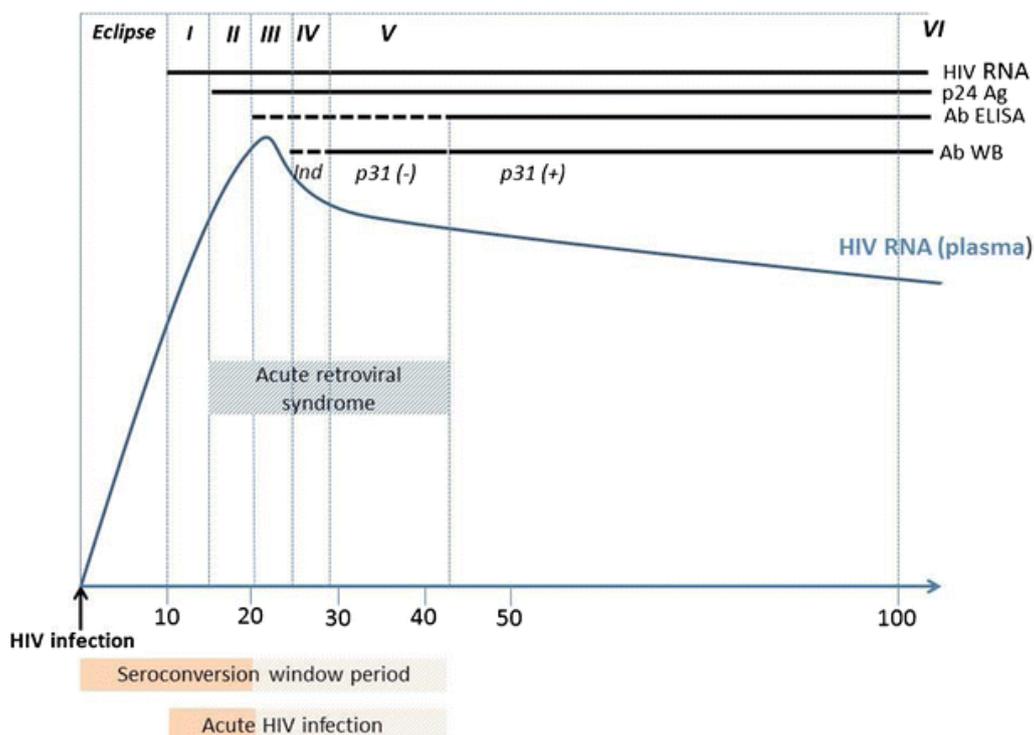


Figura 7. Esquema de las etapas de Fiebig. Las etapas de Fiebig clasifican a las distintas etapas de la infección, empezando en la fase de eclipse (desde el día 0 hasta el 10), pasando posteriormente a Fiebig I (días 10-15), Fiebig II (días 15-20), Fiebig III (días 20-25), Fiebig IV (días 25-30), Fiebig V (días 30-100 aproximadamente) y, por último, Fiebig VI (fase crónica temprana) Fuente: Henn, Fleteau & Gallien (2017) “Primary HIV Infection: Clinical Presentation, Testing, and Treatment.” *Curr Infect Dis* 19, 37 doi:10.1007/s11908-017-0588-3.

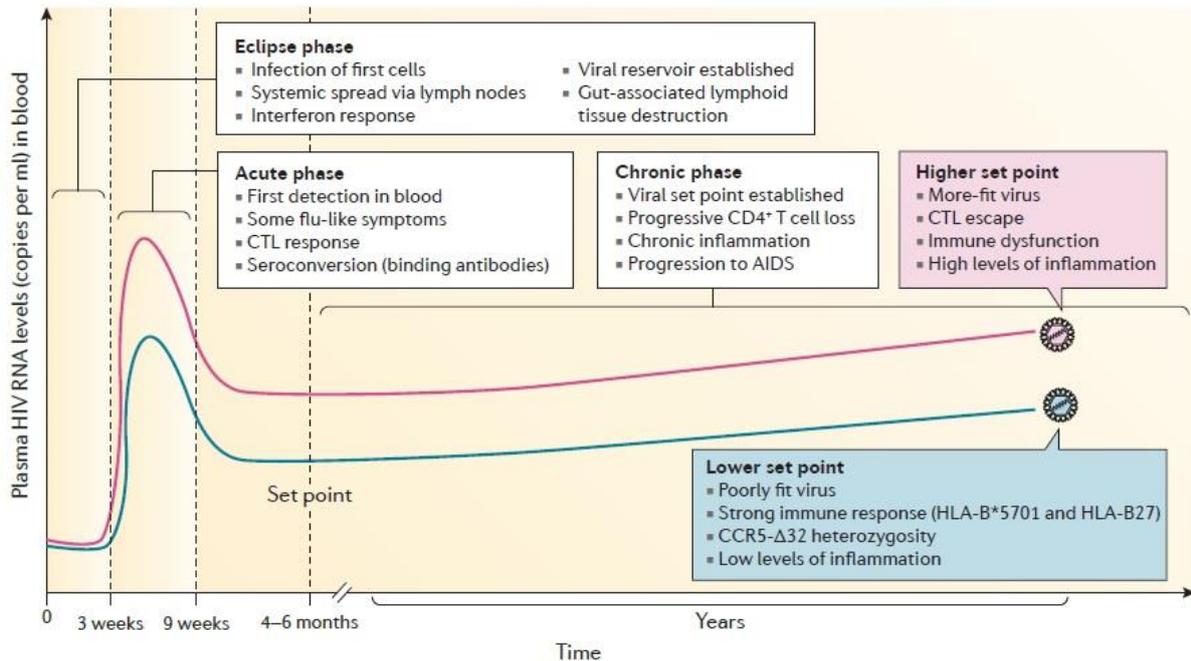


Figura 8. Esquema de las distintas fases de la infección por VIH desde la primoinfección. Durante la infección aguda, se produce una replicación viral masiva en las células CD4+ en ausencia de una respuesta inmunitaria adaptativa. Esta fase puede presentarse como un cuadro clínico agudo, asociado a la seroconversión (43, 44). Al entrar en fase crónica, el desarrollo de una respuesta específica anti-VIH-1 de linfocitos T citolíticos consigue un control parcial de la replicación viral, logrando una disminución de la carga viral (CV) hasta alcanzar un valor estable, denominado “set point”. La magnitud del “set point” de CV refleja un equilibrio dinámico entre la replicación viral y la respuesta inmunitaria específica contra el VIH-1, determinando la progresión hacia la fase SIDA (38). La fase SIDA se caracteriza por enfermedades oportunistas, ya sean infecciosas o neoplásicas, debidas a la alteración de la respuesta inmunitaria por un sistema incompetente, gracias a la disminución de la cantidad y la calidad de las células CD4 (40,41). Por último, mientras que la respuesta inmunitaria específica contra el VIH-1 limita la tasa de replicación viral, no se consigue una inmunidad esterilizante y la replicación viral continua tiene un impacto negativo en el sistema inmunitario, originando una activación inmunitaria crónica que puede resultar en inflamación inespecífica y translocación bacteriana (38). Fuente: Deeks *et al.* (2015) “HIV infection” *Nat Rev Dis Primers* 1, 15035 doi:10.1038/nrdp.2015.35.

El tratamiento realiza mediante la TAR (Tabla 1), cuyo objetivo es mantener la CVP por debajo de 50 copias/mL, para lograr la recuperación inmunológica y reducción de la morbimortalidad, además de la prevención de la transmisión del VIH (45) y de la aparición de mutaciones de resistencia (46).

Tabla 1. Fármacos antirretrovirales disponibles en España

ITIAN	INHIBIDORES DE LA TRANSCRIPTASA INVERSA ANÁLOGOS DE NUCLEÓSIDOS	ZDV, ddi, d4T, 3TC, FTC y ABC + TFV*
INI	INHIBIDORES DE LA INTEGRASA	RAL, EVG, DTG y BIC
ITINN	INHIBIDORES DE LA TRANSCRIPTASA INVERSA NO NUCLEÓSIDOS	NVP, EFV, ETR, RPV y DOR
IP/p	INHIBIDORES DE LA PROTEASA POTENCIADOS	ATV, DRV, LPV, FPV, SQV y TPV

Pie de tabla. En España están comercializados seis inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos (ITIAN): ZDV, ddi, d4T, 3TC, FTC y ABC, *además de un análogo de nucleótido (TFV). Existen cuatro inhibidores de la integrasa (INI) con aprobación para su uso como TAR: RAL, EVG, DTG y BIC. También hay cuatro inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleósidos (ITINN) comercializados: NVP, EFV, ETR y RPV además de uno aprobado pero pendiente de comercialización: doravirina (DOR). En cuanto a los inhibidores de la proteasa (IP) en la TAR de inicio sólo se pueden emplear cuando van potenciados con RTV o COBI. En la actualidad existen seis IP potenciados (IP/p) disponibles para el uso en la práctica clínica: ATV, DRV, LPV, FPV, SQV y TPV, aunque este último está aprobado solamente para pacientes pre-tratados. Fuente: Documento de consenso de GeSIDA: Plan nacional sobre el SIDA respecto al tratamiento antirretroviral en adultos infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (actualización 2020). Grupo de estudio del SIDA-SEIMC. (https://gesida-seimc.org/wp-content/uploads/2020/07/TAR_GUIA_GESIDA_2020_COMPLETA_Julio.pdf).

A pesar de una TAR eficaz, ésta no resulta curativa (47). Esto se debe, principalmente, a que el virus no se replica activamente en todas las células infectadas, si no que en la mayoría se integra en el genoma celular (48,49), donde permanece en estado de latencia formando los reservorios de latencia viral (50,51,52). Por tanto, es fundamental entender la complejidad de los reservorios del virus para comprender la infección por VIH y la enfermedad asociada, así como para avanzar en la mejora de las estrategias para erradicar al virus del organismo.

HIPÓTESIS

Proponemos como fundamento para el desarrollo del presente trabajo que la comprensión de las características de los reservorios de latencia del VIH, santuarios de replicación viral, es importante para entender la compleja patología de la infección por VIH, la limitación de las terapias antirretrovirales para curar esta enfermedad, siendo, por tanto, de vital importancia caracterizarlos y entenderlos mejor para aportar luz en el desarrollo de estrategias que logren la cura funcional o erradicación del virus del organismo.

OBJETIVOS

1. Describir la complejidad del reservorio viral para el VIH y los factores que lo condicionan: el reservorio anatómico, el celular y el molecular. La latencia viral.
2. Analizar las distintas estrategias para la cura funcional o erradicación del virus actualmente en investigación y que contemplen la complejidad del reservorio viral.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.1. EL RESERVORIO DE LATENCIA VIRAL

El VIH no se replica activamente en todas las células infectadas, en la mayoría se integra en el genoma celular (53,54) formando los reservorios de latencia viral (55,56,57). Los reservorios son complejos desde el punto de vista anatómico, según los órganos/tejidos que albergan las células infectadas, desde el punto de vista celular, según las células que contienen el VIH, y a nivel molecular, según las características del genoma del VIH contenido en dichas células (58) (Figura 9).

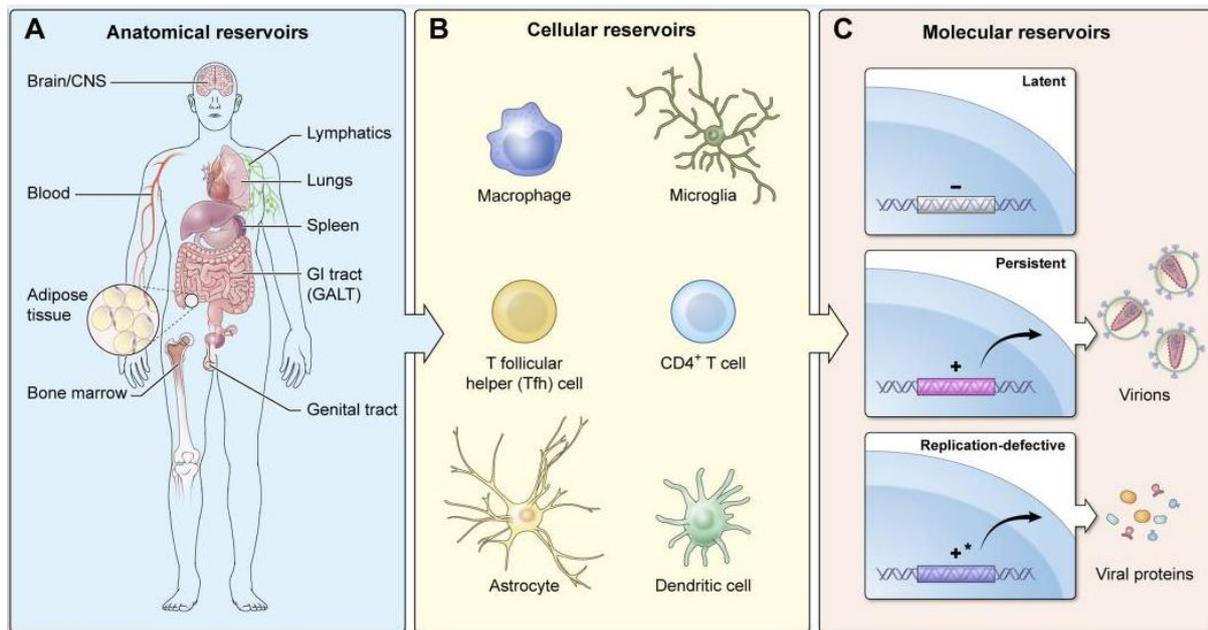


Figura 9. Reservorios de latencia viral del VIH. Podemos localizar los reservorios en varios compartimentos anatómicos, tejidos y localizaciones (A). Participan distintos tipos celulares capaces de ser infectados por el VIH (B). El provirus integrado en el genoma celular (C) puede variar desde transcripcionalmente latente hasta transcripcionalmente activo y capaz de producir viriones o transcripcionalmente activo, pero con replicación defectuosa debido a mutaciones o deleciones del genoma viral, no llegando a producir viriones, pero sí proteínas virales inmunogénicas. Fuente: Henderson et al. (2020) "Advances toward Curing HIV-1 Infection in Tissue Reservoirs" ASM Journals, Journal of Virology 94(3), 00375-19 doi:10.1128/JVI.00375-19.

El VIH se integra en todos los tipos de células T CD4⁺, incluidas las células naïve (59), aunque las células de memoria efectoras más diferenciadas presentan con mayor frecuencia genoma intacto (60). Por otro lado, se ha observado la existencia de provirus (vDNA integrado) en células que expresan los marcadores de activación HLA-DR (61), CD25 (62) y CD69 (63), por tanto, subtipos celulares que expresen estos marcadores, aunque no entren en la definición clásica de células T CD4⁺, podrían contribuir a los reservorios de latencia. También ha sido detectado ADN proviral en células que expresan receptores de control de respuesta inmunitaria (64,65), como las células Th1, que se encuentran sobre todo a lo largo de la mucosa digestiva (66) (Figura 9B).

Tejidos (Figura 9A) con abundantes estructuras linfoides (ganglios linfáticos, bazo y tejidos linfoides asociados a mucosa digestiva (GALT)) contienen grandes cantidades de células infectadas, comprendiendo importantes reservorios de latencia (67,68,69). Los folículos de células B dentro de

estructuras linfoides suponen un santuario de evasión a la respuesta inmunitaria (70) y otros tejidos, como el sistema nervioso central, la médula ósea y el aparato reproductor (71,72), también presentan características de santuario farmacológico (73,74,75). También se ha descrito la importancia del tejido adiposo en la activación inmunitaria e inflamación crónica durante la infección, además de en la persistencia viral, ya que las células del sistema inmunitario de la fracción vascular estromal pueden infectarse y permanecer en estado de latencia (76,77,78,79,80). Existe variabilidad genética en cepas aisladas simultáneamente del plasma y de distintos reservorios en el mismo individuo, lo que indica la existencia de compartimentación del VIH (81), debido a que el reservorio circulante se vuelve más clonal (82) encontrándose en células en proliferación (83) más diferenciadas (84).

A nivel molecular el reservorio puede subdividirse en latente/silente, persistentes/activo y activo pero defectuoso para la replicación (Figura 9C). En el reservorio latente, el virus logra un silenciamiento transcripcional completo, presentando como principales mecanismos de latencia el bloqueo de la elongación proximal, la poliadenilación y el “splicing” (85). Las secuencias virales defectuosas, si bien son incapaces de producir virus infecciosos, pueden tener marcos de lectura abiertos para las proteínas virales, desempeñando un papel en la patogénesis de la enfermedad (33) y en el estatus inflamatorio persistente, derivando en inmunosenescencia (envejecimiento prematuro del sistema inmunitario), debido al estrés oxidativo, acortamiento de los telómeros, inhibición de la telomerasa (TERT), disfunción mitocondrial y al tratamiento con NRTIs (inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de los nucleósidos) (86), y desencadenando eventos no-SIDA. También existe la posibilidad de que, ya sea a través de un evento de recombinación o a través de mecanismos de reparación del ADN, pueda ocurrir la producción viral.

1.2. FACTORES CONDICIONANTES DEL RESERVORIO VIRAL

Es necesario tener en cuenta distintos factores que podrían influir en la complejidad del reservorio de latencia viral, como el subtipo de VIH, el sexo biológico, la edad, la existencia de inflamación crónica y la presentación de control inmunológico o farmacológico excepcional. En cuanto al subtipo de VIH, la infección por el subtipo B del VIH-1 conlleva reservorios significativamente mayores y el VIH-2 presenta diferencias estructurales que influyen de forma significativa en su patogenicidad y en su sensibilidad a los FAR (fármacos antirretrovirales) (87). Las diferencias relacionadas con el sexo biológico (como en la producción hormonal y los genes codificados en los cromosomas sexuales) influyen en el fenotipo de respuesta inmunitaria frente al VIH, en la distribución función del tejido adiposo y la microbiota (88,89,90). También encontramos diferencias según la edad en el sistema inmunitario, caracterizándose el neonatal e infantil por una abundancia de células T CD4+ naïve y pocas células de memoria, derivando en un reservorio pequeño y un sistema inmunitario aparentemente protegido (91), y en ancianos por pocas células naïve y expansión masiva de células efectoras y presentando una disminución más lenta del tamaño del reservorio (92). La infección por VIH induce un estado inflamatorio crónico que conlleva una distribución compleja del reservorio con una mayor activación, derivando en mayores tamaños de reservorio (93, 94, 95). En los controladores de élite, que controlan de forma natural la replicación del VIH en sangre, y los controladores post-tratamiento, que tras interrumpir la TAR mantienen un control duradero de la CVP (96,97), la replicación podría mantenerse elevada a nivel tisular, manteniendo, además, el estado inflamatorio persistente (98, 99).

1.3. POSIBLES ESTRATEGIAS PARA LA ERRADICACIÓN DEL RESERVORIO VIRAL

Teniendo en cuenta las distintas características virales y del reservorio de latencia, actualmente se plantean varias estrategias con el fin de alcanzar la erradicación de la infección, incluso a nivel de los reservorios, lo que supondría la curación de la infección por VIH.

Aunque sea poco probable que las estrategias terapéuticas actuales resulten curativas, el inicio temprano de TAR junto a la utilización de fármacos con nuevas dianas terapéuticas o mejor farmacodinámica (capaces de alcanzar los santuarios farmacológicos) podría acercarnos a la erradicación de la infección (45). El inicio de la TAR (100) en el estadio I de Fiebig deriva en cantidades indetectables de ADN viral integrado en muestras de sangre y tejido y en cualquier etapa de la fase aguda resulta en una disminución de las células infectadas hasta niveles casi imperceptibles en todos los compartimientos (45). Además, existen nuevos FAR en investigación que resultan prometedores, como el Lenacapavir (GS-6207) (Figura 10), que actúa como un inhibidor de la cápside viral, el Fostemsavir, un inhibidor del acoplamiento virus-célula ("attachment"), así como anticuerpos monoclonales como el Ibalizumab, el UB-421 y Ieronlimab (PRO 140), o el Islatravir (MK-8591), un inhibidor de la traslocación de la transcriptasa inversa.

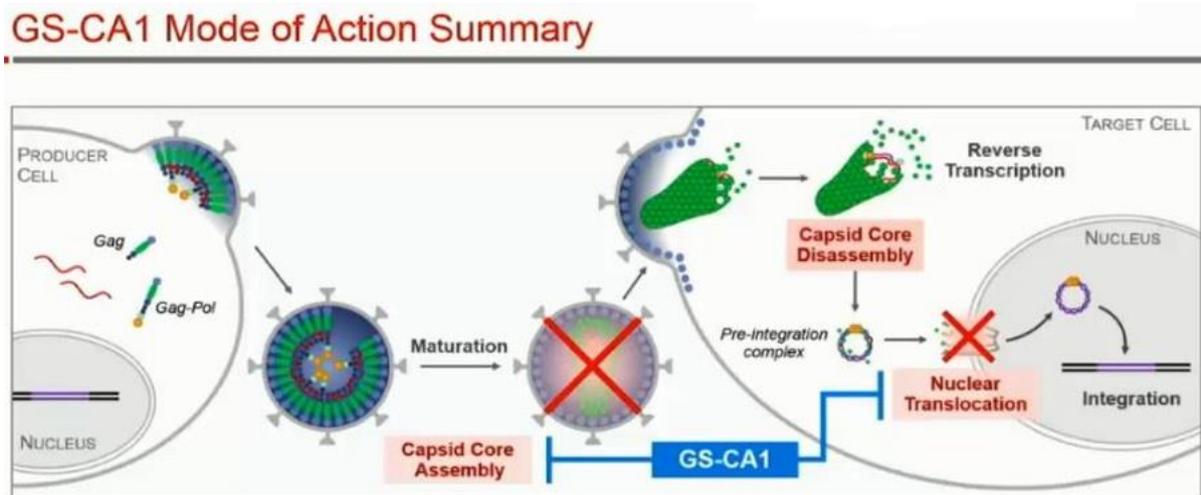


Figura 10. Representación del mecanismo de acción del Lenacapavir. Fuente: Tse et al. (2017) CROI, Abstract #38.

Los mecanismos moleculares del mantenimiento de la latencia son el target en las estrategias para revertir el silenciamiento transcripcional, lo que, al inducir la producción de proteínas virales, haría a las células reconocibles al sistema inmunitario o a la inmunoterapia. La estrategia "shock and kill" (101) (Figura 11) emplea agentes de reversión de latencia (LRA), desencadenando citolisis o aclaramiento inmunomediado que, potenciado por la inducción de las vías proapoptóticas, podría llevar a la eliminación de células infectadas de forma latente (102).

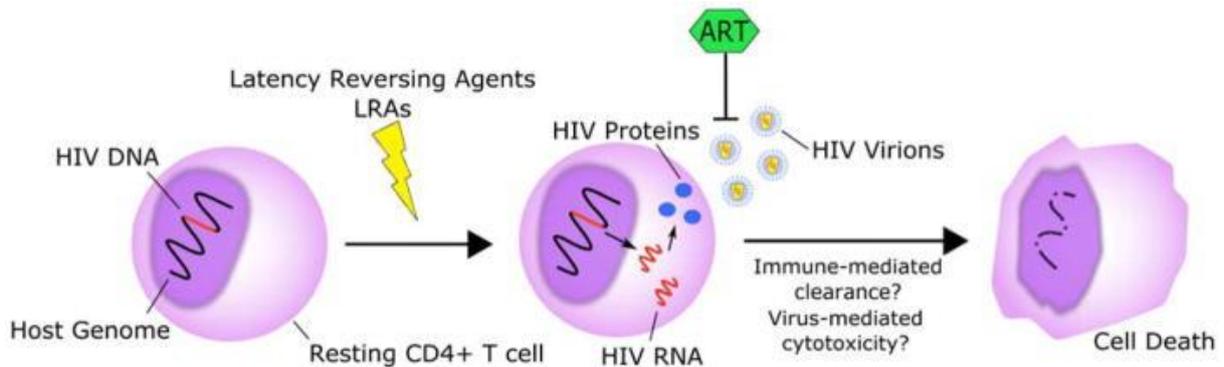


Figura 11. Estrategia “Shock and Kill” para la eliminación de células infectadas de forma latente por el VIH. Varios LRA han demostrado aumentar la expresión génica viral in vitro, incluyendo inhibidores de la histona desacetilasa (HDACi/s), inhibidores de la histona metiltransferasa (HMT), inhibidores de la ADN metiltransferasa, inhibidores de bromodominios, agonistas de la proteína quinasa C (PKC), inhibidores de la vía PI3K/Akt y agonistas de los receptores de respuesta inmunitaria innata TLR7 o TLR9. A su vez, múltiples compuestos proapoptóticos podrían ser útiles para eliminar las células infectadas de forma latente, entre ellos antagonistas de Bcl-2, inhibidores de PI3K/Akt, Smac miméticos, inhibidores XIAP e inductores RIG-I. Fuente: Kim et al. (2018) “Getting the “Kill” into “Shock and Kill”: Strategies to Eliminate Latent HIV.”, *Cell Host Microbe* 23(1):14-26 doi:10.1016/j.chom.2017.12.004.

También cabe la posibilidad de acelerar el silenciamiento viral, que ocurre cuando el genoma del VIH termina en regiones intergenómicas o acaba hipermetilado, resultando en latencia profunda (103). La didehidro-cortistatina A (dCA) (Figura 12) reduce los niveles residuales de transcripción viral en varios modelos de latencia del VIH, rompe el bucle de retroalimentación transcripcional mediada por Tat y establece un estado de latencia casi permanente, lo que disminuye en gran medida la capacidad de reactivación del virus (104). Los inhibidores de mTOR suprimen la reversión del estado de latencia del HIV-1 suprimiendo la transcripción del VIH a través de Tat y de mecanismos independientes de Tat (105).

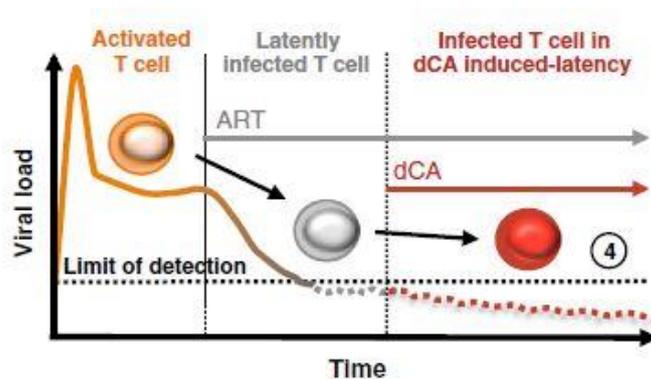


Figura 12. Representación de la evolución de la CVP con TAR sin dCA y con dCA. La adición de un inhibidor de Tat como dCA a la TAR tradicional podría promover y mantener el estado de latencia, posiblemente permitiendo la interrupción del TAR sin rebote viral. Con el tiempo, se observaría una reducción en el tamaño del reservorio viral y el alivio de la inflamación crónica causada por la producción continua de partículas virales. Fuente: Mousseau et al. (2015) “The Tat Inhibitor Didehydro-Cortistatin A Prevents HIV-1 Reactivation from Latency.”, *mBio* 6(4):e00465 doi:10.1128/mBio.00465-15.

La inducción de una respuesta inmunitaria específica contra VIH-1 podría eliminar a las células infectadas, mediante anticuerpos ampliamente neutralizantes (bNAbs), (CAR)-T o el bloqueo de puntos de control de la respuesta inmunitaria. Los bNAbs son capaces de reconocer las células infectadas por el VIH y contribuir a su neutralización, pero necesitan de un sistema inmunitario funcional (106,107,108,109). Las células CAR-T (células T con un receptor de antígeno quimérico (CAR) contra un antígeno de superficie específico) una vez administradas las células siempre están en un "estado de alerta", para lo que una solución podría residir en las convertibleCAR™-T (cCAR-T) (110,111).

Las herramientas de edición génica ("Zing Finger Nucleases (ZFN)", "Transcription Activator like Effector nucleases (TALEN)" o "Clustered Regularly Interspaced Short palindromic repeats (CRISPR-Cas9)") permiten la edición de genes que afecten al provirus, al correceptor CCR5 y a otros mecanismos necesarios para la replicación viral (112). Con la edición génica viral mediante CRISPR-Cas9 (Figura 13) junto a LASER-ART (terapia antirretroviral secuencial de liberación lenta y acción prolongada) se ha logrado el aclaramiento viral de reservorios de latencia de VIH-1 en ratones humanizados infectados (113).

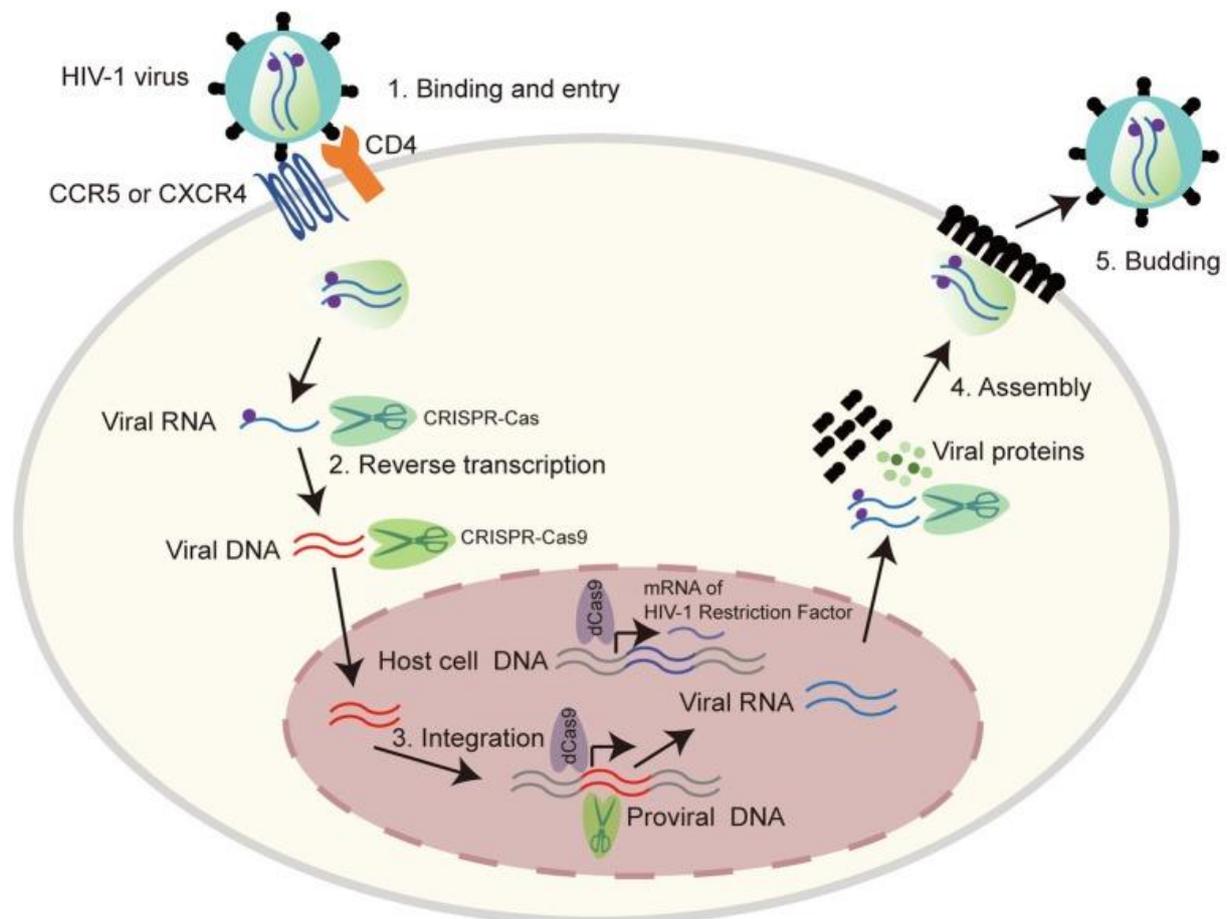


Figura 13. Representación de las distintas posibles dianas para la acción de CRISPR-Cas9 en el ciclo viral. Fuente: Xiao et al. (2019) "Application of CRISPR/Cas9-Based Gene Editing in HIV-1/AIDS Therapy.", *Front Cell Infect Microbiol.* 2019;9:69, doi:10.3389/fcimb.2019.00069.

La edición génica también ofrece una nueva opción de generar precursores hematopoyéticos con el polimorfismo CCR5 Δ 32 (Figura 14), otorgando resistencia natural al VIH-1 R5 trópico en pacientes con VIH (112). Tras trasplante alogénico de precursores hematopoyéticos de donantes con el polimorfismo CCR5 Δ 32 en los denominados pacientes de Londres y de Berlín (114,115), el seguimiento a largo plazo mostró quimerismo al 100% con genotipo homocigótico CCR5 Δ 32 sin CV detectable en ganglios linfáticos, intestino, cerebro y células CD4+ (116). Sin embargo, se sigue detectando niveles muy bajos de genoma de VIH en tejidos linfoides que, aunque se trate de material genético defectuoso sin capacidad replicativa, podría mantener el estado inflamatorio crónico con las consecuencias previamente expuestas (112).

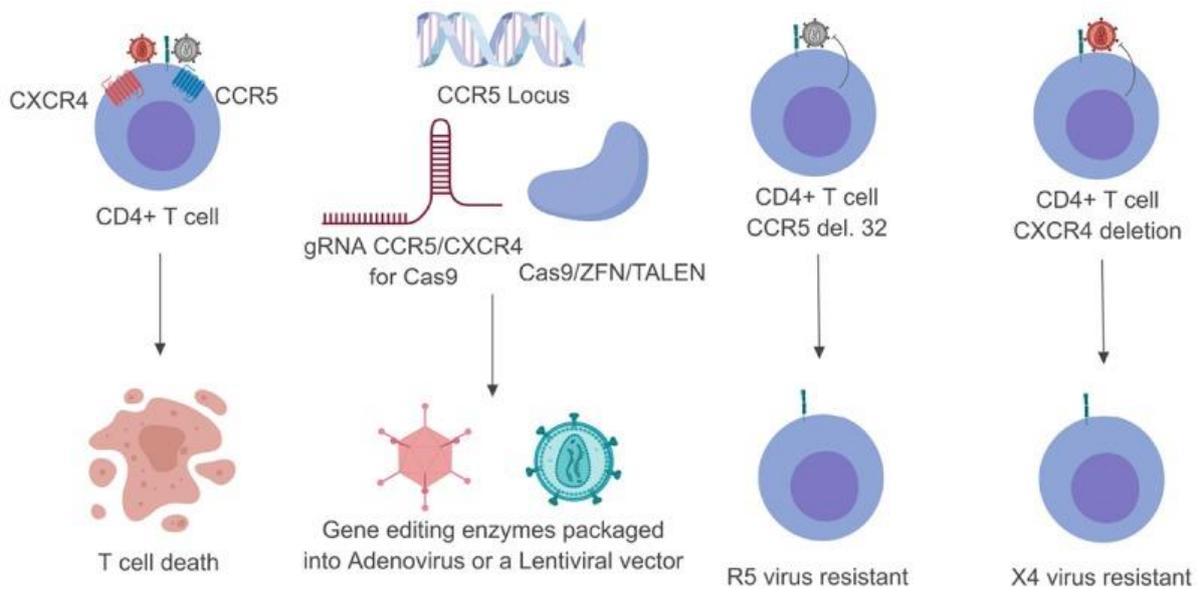


Figura 14. Representación de la edición génica con los correceptores CCR5 o CXCR4 como diana. Mediante Cas9 o ZFN, dos endonucleasas que pueden ser transportadas mediante vector viral hasta las células diana. Fuente: Allen et al. (2018) "Gene Editing of HIV-1 Co-receptors to Prevent and/or Cure Virus Infection." *Front Microbiol.* 2018;9:2940.doi:10.3389/fmicb.2018.02940.

CONCLUSIONES

1.

1a. El reservorio de latencia viral es complejo a nivel anatómico, celular y molecular. Además, puede permanecer silente o estar activo, produciendo viriones infectivos, lo cual genera diversidad y mutaciones de escape a la respuesta inmunitaria, o ser defectuoso, con marcos de lectura abiertos para proteínas virales, produciendo fragmentos que, aunque no tengan capacidad infectiva, condicionen a la respuesta inmunitaria, generando daños en distintos órganos y tejidos.

1b. La complejidad del reservorio está condicionada por factores como el subtipo viral, el sexo biológico, la edad, la presencia de inflamación crónica, o por el control excepcional de la infección.

1c. Los fármacos actuales sólo actúan a nivel del reservorio activo (sobre la replicación viral), pero no actúan sobre los tejidos santuario, siendo el principal obstáculo para lograr la cura de la enfermedad.

2. Los fármacos y estrategias terapéuticas en desarrollo que incluyen la eliminación del virus y del reservorio actúan directamente sobre la formación del virión o evita su formación, o eliminan un receptor clave la progresión del virus, el CCR5. Podemos destacar la molécula orgánica no peptídica que actuaría frente a la cápside viral, el Lenacapavir, destruyendo los viriones nacientes y evitando la integración del infectivo, y la edición génica de CCR5 por con CRISPR-Cas9.

PERSPECTIVAS

El diseño de nuevos FAR contra nuevas dianas terapéuticas, que no actúen sólo sobre la replicación viral, y/o con una mejor farmacodinámica, siendo capaces de alcanzar los distintos santuarios farmacológicos, como el tejido adiposo, podría resultar en la erradicación de los reservorios de latencia viral. Además, el inicio temprano de la TAR, durante la fase aguda o, incluso, durante la fase de eclipse, dificultaría el establecimiento de los reservorios. Dentro de los nuevos FAR en investigación, el Lenacapavir (GS-6207) destaca por poder considerarse como un fármaco “viricida”, al ser un inhibidor de la cápside viral con la proteína p24 como diana, y por actuar sobre todos los tropismos virales (virus R5, X4 y X4R5 trópicos). Actúa inhibiendo la replicación al producir una aceleración del ensamblaje de la cápside, resultando en cápsides malformadas que son morfológicamente distintas de las maduras y de las inmaduras, inhibiendo la formación del virión. En el virión ya formado, destruye la cápside, exponiendo el genoma e impidiendo el ciclo de infección. En este sentido, y con una estrategia de tratamiento temprano y continuado en el tiempo con este tipo de fármacos, y acompasando con el recambio natural de las células en órganos y tejidos (en presencia de este tipo de fármacos), se podría conseguir eliminar el virus de los reservorios y, por tanto, del organismo. Este fármaco supondría un gran avance no sólo en la medicina humana si no también en la veterinaria, ya que haría posible el diseño de fármacos bajo el mismo concepto contra otros virus similares.

Por otro lado, la edición génica ofrece la opción de generar precursores hematopoyéticos con el polimorfismo CCR5 Δ 32, o incluso CCR5 Δ 24, otorgando resistencia frente al VIH R5 trópico. El trasplante alogénico de médula ósea de donantes con el polimorfismo CCR5 Δ 32 ha mostrado resultados prometedores y personas con el polimorfismo, aunque estén infectadas, no evolucionan a fase SIDA. Una estrategia para lograr dicha delección es la edición génica con el sistema CRISPR/Cas9 dirigido frente a CCR5. Las principales limitaciones de esta estrategia radican en que no otorgaría protección frente al VIH dual trópico ni X4 trópicos y que CCR5 es un correceptor importante para la respuesta inmunitaria, en particular frente a otros virus, como se ha propuesto para el virus Influenza o se ha demostrado para el virus West Nile, frente a los que las personas que presentan la delección natural presentan cuadros más graves con mayor morbimortalidad asociada ([117](#),[118](#),[119](#)).

BIBLIOGRAFÍA

1. UNAIDS. <https://www.unaids.org/es>
2. UNAIDS: Joint United Nations Programme on HIV/AIDS (2016) "The AIDS epidemic can be ended by 2030 with your help." https://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/UNAIDS_with-your-help_en.pdf
3. World Health Organization: HIV/AIDS. https://www.who.int/health-topics/hiv-aids#tab=tab_1
4. Farreras Rozman. Medicina Interna, 19ª ED (2020), 306, 2404-2418; <https://www-clinicalkey-com.accedys2.bbtck.ull.es/student/content/book/3-s2.0-B9788491135456003069#hl0000769>
5. Goldman-Cecil. Tratado de medicina interna, 26ª ED (2021), 362, 2251-2252; <https://www-clinicalkey-com.accedys2.bbtck.ull.es/student/content/book/3-s2.0-B9788491137658003623>
6. Miller RH. (1988) "Human immunodeficiency virus may encode a novel protein on the genomic DNA plus strand." *Science*. 239(4846):1420-1422. doi:10.1126/science.3347840
7. Cassan et al. (2016) "Concomitant emergence of the antisense protein gene of HIV-1 and of the pandemic." *Proc Natl Acad Sci USA*. 113(41):11537-11542. doi:10.1073/pnas.1605739113
8. Laverdure et al. (2012) "HIV-1 antisense transcription is preferentially activated in primary monocyte-derived cells." *J Virol*. 86(24):13785-13789. doi:10.1128/JVI.01723-12
9. Torresilla et al. (2013) "Detection of the HIV-1 minus-strand-encoded antisense protein and its association with autophagy." *J Virol*. 87(9):5089-5105. doi:10.1128/JVI.00225-13
10. Kobayashi-Ishihara et al. (2012) "HIV-1-encoded antisense RNA suppresses viral replication for a prolonged period." *Retrovirology*. 9:38. Published 2012 May 8. doi:10.1186/1742-4690-9-38
11. Saayman et al. (2014) "An HIV-encoded antisense long noncoding RNA epigenetically regulates viral transcription." *Mol Ther*. 22(6):1164-1175. doi:10.1038/mt.2014.29
12. Delgado et al. (2011) "Virological characteristics of HIV." *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 29(1):58-65 doi:10.1016/j.eimc.2010.10.001.
13. Carvajal et al. (2019) "Human immunodeficiency virus: useful findings in diagnosis, prevention and treatment." *Enf Infec Microbiol*. 39(2):65-70.
14. Shah & Savjani (2018) "Recent updates for designing CCR5 antagonists as anti-retroviral agents.", *Eur J Med Chem*. 147: 115-129.
15. Cashin et al. (2013) "Linkages between HIV-1 specificity for ccr5 or cxcr4 and in vitro usage of alternative coreceptors during progressive hiv-1 subtype c infection.", *Retrovirology* 10:98.
16. Hikichi et al. (2016) "Increased HIV-1 sensitivity to neutralizing antibodies by mutations in the Env v3-coding region for resistance to CXCR4 antagonists.", *J Gen Virol*. 97(9):2427-2440.
17. Hongjaisee et al. (2017) "Effect of amino acid substitutions within the v3 Region of hiv-1 crf01_ae on interaction with CCR5-coreceptor.", *AIDS Res Hum Retroviruses* 33(9):946-951.
18. Badia et al. (2014) "Gene editing using a zinc-finger nuclease mimicking the ccr5Δ32 mutation induces resistance to CCR5-using HIV-1", *J Antimicrob Chemother* 69(7):1755-1759.
19. Gutiérrez et al. (2011) "Tropismo del VIH. Técnicas disponibles y utilidad." *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 29(Supl 5):45-50.
20. Allers et al. (2011) "Evidence for the cure of hiv infection by ccr5Δ32/Δ32 stem cell transplantation", *Blood* 117(10):2791-2799.
21. Shi et al. (2017) "talenmediated knockout of ccr5 confers protection against infection of human immunodeficiency virus", *J Acquir Immune Defic Syndr*. 74(2):229-241.
22. Arendt et al. (2019) "Predominance of the heterozygous CCR5 delta-24 deletion in African individuals resistant to HIV infection might be related to a defect in CCR5 addressing at the cell surface." *J Int AIDS Soc*. 22(9):e25384. doi: 10.1002/jia2.25384.

23. Mamede et al. (2017) "Early cytoplasmic uncoating is associated with infectivity of HIV-1." *Proc Natl Acad Sci USA* 114:pp. E7169-E7178
24. Engelman & Cherepanov (2017) "Retroviral intrasomes arising." *Curr Opin Struct Biol.* 47:pp. 23-29
25. Lusic & Siliciano (2017) "Nuclear landscape of HIV-1 infection and integration." *Nature Reviews.* 15:69-82. doi: 10.1038/nrmicro.2016.162.
26. Sherrill-Mix et al. (2013) "HIV latency and integration site placement in five cell-based models." *Retrovirology.* 10:90 doi: <https://doi.org/10.1186/1742-4690-10-90>.
27. Gray et al. (2001) "Probability of HIV-transmission per coital act in monogamous heterosexual HIV-1 discordant couples in Rakai, Uganda." *Lancet* 357:pp. 1149-1153
28. Powers et al. (2008) "Rethinking the heterosexual infectivity of HIV-1: a systematic review and meta-analysis." *Lancet Infect Dis.* 8:pp. 553-563
29. Pilcher et al. (2004) "Brief but efficient: acute HIV infection and the sexual transmission of HIV." *J Infect Dis.* 189:pp. 1785-1792
30. Quinn et al. (2000) "Viral load and heterosexual transmission of human immunodeficiency virus type 1." *N Engl J Med.* 342:pp. 921-929
31. Cohen et al. (2011) "Prevention of HIV-1 infection with early antiretroviral therapy." *N Engl J Med.* 365:pp. 493-505
32. Cohen et al. (2016) "Antiretroviral therapy for the prevention of HIV-1 transmission." *N Engl J Med.* 375:pp. 830-839
33. World Health Organization. WHO Validates Countries' Elimination of Mother-to-Child Transmission of HIV and Syphilis [Press Release]. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2016
34. World Health Organization. WHO Validates Elimination of Mother-to-Child Transmission of HIV and Syphilis in Cuba [Press Release]. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2015
35. Laurent et al. (2015) "No perinatal HIV-1 transmission from women with effective antiretroviral therapy starting before conception." *Clinical Infectious Diseases.* 61(11):1715.
36. Tubiana et al. (2010) "Factors Associated with Mother-to-Child Transmission of HIV-1 Despite a Maternal Viral Load <500 Copies/mL at Delivery: A Case-Control Study Nested in the French Perinatal Cohort (EPF-ANRS CO1)." *Clin Infect Dis.* 50:585-596
37. Read et al. (2012) "When should HAART be initiated in pregnancy to achieve an undetectable HIV viral load by delivery?" *AIDS.* 26(9):1095-1103
38. Mamede et al. (2017) "Early cytoplasmic uncoating is associated with infectivity of HIV-1." *Proc Natl Acad Sci USA;* 114:pp. E7169-E7178
39. Mandell, Douglas, Bennett. *Enfermedades infecciosas. Principios y práctica*, 9ª ED (2021), 118, 1583-1598. <https://www-clinicalkey-com.accedys2.bbtk.ull.es/student/content/book/3-s2.0-B9788491134992001181#hl0000691>
40. Narita et al (1998) "Paradoxical worsening of tuberculosis following antiretroviral therapy in patients with AIDS." *Am J Respir Crit Care Med;* 158:pp. 157-161
41. Carr et al. (1998) "A syndrome of peripheral lipodystrophy, hyperlipidaemia and insulin resistance in patients receiving HIV protease inhibitors." *AIDS;* 12:pp. F51-F58
42. Fiebig et al. (2003) "Dynamics of HIV viremia and antibody seroconversion in plasma donors: implications for diagnosis and staging of primary HIV infection." *AIDS;* 17(13):1871-1879. doi:10.1097/00002030-200309050-00005
43. Lohse et al. (2007) "Survival of persons with and without HIV infection in Denmark, 1995-2005." *Ann Intern Med;* 146:pp. 87-95
44. Lawn, Bekker & Miller (2005) "Immune reconstitution disease associated with mycobacterial infections in HIV-infected individuals receiving antiretrovirals." *Lancet Infect Dis;* 5:pp 361-373

45. Documento de consenso de GeSIDA: Plan nacional sobre el SIDA respecto al tratamiento antirretroviral en adultos infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (actualización 2020). Grupo de estudio del SIDA-SEIMC. (https://gesida-seimc.org/wp-content/uploads/2020/07/TAR_GUIA_GESIDA_2020_COMPLETA_Julio.pdf).
46. Emery et al. (2008) "Major clinical outcomes in antiretroviral therapy (ART)-naive participants and in those not receiving ART at baseline in the SMART study." *J Infect Dis*; 197:1133-44.
47. Chun, Moir & Fauci (2015) "HIV reservoirs as obstacles and opportunities for an HIV cure." *Nat Immunol*; 16:pp. 584-589
48. Zack et al (1990) "HIV-1 entry into quiescent primary lymphocytes: molecular analysis reveals a labile, latent viral structure." *Cell*; 61:pp. 213-222
49. Bukrinsky et al. (1991) "Quiescent T lymphocytes as an inducible virus reservoir in HIV-1 infection." *Science*; 18:pp. 423-427
50. Chun et al. (1997) "Presence of an inducible HIV-1 latent reservoir during highly active antiretroviral therapy." *Proc Natl Acad Sci USA*; 94:pp. 13193-13197
51. Finzi et al. (1997) "Identification of a reservoir for HIV-1 in patients on highly active antiretroviral therapy." *Science*; 278:pp. 1295-1300
52. Wong et al. (1997) "Recovery of replication-competent HIV despite prolonged suppression of plasma viremia." *Science*; 278:pp. 1291-1295
53. Zack et al. (1990) "HIV-1 entry into quiescent primary lymphocytes: molecular analysis reveals a labile, latent viral structure." *Cell*; 61:pp. 213-222
54. Bukrinsky et al. (1991) "Quiescent T lymphocytes as an inducible virus reservoir in HIV-1 infection." *Science*; 18:pp. 423-427
55. Cohn, Chomont & Deeks (2020) "The Biology of the HIV-1 Latent Reservoir and Implications for Cure Strategies." *Cell Host Microbe.*; 27(4):519-530. doi:10.1016/j.chom.2020.03.014
56. Blankson, Persaud & Siliciano (2002) "The challenge of viral reservoirs in HIV-1 infection." *Annu Rev Med.*; 53:557-593. doi:10.1146/annurev.med.53.082901.104024
57. Sengupta & Siliciano (2018) "Targeting the Latent Reservoir for HIV-1." *Immunity.*; 48(5):872-895. doi:10.1016/j.immuni.2018.04.030
58. Henderson et al. (2020) "Advances toward Curing HIV-1 Infection in Tissue Reservoirs" *ASM Journals, Journal of Virology* 94(3), 00375-19 doi:10.1128/JVI.00375-19
59. Imamichi et al. (2020) "Defective HIV-1 proviruses produce viral proteins." *Proc Natl Acad Sci USA.*; 117(7):3704-3710. doi: 10.1073/pnas.1917876117.
60. Pinzone et al. (2019) "Longitudinal HIV sequencing reveals reservoir expression leading to decay which is obscured by clonal expansion." *Nat Commun.* ;10(1):728. doi: 10.1038/s41467-019-08431-7.
61. Hiener et al. (2017) "Identification of Genetically Intact HIV-1 Proviruses in Specific CD4⁺ T Cells from Effectively Treated Participants." *Cell Rep.*; 21(3):813-822. doi:10.1016/j.celrep.2017.09.081
62. Horsburgh et al. (2020) "High levels of genetically intact HIV in HLA-DR⁺ memory T cells indicates their value for reservoir studies." *AIDS.*; 34(5):659-668. doi: 10.1097/QAD.0000000000002465.
63. Alexaki, Liu & Wigdahl (2008) "Cellular reservoirs of HIV-1 and their role in viral persistence." *Curr HIV Res.*; 6(5):388-400. doi: 10.2174/157016208785861195.
64. Cantero-Pérez et al. (2019) "Resident memory T cells are a cellular reservoir for HIV in the cervical mucosa." *Nat Commun.*; 10(1):4739. doi: 10.1038/s41467-019-12732-2.
65. Chew et al. (2016) "TIGIT Marks Exhausted T Cells, Correlates with Disease Progression, and Serves as a Target for Immune Restoration in HIV and SIV Infection." *PLoS Pathog*; 12(1):e1005349. doi: 10.1371/journal.ppat.1005349.

66. Noto et al. (2018) "CD32⁺ and PD-1⁺ Lymph Node CD4 T Cells Support Persistent HIV-1 Transcription in Treated Aviremic Individuals." *J Virol.*; 92(20):e00901-18. doi: 10.1128/JVI.00901-18.
67. Pardons et al. (2019) "Single-cell characterization and quantification of translation-competent viral reservoirs in treated and untreated HIV infection. *PLoS Pathog*; 15(2):e1007619. doi: 10.1371/journal.ppat.1007619.
68. Banga et al. (2016) "PD-1(+) and follicular helper T cells are responsible for persistent HIV-1 transcription in treated aviremic individuals." *Nat Med.*; 22(7):754-61. doi: 10.1038/nm.4113.
69. Wacleche et al. (2016) "New insights into the heterogeneity of Th17 subsets contributing to HIV-1 persistence during antiretroviral therapy." *Retrovirology.*; 13(1):59. doi:10.1186/s12977-016-0293-6.
70. Chun et al. (2008) "Persistence of HIV in gut-associated lymphoid tissue despite long-term antiretroviral therapy." *J Infect Dis.*; 197(5):714-720. doi:10.1086/527324
71. Connick et al., 2014; Fukazawa et al. (2015) "B cell follicle sanctuary permits persistent productive simian immunodeficiency virus infection in elite controllers." *Nat Med.*; 21(2):132-9. doi: 10.1038/nm.3781.
72. Ganor et al. (2019) "HIV-1 reservoirs in urethral macrophages of patients under suppressive antiretroviral therapy." *Nat Microbiol.*; 4(4):633-644. doi: 10.1038/s41564-018-0335-z.
73. Fromentin et al. (2016) "CD4⁺ T Cells Expressing PD-1, TIGIT and LAG-3 Contribute to HIV Persistence during ART." *PLoS Pathog.* 12(7):e1005761. doi:10.1371/journal.ppat.1005761
74. Henrich, Deeks & Pillai (2017) "Measuring the size of the latent human immunodeficiency virus reservoir: the present and future of evaluating eradication strategies." *J Infect Dis*; 215:pp. S134-S141
75. Barton, Winckelmann & Palmer (2016) "HIV-1 reservoirs during suppressive therapy." *Trends Microbiol*; 24:pp. 345-355
76. Estes et al. (2017) "Defining total-body AIDS-virus burden with implications for curative strategies." *Nat Med.*; 23(11):1271-1276. doi: 10.1038/nm.4411.
77. Damouche et al. (2015) "Adipose Tissue Is a Neglected Viral Reservoir and an Inflammatory Site during Chronic HIV and SIV Infection." *PLoS Pathog.* 11(9):e1005153. doi: 10.1371/journal.ppat.1005153.
78. Couturier & Lewis (2018) "HIV Persistence in Adipose Tissue Reservoirs." *Curr HIV/AIDS Rep*; 15(1):60-71. doi: 10.1007/s11904-018-0378-z.
79. Hampton T. (2015) "Adipose Tissue: An HIV Reservoir With Inflammatory Potential." *JAMA*; 314(17):1788. doi:10.1001/jama.2015.13106;
80. Bourgeois et al. (2019) "Specific Biological Features of Adipose Tissue, and Their Impact on HIV Persistence." *Front Microbiol*; 10:2837. doi: 10.3389/fmicb.2019.02837
81. Colby et al. (2018) "RV411 study group. Rapid HIV RNA rebound after antiretroviral treatment interruption in persons durably suppressed in Fiebig I acute HIV infection." *Nat Med.* Jul;24(7):923-926. doi: 10.1038/s41591-018-0026-6.
82. Henrich et al. (2017) "HIV-1 persistence following extremely early initiation of antiretroviral therapy (ART) during acute HIV-1 infection: An observational study." *PLoS Med.*; 14(11):e1002417. doi: 10.1371/journal.pmed.1002417.
83. Cohn et al. (2015) "HIV-1 integration landscape during latent and active infection." *Cell.*; 160(3):420-32. doi: 10.1016/j.cell.2015.01.020.
84. Wagner et al. (2014) "HIV latency. Proliferation of cells with HIV integrated into cancer genes contributes to persistent infection." *Science.*; 345(6196):570-3. doi: 10.1126/science.1256304.
85. Wang et al. (2018) "Expanded cellular clones carrying replication-competent HIV-1 persist, wax, and wane." *Proc Natl Acad Sci USA.*; 115(11):E2575-E2584. doi: 10.1073/pnas.1720665115.

86. Zicari et al. (2019) "Immune Activation, Inflammation, and Non-AIDS Co-Morbidities in HIV-Infected Patients under Long-Term ART." *Viruses.*; 11(3):200. doi:10.3390/v11030200
87. Campbell-Yesufu & Gandhi (2011) "Update on human immunodeficiency virus (HIV)-2 infection." *Clin Infect Dis*; 52(6):780-787. doi:10.1093/cid/ciq248
88. Scully et al. (2019) "Sex-Based Differences in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Reservoir Activity and Residual Immune Activation." *J Infect Dis.*; 219(7):1084-1094. doi:10.1093/infdis/jiy617
89. Rechten & Altfeld (2019) "Sexual dimorphism in HIV-1 infection." *Semin Immunopathol* 41, 195–202 doi:10.1007/s00281-018-0704-y
90. Das et al. (2018) "Estrogen receptor-1 is a key regulator of HIV-1 latency that imparts gender-specific restrictions on the latent reservoir." *Proc Natl Acad Sci USA.*; 115(33):E7795-E7804. doi:10.1073/pnas.1803468115
91. Garcia-Broncano et al. (2019) "Early antiretroviral therapy in neonates with HIV-1 infection restricts viral reservoir size and induces a distinct innate immune profile." *Sci Transl Med.*; 11(520):eaax7350. doi:10.1126/scitranslmed.aax7350
92. Persaud et al. (2014) "Intrinsic CD4+ T cell sensitivity and response to a pathogen are set and sustained by avidity for thymic and peripheral complexes of self peptide and MHC." *Nat Immunol.*; 15(3):266-274. doi:10.1038/ni.2822
93. Banga et al. (2016) "PD-1(+) and follicular helper T cells are responsible for persistent HIV-1 transcription in treated aviremic individuals." *Nat Med.*; 22(7):754-761. doi:10.1038/nm.4113
94. Chomont et al. (2009) "HIV reservoir size and persistence are driven by T cell survival and homeostatic proliferation." *Nat Med.*; 15(8):893-900. doi:10.1038/nm.1972
95. Fromentin et al. (2019) "PD-1 blockade potentiates HIV latency reversal ex vivo in CD4+ T cells from ART-suppressed individuals." *Nat Commun*; 10(1):814 doi:10.1038/s41467-019-08798-7
96. Namazi et al. (2018) "The Control of HIV After Antiretroviral Medication Pause (CHAMP) Study: Posttreatment Controllers Identified From 14 Clinical Studies." *J Infect Dis.*; 218(12):1954-1963. doi:10.1093/infdis/jiy479
97. Sáez-Cirión et al. (2013) "Post-treatment HIV-1 controllers with a long-term virological remission after the interruption of early initiated antiretroviral therapy ANRS VISCONTI Study." *PLoS Pathog.*; 9(3):e1003211. doi:10.1371/journal.ppat.1003211
98. Boritz et al. (2016) "Multiple Origins of Virus Persistence during Natural Control of HIV Infection." *Cell.*; 166(4):1004-1015. doi:10.1016/j.cell.2016.06.039
99. Fukazawa et al. (2015) "B cell follicle sanctuary permits persistent productive simian immunodeficiency virus infection in elite controllers." *Nat Med.*; 21(2):132-139. doi:10.1038/nm.3781
100. Leyre et al. (2020) "Abundant HIV-infected cells in blood and tissues are rapidly cleared upon ART initiation during acute HIV infection." *Sci Transl Med.*; 12(533):eaav3491. doi:10.1126/scitranslmed.aav3491
101. Deeks SG (2012) "HIV: Shock and kill." *Nature.*; 487(7408):439-440. doi:10.1038/487439a
102. Kim, Anderson & Lewin (2018) "Getting the "Kill" into "Shock and Kill": Strategies to Eliminate Latent HIV." *Cell Host Microbe.*; 23(1):14-26. doi:10.1016/j.chom.2017.12.004
103. Einkauf et al. (2019) "Intact HIV-1 proviruses accumulate at distinct chromosomal positions during prolonged antiretroviral therapy." *J Clin Invest.*; 129(3):988-998. doi:10.1172/JCI124291
104. Mousseau (2015) "The Tat Inhibitor Didehydro-Cortistatin A Prevents HIV-1 Reactivation from Latency." *mBio.*; 6(4):e00465. doi:10.1128/mBio.00465-15
105. Besnard et al. (2016) "The mTOR Complex Controls HIV Latency." *Cell Host Microbe.*; 20(6):785-797. doi:10.1016/j.chom.2016.11.001

106. Bar et al. (2016) "Effect of HIV Antibody VRC01 on Viral Rebound after Treatment Interruption." *N Engl J Med.*; 375(21):2037-2050. doi:10.1056/NEJMoa1608243
107. Mendoza et al. (2018) "Combination therapy with anti-HIV-1 antibodies maintains viral suppression." *Nature.*; 561(7724):479-484. doi:10.1038/s41586-018-0531-2
108. Bar-On et al. (2018) "Safety and antiviral activity of combination HIV-1 broadly neutralizing antibodies in viremic individuals." *Nat Med.*; 24(11):1701-1707. doi:10.1038/s41591-018-0186-4
109. Caskey et al. (2017) "Antibody 10-1074 suppresses viremia in HIV-1-infected individuals." *Nat Med.*; 23(2):185-191. doi:10.1038/nm.4268
110. Herzig et al. (2019) "Attacking Latent HIV with convertible CAR-T Cells, a Highly Adaptable Killing Platform." *Cell.*; 179(4):880-894.e10. doi:10.1016/j.cell.2019.10.002
111. Bonifant et al. (2016) "Toxicity and management in CAR T-cell therapy." *Mol Ther Oncolytics.*; 3:16011. doi:10.1038/mto.2016.11
112. Karuppusamy et al. (2021) "The Strategies and Challenges of CCR5 Gene Editing in Hematopoietic Stem and Progenitor Cells for the Treatment of HIV" *Stem Cell Rev Rep.*; 10.1007/s12015-021-10145-7. doi:10.1007/s12015-021-10145-7
113. Dash et al. (2019) "Sequential LASER ART and CRISPR Treatments Eliminate HIV-1 in a Subset of Infected Humanized Mice." *Nat Commun.*; 10(1):2753. doi:10.1038/s41467-019-10366-y
114. Hütter et al. (2009) "Long-term control of HIV by CCR5 Delta32/Delta32 stem-cell transplantation." *N Engl J Med.*; 360(7):692-698. doi:10.1056/NEJMoa0802905
115. Hütter et al. (2009) "Long-term control of HIV by CCR5 Delta32/Delta32 stem-cell transplantation." *N Engl J Med.*; 360(7):692-698. doi:10.1056/NEJMoa0802905
116. Hütter & Thiel (2011) "Allogeneic transplantation of CCR5-deficient progenitor cells in a patient with HIV infection: an update after 3 years and the search for patient no. 2." *AIDS.*; 25(2):273-274. doi:10.1097/QAD.0b013e328340fe28
117. Falcon et al. (2015) "CCR5 deficiency predisposes to fatal outcome in influenza virus infection." *J Gen Virol.*; 96(8):2074-2078. doi:10.1099/vir.0.000165
118. Glass et al. (2006) "CCR5 deficiency increases risk of symptomatic West Nile virus infection." *J Exp Med.*; 203(1):35-40. doi:10.1084/jem.20051970
119. Lim et al. (2006) "CCR5: no longer a "good for nothing" gene--chemokine control of West Nile virus infection." *Trends Immunol.*; 27(7):308-312. doi:10.1016/j.it.2006.05.007