



FACULTAD DE FARMACIA

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

TRABAJO FIN DE GRADO

**NUEVAS ESTRATEGIAS FARMACOLÓGICAS PARA LA
ELIMINACIÓN DE LOS RESERVORIOS VIRALES**

Autor: Daniel Herranz Vicente

Fecha: Junio 2020

Tutor: Luis Miguel Bedoya del Olmo

ÍNDICE

RESUMEN	2
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1. Epidemiología.....	3
1.2. Taxonomía	3
1.3. Fases de la enfermedad y evolución	3
1.4. Estructura y genoma viral.....	4
1.5. Ciclo biológico del VIH	5
1.6. Reservorios virales.....	6
2. OBJETIVOS	9
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	9
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	10
4.1. Shock and kill	10
4.1.1. Inhibidores de histona desacetilasas (HDACis):	10
4.1.2. Agonistas de PKC (proteína kinasa C):.....	12
4.1.3. Inhibidores de histona y ADN metiltransferasas (HMTis y DNMTis):.....	13
4.1.4. Inductores de P-TEFb e inhibidores de BET:.....	14
4.1.5. Otros LRAs:	15
4.2. Block and lock.....	17
4.3. Escisión de ADN proviral (gene-editing technology)	18
5. CONCLUSIONES	18
6. BIBLIOGRAFÍA	19

RESUMEN

Los reservorios virales son grupos de células de vida larga del sistema inmune en las que el virus del VIH-1 permanece en latencia y no pueden ser atacados por el sistema inmune, y donde la cART tampoco es efectiva. Por ello, constituyen el mayor obstáculo para la cura esterilizante y total erradicación de la infección por VIH. Las investigaciones actuales en materia de VIH están dirigidas a la eliminación de estos reservorios virales, con la estrategia "shock and kill" como punta de lanza. Esta estrategia se compone de dos etapas: una etapa de reactivación de la latencia del virus, mediante agentes de reversión de latencia (LRAs) y una etapa de muerte de las células que expresan el virus y pueden ser reconocidas por el sistema inmunitario, mediante la acción de linfocitos T citotóxicos (CTL) y células NK. Algunos ejemplos de LRAs son los inhibidores de HDAC, agonistas de PKC (efecto sinérgico utilizados en combinación), inhibidores de BET e inductores de P-TEFb (también muestran sinergismo en combinación con los dos grupos anteriores), disulfiram o los inhibidores de ICP. Estos últimos tienen especial importancia porque también participan en la estimulación de la muerte de células infectadas mejorando la respuesta del sistema inmune. Además, son los únicos LRAs que han demostrado una reducción significativa en el tamaño del reservorio *in vivo* en pacientes humanos. Al margen de los ICPis, actualmente no se ha encontrado un compuesto que por sí solo haya conseguido reducir del reservorio viral, aunque si han demostrado reactivar la latencia y aumentar la transcripción y expresión del genoma proviral, principalmente en combinación. El futuro de la terapia de los reservorios de VIH-1 reside por tanto en la combinación de fármacos LRAs y la estimulación de la respuesta inmune, así como en otras estrategias como la "block and lock" (forzar a la latencia a un estado más profundo evitando su reactivación a largo plazo) o la técnica CRISPR/Cas9 de edición genética para la escisión y eliminación del ADN proviral integrado en el genoma hospedador.

ABSTRACT

Viral reservoirs are groups of long-living immune cells where HIV-1 is in a state of latency that cannot be targeted by the immune system and, thus, cART is not effective. Therefore, viral reservoirs are the biggest hurdle to overcome to achieve a sterilizing cure for HIV infection. Current investigations on HIV infection are based on the eradication of viral reservoirs, with "shock and kill" as the major therapeutical strategy. It is based on two steps: reactivation of viral latency using latency reversal agents (LRAs) and killing of infected cells which are expressing the virus and can be attacked by the immune system (Cytotoxic T cells and NK cells). HDAC inhibitors, PKC agonists (synergistic effect), BET inhibitors and P-TEFb activators (also combinations with the mentioned groups), disulfiram and ICP (*immune checkpoints*) inhibitors are some examples of LRAs. These ICPis are remarkable since they play a role in both the shocking and the killing phase, by boosting the immune response and stimulating infected cell death. Moreover, only ICPis have succeeded to significantly decrease the size of the latent reservoir in human patients. Apart from these drugs, nowadays there are not drugs able to reduce the reservoir size *in vivo*, even though some have shown a latency reversing effect, especially in combination. Hence, the future of HIV-1 reservoirs elimination therapy lies in the combination of LRAs and stimulation of the immune response, as well as in other approaches such as "block and lock" therapy (based on the creation of a deep state of latency in the viral reservoirs thereby preventing them from reactivation) and CRISPR/Cas9 gene-editing therapy for the excision and elimination of integrated viral DNA.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Epidemiología

El SIDA o Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida es la enfermedad que produce la infección por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH). La enfermedad se caracteriza por una inmunosupresión consecuencia del tropismo del virus hacia los linfocitos T CD4+. Ha sido y es una de las principales causas de muerte mundiales desde el comienzo de la pandemia (1981), y se estima que ha afectado a más de 74 millones de personas en todo el mundo, de los cuales más de 32 millones han fallecido por enfermedades relacionadas con el SIDA, debidas a la inmunodepresión. Actualmente, más de 38 millones de personas están infectadas por el VIH y cada año más de 1,5 millones de personas contraen la infección por VIH, principalmente hombres que mantienen relaciones sexuales con otros hombres sin protección y usuarios de drogas intravenosa¹. La mayor cantidad de seropositivos se concentra en África Subsahariana, donde los nuevos infectados no son homosexuales.

Como principales formas de transmisión destacan el contacto directo del virus con las membranas mucosas, tejidos lesionados o vía sexual, y la inoculación del virus vía percutánea o intravenosa². También, aunque menos común, puede transmitirse de madre a hijo durante el embarazo, el parto o la lactancia materna.

1.2. Taxonomía

El VIH es un virus de la familia *Retroviridae*, que se caracteriza por tener la capacidad de transformar el ARN viral en ADN gracias a la acción de una transcriptasa inversa o ADN polimerasa ARN dependiente. Este ADN viral es capaz de integrarse en el genoma de la célula infectada gracias a la integrasa, y aprovechar la maquinaria replicativa celular para generar nuevas partículas víricas. Asimismo, es del género *Lentivirus*, con largos periodos de incubación y estructuras genéticas similares: gag/pol/env más los genes accesorios (trans activadores). Solo se conocen 2 tipos de VIH que afectan a humanos: VIH-1 y VIH-2. El VIH-1 está distribuido por todo el mundo, es el más común y de sintomatología más grave, mientras que el VIH-2 permanece bastante restringido al África Occidental y Central, siendo menos patogénico³.

1.3. Fases de la enfermedad y evolución

La infección por el VIH origina un trastorno grave, progresivo e irreversible de la función inmune. El VIH infecta y destruye las células inmunitarias del cuerpo (linfocitos T CD4+, monocitos, macrófagos, microglía y células dendríticas, incluyendo las de Langerhans), principalmente linfocitos T CD4+. Este descenso en los niveles de linfocitos hace que el organismo sea más vulnerable frente a multitud de infecciones y ciertos tipos de cáncer, y sin tratamiento, el VIH puede evolucionar a SIDA, que es la fase más avanzada de la infección, cuando la carga viral es alta y los niveles de linfocitos T CD4+ están por debajo de 200 por milímetro cúbico⁴.

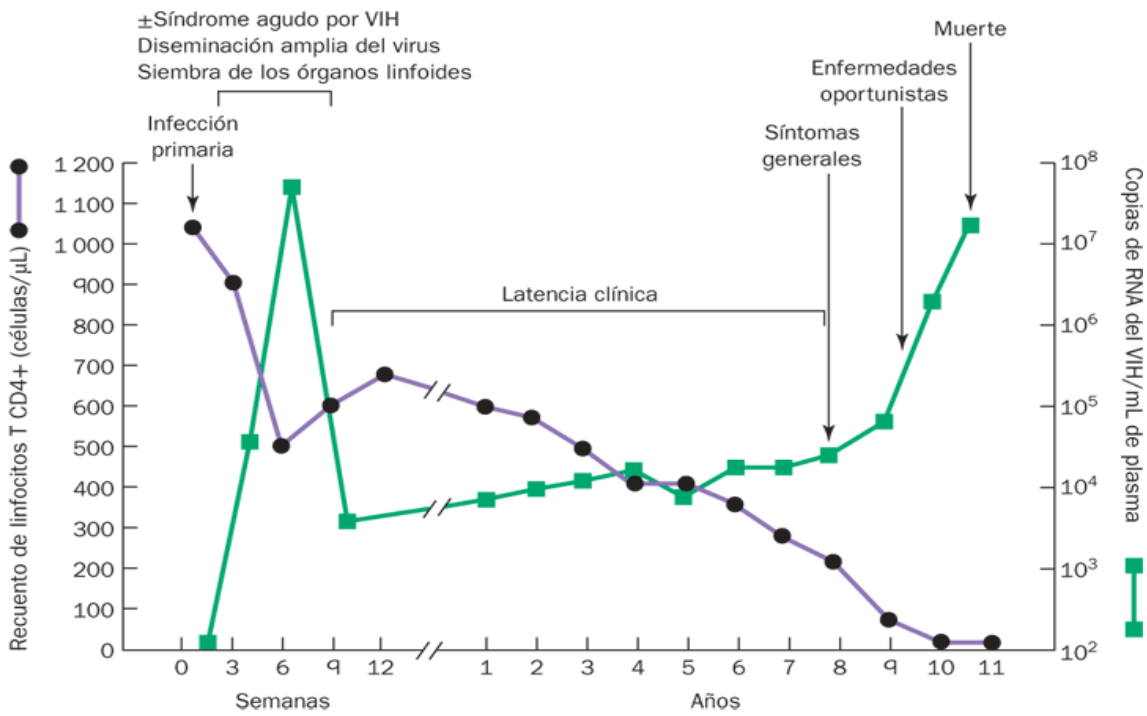
En cuanto a la patogénesis de la infección viral, esta se puede dividir en 3 fases:

1. **Infección primaria.** Durante las primeras semanas de infección, mientras el sistema inmune aprende a controlar el virus, este es capaz de replicarse de manera descontrolada disminuyendo el recuento de linfocitos T CD4+, pudiendo detectar altos niveles de viremia

(carga viral alta). En esta fase no es posible detectar anticuerpos específicos de VIH, pero sí existe una actividad citotóxica.

2. Fase asintomática. El sistema inmune desarrolla una respuesta defensiva efectiva y específica frente al virus, lo que hace que disminuya la replicación y la carga viral. Los niveles de CD4+ aumentan al comienzo de la fase y se mantienen relativamente estables, pero van descendiendo paulatinamente a medida que el paciente entra en la fase avanzada.

3. Fase avanzada o SIDA. Supone la incapacidad progresiva del sistema inmunitario para contener la replicación viral. Es una fase de replicación viral acelerada y de profunda inmunosupresión. Los niveles de linfocitos son demasiado bajos y hay un repunte de la carga viral. La enfermedad progresa y se desarrollan infecciones oportunistas graves, pudiendo desencadenar en la muerte del paciente, normalmente años después del contagio⁵. **(Figura 1)**



Fuente: J. Larry Jameson, Anthony S. Fauci, Dennis L. Kasper, Stephen L. Hauser, Dan L. Longo, Joseph Loscalzo: Harrison. Principios de Medicina Interna, 20e Copyright © McGraw-Hill Education. Todos los derechos reservados.

Figura 1. Estadios de la infección y progresión del recuento de linfocitos y la carga viral (Jameson JL, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Loscalzo J. Harrison. Principios de medicina InteARN, Editorial McGraw-Hill Education, 20ª edición, 2019).

1.4. Estructura y genoma viral

El virus VIH-1, subtipo con mayor prevalencia, es una partícula vírica esférica, de unos 100 nm de diámetro y una membrana lipídica externa que procede de la membrana plasmática de la célula infectada que rodea a la cápside proteica, la cual a su vez protege el material genético.

El genoma del VIH consiste en dos moléculas idénticas de ARN monocatenario. En cuanto al ADN del provirus VIH se genera por transcripción inversa a partir del ARN viral y se integra en el genoma humano de las células que infecta, asegurándose la multiplicación de virus cuando lo permite el estado de activación de la célula infectada⁶. Además, el virus pasa de una generación celular a la siguiente.

El genoma viral está limitado por unas secuencias repetitivas largas (LTR) o promotores génicos, que facilitan su integración en el genoma de la célula hospedadora y en los que se localizan elementos reguladores de la transcripción viral. Aunque tanto la LTR 5' como 3' pueden promover la transcripción, es la LTR 5' la que actúa como promotor del VIH-1.

En cuanto a las principales proteínas del virus de VIH, destacan las glicoproteínas gp120 (de superficie) y gp41 (transmembrana), codificadas por el gen *env* y claves en el comienzo del ciclo viral (fijación, fusión y entrada de virus en la célula), las proteínas estructurales codificadas por el gen *gag*: p24 (proteína de la cápside), p17 (proteína de la matriz) y p7 (nucleocápside), y las proteínas codificadas por el gen *pol*: transcriptasa inversa o p51 (cataliza la transcripción de ARN a ADN proviral), integrasa o p32 (cataliza la integración del ADN proviral en el genoma de la célula hospedadora), proteasa o p10 (corta las cadenas peptídicas que se sintetizan al traducir a proteínas el código genético del virus dando lugar a componentes proteicos activos del virus maduro) y ribonucleasa H o p15 (degrada el ARN viral en el complejo de replicación ARN/ADN). Las proteínas adicionales expresadas por el VIH son parte de la partícula viral (Vif, Vpr, Vpx), regulan directamente la expresión génica viral (Tat, Rev) o interactúan con la maquinaria celular para facilitar la propagación del virus (Vpu, Nef)⁷. (Figura 2)⁶

Como la mayoría de los retrovirus, el VIH posee un promotor y un sitio de poliadenilación dentro de la región larga terminal (LTR) y expresa un solo transcrito primario.

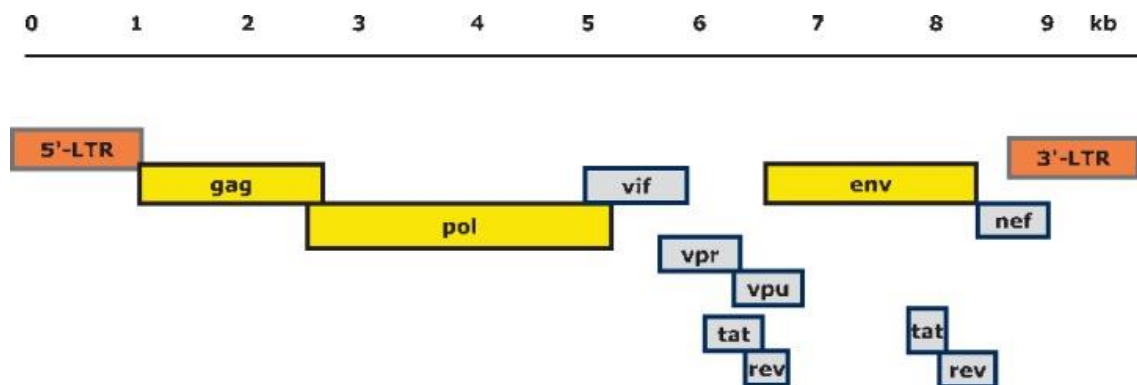


Figura 2. Estructura y organización del genoma de VIH-1 (Seitz R. *Human Immunodeficiency Virus (HIV)*. 2016).

A su vez, en estas secuencias LTR encontramos tres regiones básicas: la región *enhancer*, que contiene elementos de unión para diversos factores de transcripción (AP-1, NF-κB, NFAT, etc.), la región promotora básica, con lugares de unión para el factor SP1 y una secuencia TATA (donde se unen factores de transcripción, histonas y la ARN polimerasa II), y una región TAR, a la que se une la proteína viral Tat para incrementar inmediatamente los niveles de transcripción del ARN viral⁸.

1.5. Ciclo biológico del VIH

El ciclo viral del VIH consta de una fase temprana, que culmina con la integración del provirus en el genoma de la célula hospedadora, y una fase tardía, que implica la transcripción del genoma viral y la generación de viriones que podrán infectar a otras células, perpetuando así la infección. El ciclo se divide en varias etapas, algunas de las cuales son dianas de fármacos que se utilizan para el tratamiento de esta patología.

En primer lugar, se produce la unión del VIH a los receptores CD4 de la célula hospedadora a través de la glicoproteína gp120, proceso conocido como fijación, lo que provoca un cambio conformacional que permite la interacción con un correceptor de quimiocinas (CXCR4 en cepas X4 o CCR5 en cepas R5). Es necesaria la doble unión de gp120 con CD4 y con el correceptor para que el virus infecte a la célula. Tras ello, gracias a un cambio en gp41, esta induce la fusión de la envuelta del VIH y la membrana del linfocito CD4+ lo que permite la liberación de la cápside en el interior de la célula.

Tras la entrada, comienza la retrotranscripción, catalizada por la transcriptasa inversa, que convierte el ARN viral en ADN proviral. En la generación de la segunda cadena de ADN para formar la doble hélice también interviene la ribonucleasa H. En el proceso de retrotranscripción se da una alta tasa de errores dando lugar a cepas mutantes más patogénicas y resistentes a fármacos⁹.

A continuación, actúa la integrasa, que inserta el ADN proviral (tras desplazarse al núcleo) en el ADN de la célula hospedadora. Una vez integrado, es cuando el virus puede entrar en periodo de latencia estableciendo lo que conocemos como **reservorios virales**, replicarse de forma controlada o hacerlo de forma masiva causando un efecto citopático para la célula infectada. Para multiplicarse, el virus aprovecha la maquinaria celular y cuando se activa la expresión del VIH integrado comienza la fase tardía del ciclo, en la que el ADN proviral es transcrito y se genera ARN viral como un único transcrito, que será procesado o no, y transportado al citoplasma.

Entonces tiene lugar la traducción del ARN viral generando así proteínas virales, que deben ser procesadas postraduccionalmente antes de ser ensambladas con el genoma del virus en viriones maduros. En esta fase de maduración interviene la proteasa.

Finalmente, las proteínas y el material genético se desplazan a la membrana celular donde se recubren de la membrana lipídica y de glucoproteínas de superficie adheridas a ella y son liberados por gemación (exocitosis) en forma de virus activos infecciosos.

1.6. Reservorios virales

El VIH-1 puede establecer una infección latente en diferentes tipos de células que constituyen sus reservorios y permiten su mantenimiento en el hospedador de una manera indefinida, pues el ADN proviral puede estar transcripcionalmente silenciado. El estado de latencia es un estado de reposo reversible, en el que la célula infectada no produce activamente nuevas copias del virus de manera que permanece enmascarado en el genoma del hospedador y el sistema inmunitario no es capaz de detectarlo. Sin embargo, en cualquier momento el virus puede sufrir un proceso de reactivación y comenzar a replicarse, generando nuevos viriones que producen un rebrote de la infección cuando se cesa el tratamiento con antirretrovirales. Es, por tanto, la presencia de estos reservorios virales el principal obstáculo para la total erradicación y cura del VIH.

El reservorio celular latente de VIH-1 se cree que se establece durante la fase aguda de infección (Figura 1) y consiste principalmente en linfocitos T CD4+ memoria en estado de reposo, con una vida media de 4 o más años¹⁰. Estas células albergan provirus de VIH-1 establemente integrado y transcripcionalmente silencioso pero que es capaz de producir viriones infecciosos *de novo* si las células T CD4 + de memoria son estimuladas a través del

reconocimiento de antígenos u otros estímulos de activación. Además de estos linfocitos de memoria, también se cree que los reservorios virales puedan establecerse en células de otros tipos, como macrófagos, células dendríticas y otros linfocitos. Debido a las limitaciones técnicas para trabajar con cantidades tan pequeñas de células infectadas, prácticamente toda la información de la que se dispone sobre la latencia se refiere exclusivamente a sangre periférica, no pudiendo excluir la posibilidad de la existencia de algún reservorio latente en otras localizaciones no accesibles hasta el momento⁹, como en SNC (en la microglía cerebral), GALT o la mucosa cervical del tracto genital inferior femenino¹¹.

La latencia puede ser de dos tipos: latencia preintegración (en la que el cADN viral no se integra en el genoma del hospedador, sino que se mantiene extracromosómico como un episoma) y latencia postintegración (el ADN proviral está integrado pero no se transcribe). No obstante, se cree que la latencia preintegración tiene mucha menos importancia, ya que la semivida de las formas episomales suele ser de días¹².

Se han identificado varios mecanismos responsables del mantenimiento de la latencia¹³, que serán diana para los fármacos que buscan eliminar los reservorios:

- **Selección del sitio de integración y regulación epigenética:** El ADN de la célula hospedadora está organizado en forma de cromatina, que está a su vez enrollada alrededor de histonas, formando los nucleosomas. Según su estado de condensación, la cromatina puede adoptar dos formas: eucromatina (estado poco condensado que permite el acceso y la unión de factores de transcripción a los elementos de regulación, activándose así su expresión) y heterocromatina (estado más compacto que no permite la transcripción del ADN y la expresión de genes). En relación con la cromatina, también es clave la selección del sitio de integración del ADN proviral en el genoma hospedador. Esta integración no es aleatoria, sino que se dirige a regiones de eucromatina mediante una interacción directa entre la integrasa y la proteína LEDGF/p75 que a su vez interacciona con proteínas que se encuentran en zonas en las que el ADN está siendo transcrito activamente.
 - a) Así pues, modificaciones postraduccionales (PTM) en estas histonas van a determinar el estado de condensación de la cromatina y por tanto el nivel de transcripción del genoma (y del ADN proviral que está integrado en él). Estas pueden ser:
 - Acetilación de histonas: La acetilación de las histonas a nivel de aminoácidos de lisina (carga positiva) neutraliza sus cargas positivas, impidiendo su interacción con el ADN (carga negativa) y permitiendo la entrada de factores de transcripción, lo que la convierte en cromatina transcripcionalmente activa (histona acetiltransferasas como CBP o PCAF). Sin embargo, la latencia depende de las histona desacetilasas (HDACs), que son enzimas implicadas en la eliminación de los grupos acetilo de los residuos de lisina en las histonas, incrementando la carga positiva de las histonas y por tanto la afinidad de éstas por el ADN. Este incremento de la unión condensa la estructura del ADN, separando a los factores de transcripción del nucleosoma e impidiendo por tanto la expresión de genes, incluyendo los genes virales que se mantienen en latencia.
 - Metilación de histonas: Las consecuencias de la metilación de histonas en la transcripción del genoma depende del sitio de metilación y del número de metilaciones en cada sitio. La di o trimetilación de la lisina en posición 9 de H3 y trimetilación de la lisina 27 en H3 se ha demostrado que están aumentadas en la región

promotora de células latentes infectadas¹⁴, al igual que la monometilación de la lisina 20 en H4¹⁵.

El balance entre la acetilación y la metilación de histonas es clave en la regulación de la transcripción: cuando está activa, la acetilación está activada y la metilación impedida, y cuando la transcripción inhibida, actúan las HDACs desacetilando las histonas y las metiltransferasas se activan, reforzando el estado de latencia.

b) También están implicadas modificaciones directas en el material genético, como la metilación del ADN. Las metiltransferasas de ADN (DNMT) son enzimas responsables de la metilación en la posición 5 de citosina casi exclusivamente en dinucleótidos CpG, proceso responsable del silenciamiento de la expresión genética. Por tanto, la metilación del ADN contribuirá a la latencia del VIH-1 al impedir la transcripción. Sin embargo, un estudio de seguimiento demostró que no todos los pacientes avirémicos tenían alto grado de metilación en la LTR (repetición terminal larga) en su reservorio¹⁶. Por tanto, el papel de la metilación del ADN en el mantenimiento de la latencia de VIH-1 no es concluyente y necesita ser más estudiado.

- **Interferencia transcripcional:** Es el bloqueo de la transcripción de un gen proviral. La integración del ADN proviral en regiones de genes celulares altamente expresados (selectiva) puede darse en el mismo sentido del gen, o en sentido opuesto a este. En el caso de que la orientación del genoma proviral y el hospedador sea la misma, la ARN pol II que está transcribiendo el gen del hospedador puede desplazar factores de transcripción reclutados en el promotor proviral (LTR) o el propio complejo de pre-iniciación, causando el silenciamiento del promotor (oclusión del promotor). En el otro caso, cuando la orientación de ambos genomas es opuesta, al activarse la transcripción del gen y el provirus ambos complejos de elongación chocan, se desprenden las polimerasas y se inhibe así la producción de proteínas virales¹⁷. Sin embargo, parece que una potente activación de la LTR del VIH-1 es capaz de anular los efectos de la interferencia transcripcional independientemente de la orientación del provirus.
- **Secuestro de factores de transcripción:** La disponibilidad de factores de transcripción y su presencia en el núcleo de la célula para unirse a sus sitios en la LTR es clave para el proceso de transactivación. En este aspecto, los principales son NF- κ B, NFAT y SP1. Además, hay otros factores que cooperan en la transcripción del VIH-1, como AP-1 o C/EBP β . Por el contrario, el secuestro de estos factores en el citoplasma o la incapacidad de unirse a los elementos reguladores debido a mutaciones permite que se mantenga la latencia, porque se inhibe la transcripción génica.

Nos centramos en la función de NF- κ B, que tiene dos formas: activa o heterodimérica (p50/RelA) e inactiva u homodimérica (p50/p50). La forma activa, que es crucial para la transcripción, en un estado de latencia es secuestrada en el citoplasma mediante una fuerte unión con un inhibidor de κ B (I κ B). Asimismo, la forma inactiva se trasloca al núcleo, donde se une al sitio de κ B y recluta HDACs, lo que condensa la cromatina e impide la transcripción de genes. Cuando la célula se activa, una quinasa fosforila I κ B, liberando así p50/RelA que se trasloca al núcleo y desplaza al homodímero del sitio de unión de κ B. La forma activa recluta histona acetilasas (HATs), promoviendo la eucromatinización y la consecuente transcripción del VIH-1. Asimismo, el heterodímero activo estimula una serie de fosforilaciones mediadas por kinasas en la ARN pol II reclutando CDK7/TFHI y CDK9/P-TEFb, ayudando así a la iniciación y a la elongación de la transcripción.

Algo similar ocurre con NFAT, que se encuentra secuestrado en el citoplasma pero que cuando la célula se activa, es desfosforilado por una fosfatasa permitiendo así que pase al núcleo, se una a su sitio e induzca la transcripción, probablemente reclutando HATs (p300/CBP)¹⁸.

En resumen, la transcripción activa y la latencia del VIH-1 depende del cambio entre las formas activas e inactivas del NF- κ B y NFAT y su unión a los sitios κ B y NFAT en las LTR¹². Sin embargo, en linfocitos T CD4+ de memoria en reposo, las formas activas de estos factores de transcripción se encuentran solo en niveles muy bajos, uno de los motivos por los que estas células constituyen el principal reservorio latente¹⁹.

- **Secuestro de P-TEFb:** El factor b de elongación transcripcional positiva es un complejo multiproteico (ciclinaT1+kinasaCDK9) clave para la fase de elongación en la transcripción, liberando a la ARN pol II de su pausa transcripcional mediante una fosforilación e interacción con Tat/TAR. P-TEFb, cuando está inactivo por asociación con 7SK-snRNP, contribuye al silenciamiento génico proviral. Por ese motivo, es diana de fármacos que buscan reactivar la latencia para eliminar los reservorios virales, liberándolo de su unión a 7SK-snRNP y permitiendo que actúe.

La terapia antirretroviral combinada (cART) se basa en las distintas combinaciones de fármacos inhibidores de la transcriptasa inversa (que pueden ser nucleosídicos como abacavir, emtricitabina, lamivudina y tenofovir, o no nucleosídicos como nevirapina y efavirenz), inhibidores de la integrasa (dolutegravir, raltegravir), inhibidores de la proteasa (saquinavir, ritonavir, indinavir) e inhibidores de la entrada (enfuvirtida, maraviroc)²⁰. La cART permite controlar y evitar la replicación del virus y la infección de nuevas células, pero no tiene efecto sobre los reservorios virales en los que el virus está latente. Debido a la larga vida de las células T CD4+ de memoria, serían necesarios 70 años de ART para erradicar el virus completamente¹¹. Gracias a los antirretrovirales, el SIDA ha pasado de ser una enfermedad mortal a ser una enfermedad crónica y bien tolerada. Sin embargo, a día de hoy sigue siendo incurable, y los pacientes requieren de una terapia antirretroviral diaria de por vida, con los efectos adversos y las resistencias a largo plazo que ello conlleva.

2. OBJETIVOS

1. El **objetivo principal** de este trabajo es revisar el estado actual de la terapia farmacológica del VIH en materia de reservorios virales. Estas terapias que intentan eliminar los reservorios son clave para encontrar finalmente una cura para la infección por VIH.
2. El **segundo objetivo** es estudiar los mecanismos de acción de los distintos fármacos utilizados para la eliminación de los reservorios virales, además de sus limitaciones y sus evidencias de eficacia y seguridad obtenidas en ensayos clínicos.
3. El **tercer y último objetivo** del trabajo es el de abordar perspectivas futuras en la curación de la infección por VIH con estrategias terapéuticas prometedoras que se prevé que se utilicen en el futuro.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

En la realización de este trabajo se ha llevado a cabo una exhaustiva revisión bibliográfica de estudios y artículos disponibles en bases de datos como *PubMed*, *Google Scholar*, *sciELO* y *Medscape*, entre otras. Además, se han consultado webs de organismos de referencia en la materia como *ONUSIDA* e *InfoSIDA*, y la guía clínica sobre la infección por VIH en la *Revista de*

la Sociedad Española de Farmacia Hospitalaria. También se han consultado revistas científicas como *Nature* o *Revista de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. Para el apartado de Resultados se ha procurado que los documentos consultados fueran recientes, aportando así una información actualizada.

Para acotar y dirigir la búsqueda, las palabras clave utilizadas han sido: “HIV infection”, “viral reservoirs”, “HIV latency”, “eradication of reservoirs”, “Latency reversal agents (LRA)”, “therapeutical approaches”, “shock and kill”, “block and lock”, entre otras.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El problema de los reservorios es multifactorial, y se debe a que las células latentemente infectadas tienen larga vida, son invisibles para el sistema inmune, pueden proliferar por expansión clonal y son resistentes a la terapia antirretroviral combinada (cART). En cuanto a la cura del VIH, debemos diferenciar entre cura funcional, en cuyo caso el reservorio no es eliminado pero el sistema inmunitario es modificado permitiendo un control a largo plazo de la replicación viral en ausencia de cART, y cura esterilizante, que requiere la eliminación del reservorio viral¹⁹, objetivo precisamente de este trabajo.

En actualidad se está haciendo un gran esfuerzo en la investigación de estrategias terapéuticas para la eliminación de estos reservorios virales. En este trabajo se desarrollarán principalmente tres de ellas: “shock and kill”, “block and lock” y la escisión del ADN proviral utilizando la tecnología de edición genética (CRISPR/Cas9).

4.1. Shock and kill

Esta estrategia es la más estudiada y consiste en reactivar el virus con agentes de reversión de latencia (LRAs), de manera que el genoma del virus comienza a expresarse y puede ser detectado por el sistema inmune, lo que provocaría la muerte de estas células, bien por efecto citopático del propio virus o bien por acción de los linfocitos T citotóxicos (CTL) y células NK del sistema inmunitario del hospedador. Mientras tanto, se continúa con la cART para evitar nuevas infecciones. Sin embargo, es importante que la reactivación induzca la expresión de VIH-1 sin provocar una activación general de linfocitos T, pues esto sería tóxico.

Los LRAs, responsables de la fase “shock” de la estrategia, se dividen principalmente en los siguientes grupos, con diferentes dianas:

4.1.1. Inhibidores de histona desacetilasas (HDACis):

Las HDAC conforman la diana epigenética más avanzada en cuanto al desarrollo de inhibidores (HDACi). Al inhibirlas, se impide la interacción de las histonas con el ADN de manera que la cromatina adquiere un estado más relajado y transcripcionalmente activo, revirtiendo así la latencia.

Las HDAC se dividen en 2 categorías: las Zinc-dependientes (clase I, II y IV) y las NAD⁺-dependientes (clase III). En el mantenimiento de la latencia de VIH-1, las HDAC implicadas son las Zn²⁺-dependientes.

A su vez, los HDACis, que se utilizan principalmente para el tratamiento de distintos tipos de cáncer, se organizan en 4 familias según su estructura: ácidos alifáticos de cadena corta, ácidos hidroxámicos, benzamidas, y tetrapéptidos cíclicos y depsipéptidos (macrocielos tiólicos).

Estos inhibidores pueden ser paninhibidores o inhibidores selectivos frente a diferentes clases e isoformas.

En un estudio de Zaikos TD et al. (Universidad de Michigan) en 2017, se demostró que los HDACs selectivos de clase I solos o en combinación con agonistas de PKC inducían una mayor expresión de proteínas virales por célula infectada que los paninhibidores, porque mantenían la actividad de factores provirales (NF- κ B, Hsp90) regulados por HDACs que no fueran de clase I, necesarios para la reversión de la latencia de VIH²¹.

Ácido valproico (VPA): fármaco antiepiléptico que tiene actividad inhibidora de HDAC I y II, perteneciente a la familia de ácidos alifáticos de cadena corta. El VPA demostró revertir la latencia tanto en modelos de líneas celulares (U1 y J-LAT) como en un modelo ex vivo de linfocitos T CD4+ latentes infectados por VIH²². Su efectividad en la reactivación de la latencia y reducción del tamaño del reservorio viral es limitada y no significativa. En un estudio de Archin NM et al. de 2008, se probó la combinación de VPA con una ART estándar, obteniendo que solo en 4 de 11 pacientes se agotaron las células infectadas latentes y se redujo el tamaño del reservorio²³. Además, no se utiliza con este fin debido a su toxicidad y efectos adversos (relación beneficio/riesgo baja).

Ácidos hidroxámicos: los fármacos más estudiados de este grupo en la reactivación de la latencia viral son panobinostat y vorinostat (SAHA), utilizados también en distintas clases de leucemias y linfomas. Actúan de una manera más selectiva y potente que VPA, e inducen la hiperacetilación de los nucleosomas de la secuencia promotora, promoviendo la transcripción génica. En un estudio de 2016 llevado a cabo por Barton K y colaboradores, se demostró que el aumento en los niveles CA-US ARN (ARN asociado a células no cortado y empalmado) tras la administración de panobinostat y vorinostat se debía a una activación global de un amplio espectro de provirus latentes y no por activación selectiva de un subtipo de provirus concretos²⁴. En otro estudio de Archin NM y colaboradores de 2012 con vorinostat (SAHA), se obtuvieron resultados de activación de la transcripción y aumento de la expresión de ARN de VIH-1 *in vitro*, pero no se observó disminución en el tamaño del reservorio ni aumento de linfocitos específicos frente a VIH (gag)²⁵. En cuanto al panobinostat, es un paninhibidor 10 veces más potente que vorinostat, y ha demostrado activar la expresión del VIH y aumentar los niveles de ARN viral *in vitro* en líneas celulares infectadas (ACH2 y UI). Aunque aumenta los niveles de acetilación de histonas, no afecta de una manera significativa a los niveles celulares de ARN y ADN de VIH-1, ni a los linfocitos T CD4+ en reposo infectados en latencia (según un estudio de 2016 de Tsai P y colaboradores con ratones humanizados BLT *in vivo*)²⁶. Otro ejemplo de ácido hidroxámico es el givinostat, que induce la transcripción de VIH en linfocitos T latentes y en monocitos, y reduce la expresión de los correceptores CXCR4 y CCR5 en la superficie de linfocitos T CD4+ primario (dificultando la infección en la fusión y entrada del virus)²⁷.

Benzamidas: Representadas principalmente por el entinostat, que es selectivo frente a HDAC de clase I (la más relevante a nivel de VIH-1) por lo que se cree que puede ser más efectivo y menos tóxico. Induce la expresión de VIH en modelos de líneas celulares latentes infectadas (ACH2 y J-Lat) y en modelos de linfocitos T CD4+ primarios, pero requiere de más estudios y ensayos clínicos para demostrar su efectividad y seguridad²⁸

Tetrapéptidos cíclicos y depsipéptidos: La romidepsina es el inhibidor de HDAC más potente según los estudios *ex vivo* realizados, dirigido a HDAC de clase I y no carcinogénico (Test de Ames negativo). Es un compuesto natural producido por *Chromobacterium violaceum*, y está aprobado como antineoplásico. En un estudio de 2014 llevado a cabo por Wei DG et al., la romidepsina indujo la expresión VIH-1 tanto en linfocitos T CD4+ en reposo como de memoria

aislados de pacientes infectados por VIH en terapia antirretroviral combinada, un aumento superior al inducido por vorinostat²⁹. Sin embargo, en un ensayo clínico de 2015 (Søgaard Ole S et al.) se observaron aumentos en la transcripción viral y en los niveles plasmáticos de ARN viral, pero el tamaño del reservorio viral se mantuvo estable. Aumentó la activación de los linfocitos T, tanto CD4+ como CD8+, y la respuesta de los linfocitos T frente al estímulo antigénico tampoco varió, descartando la hipótesis que postulaba que la romidepsina provocaba una disfunción de los linfocitos T lo que comprometería la eliminación de las células productoras de virus³⁰.

Recientemente se ha probado el **Fimepinostat**, un inhibidor dual de HDAC y PI3K (fosfatidilinositol-3-kinasa), en un estudio de 2019 llevado a cabo por Gundst J et al. Se comparó con panobinostat y romidepsina (el más potente hasta la fecha), y los resultados obtenidos fueron prometedores: se mostró como un potente agente de reversión de la latencia en 2 líneas celulares infectadas en latencia *in vitro*, y en linfocitos T CD4+ aislados de pacientes VIH+ *ex vivo*. En dosis terapéuticas, la potencia es similar a la mostrada por la romidepsina, pero fimepinostat no indujo la activación y proliferación de linfocitos T, evitando la toxicidad asociada a ello³¹. Esto demuestra que el fimepinostat tiene mucho potencial como LRA pero se necesita más investigación detallada al respecto.

No obstante, hasta la fecha ningún HDACi ha demostrado, en monoterapia, ser eficaz en la reducción del tamaño del reservorio viral de VIH-1 de manera significativa.

4.1.2. **Agonistas de PKC (proteína kinasa C):**

Estos fármacos, como agonistas de la PKC que imitan al diacilglicerol, actúan liberando a NF- κ B y a p-TEFb de sus complejos inactivos, lo que lleva a una activación de la transcripción del genoma viral de VIH-1. Cuando la PKC se activa provoca la fosforilación de varias proteínas, incluyendo el I κ B, que se libera y se degrada en el proteasoma, dejando libre al heterodímero activo de NF- κ B. Este se trasloca al núcleo y se une a zonas específicas de la LTR, actuando como factor de transcripción y activando la expresión del VIH latente. Los representantes más estudiados de este grupo de fármacos son la **briostatina-1**, la **prostatina** y el **ingenol-B**. Son potentes reactivadores de la latencia del VIH, y los únicos LRAs que tiene efecto en todas las líneas celulares modelo de latencia y *ex vivo* en linfocitos obtenidos de pacientes infectados por VIH-1. De acuerdo con estudios recientes, solo la briostatina-1 ha demostrado eficacia induciendo la producción de mARN de VIH-1 en células obtenidas de pacientes infectados tratados con cART³². Además, solo la briostatina-1 ha sido probada en un ensayo clínico en humanos (Gutiérrez et al., 2016) para la erradicación del VIH-1, sin demostrar eficacia en reducir el tamaño del reservorio (ni cambios en el ARN viral asociado a células). También en este ensayo se testó la seguridad de la briostatina-1, sin reportarse efectos adversos en ninguno de los pacientes³³. En cuanto a la prostatina (un éster de forbol), activa la expresión del VIH-1 latente en células T J-Lat y en células mononucleares de sangre periférica de pacientes VIH-1 positivos en terapia antirretroviral, pero no ha sido probada *in vivo*. Además, no induce la proliferación celular ni la generación de tumores, a diferencia de otros fármacos de este grupo como PMA. No obstante, tiene algunos problemas asociados a un aumento de la expresión de marcadores de activación como CD69 y CD25. Algo que comparten todos los fármacos de este grupo, es que inhiben la infección *de novo* por VIH-1 porque provocan una regulación a la baja del receptor de superficie CD4 y los correceptores CCR5 y CXCR4. Otro problema asociado a los agonistas de PKC es la toxicidad provocada por liberación sistémica de citoquinas proinflamatorias debido a la inducción no específica de distintos genes y activación de linfocitos T³⁴. Con vistas a evitar este efecto tóxico, se deberá estudiar la

administración de fármacos que activen las isoformas de la PKC que inducen solo la expresión de genes provirales y no de citoquinas inflamatorias, así como de fármacos inmunosupresores como el inhibidor de Jak ruxolitinib (co-administrado con ingenol-3,20-dibenzoato)³⁵ o inhibidores de mTOR como rapamicina³⁶, lo cual reduce la liberación de citoquinas proinflamatorias sin afectar a la reversión de la latencia del genoma proviral. Con respecto al ingenol-B, ha sido probado en un ensayo con primates en combinación con vorinostat (Gama L et al., 2017), mostrando un aumento en la carga viral de VIS (Virus de Inmunodeficiencia en Simios) tanto en el SNC como en la periferia en uno de los dos macacos Rhesus a los que se les administró, además de un aumento de marcadores de inflamación³⁷. Este, tampoco ha sido probado *in vivo* en humanos.

Los agonistas de PKC presentan un efecto sinérgico cuando son administrados en combinación con HDACis y el inhibidor de bromodominios JQ1. Asimismo, con esta estrategia se reducen los efectos tóxicos asociados a ambos fármacos pues la dosis administrada de cada fármaco para conseguir la misma eficacia disminuye. De hecho, en un estudio de 2019 de Grau-Expósito J et al., se estudió el impacto de diversas familias de LRAs como HDACis y agonistas de PKC, usados en monoterapia y en combinación, y su capacidad para activar la transcripción viral en linfocitos T CD4+ aislados de pacientes VIH-positivos avirémicos en tratamiento con cART. Los resultados dilucidaron que todos los LRAs probados aumentaban la proporción de células con ARN de VIH-1. Utilizados en monoterapia, ingenol (más eficaz y menos tóxico *in vitro* que el resto de agonistas de PKC), romidepsina y panobinostat son los reactivadores más potentes. De igual manera, la combinación romidepsina+ingenol (efecto sinérgico) es la mejor para reactivar el virus latente en las células, con mayor proporción de células que expresan ARN viral, mayor expresión de ARN de VIH-1 en plasma y mayor producción de proteína p24 tras la traducción del ARN. De forma paralela, se demostró un antagonismo en el uso combinado de panobinostat e ingenol, tanto en células expresando ARN de VIH-1 como en la producción de p24. En cuanto a las distintas subfamilias de linfocitos T CD4+, la transcripción en todas ellas está más activada por la administración de romidepsina+ingenol, a excepción de las células T progenitoras de memoria (T memory stem cells) que solo responden significativamente a la combinación panobinostat+briostatina-1. Las células más susceptibles a los LRAs son los linfocitos T de memoria central y los vírgenes (naive), mientras que los linfocitos T progenitores de memoria son los más resistentes a la reactivación del virus³⁸. Tampoco los agonistas de PKC han demostrado una reducción significativa del tamaño del reservorio viral, administrados en monoterapia.

4.1.3. Inhibidores de histona y ADN metiltransferasas (HMTis y DNMTis):

Las metiltransferasas de histonas y las metiltransferasas del ADN son enzimas con un papel importante en la regulación epigenética del genoma proviral, y por tanto son dianas interesantes para la reactivación de la latencia y eliminación de reservorios.

A diferencia de la acetilación, la metilación de las histonas regula las propiedades estéricas e hidrofóbicas de las histonas, lo que está relacionado con activación o represión de la transcripción génica. Generalmente, los puntos de metilación más importantes son lisinas en las histonas 3 y 4. La metilación en H3K4, H3K36, y H3K79 está asociada a eucromatina (transcripción activa), mientras que en H3K9, H3K27, y H4K20, a heterocromatina (silenciada). Suv39h1 y G9a son HMTs que participan principalmente en la tri y dimetilación de H3K9 respectivamente, por lo que los ***inhibidores de HMTs*** son potencialmente útiles en la reversión de la latencia pudiendo estimular la reactivación proviral del VIH-1 por HDACis como

vorinostat (sinergia). En este aspecto, podemos mencionar dos fármacos: BIX01294 (inhibe G9a), que fue el primero en demostrar reactivar la latencia del VIH-1 *in vitro*, y Caetocina (inhibe Suv39h1). Ambos han demostrado revertir la latencia y activar la transcripción del VIH-1 en diferentes líneas celulares infectadas en latencia, así como en linfocitos T CD4+ de memoria en reposo obtenidos de pacientes infectados, pero no pueden ser administrados de una manera segura en humanos. Por ello, requieren más estudio y aún no han sido incluidos en ningún ensayo clínico³⁶. Epigenéticamente también es importante EZH2, una HMT que cataliza la trimetilación de H3K27. La inhibición de EZH2 provoca la disminución de los niveles de H3K27me3 y reactiva la latencia del VIH-1 de una manera más potente que al inhibir Suv39h1 y G9a³⁹. Destacamos en este caso el inhibidor DNZep, de más amplio espectro y más potente reactivando los reservorios virales de la latencia que los dos anteriores. Sin embargo, a las concentraciones necesarias para eliminar el reservorio latente del VIH-1, es citotóxico. Otros inhibidores de EZH2 destacables son los derivados de piridona 6 (EPZ-6438, GSK126 y 343, etc.), que han entrado en ensayos clínicos para el tratamiento de diversos tipos de cáncer, pero aún no para la erradicación de los reservorios de VIH-1. Es un campo, por tanto, abierto para el estudio en un futuro³⁶.

En cuanto a los **inhibidores de DNMTis** (agentes hipometilantes), actúan como falsos metabolitos, se incorporan al ADN como desoxinucleótidos y capturan a las DNMTs, impidiendo que continúen actuando. Algunos de ellos se están utilizando en el tratamiento de síndromes mielodisplásicos como azacitidina y decitabina o 5-azadC. 5-azadC ha demostrado inducir la reactivación de la latencia de VIH-1 de una manera débil en monoterapia, pero muestra sinergismo en combinación con HDACis, activando la expresión y producción de VIH-1 en líneas celulares de linfocitos T infectados en latencia *in vitro* y *ex vivo* en cultivos de PBMCs deplecionados de CD8+ y en linfocitos T CD4+ en reposo de pacientes VIH+ avirémicos en cART. La combinación 5-azadC+panobinostat y 5-azadC+romidepsina mostró potencial reactivador de la latencia a concentraciones inferiores a las tolerables por humanos en un estudio de 2016 de Bouchat S y colaboradores⁴⁰, lo que le puede otorgar un futuro prometedor. No obstante, este es un mecanismo mutagénico por lo que puede generar un peligro para el genoma del propio hospedador, y requiere más estudio pues el papel de la metilación del ADN en la latencia del VIH-1 está todavía en debate.

4.1.4. Inductores de P-TEFb e inhibidores de BET:

El P-TEFb es un factor imprescindible para que se produzca la fase de elongación en la transcripción. Se encarga de catalizar la fosforilación de la ARN pol II (y de los factores NELF y DSIF, que en estado de latencia están bloqueando la transcripción), liberándola de su pausa transcripcional. Así pues, los **activadores o inductores directos de P-TEFb** estimulan la transcripción y expresión del genoma, y por tanto potencialmente pueden ser utilizados como LRAs. Como representante de este grupo de fármacos podemos mencionar a HMBA (hexametileno bisacetamida), que induce la liberación del P-TEFb de su unión con HEXIM1 y 7SK-snRNP y estimula la expresión del genoma proviral de VIH-1 en linfocitos T CD4+ obtenidos de pacientes avirémicos en cART. El reclutamiento de P-TEFb a la LTR es mediante una interacción con el factor de transcripción SP1⁴¹.

Las proteínas BET (Bromodomain and Extra Terminaldomain) constituyen una familia de proteínas nucleares compuesta por los miembros Brd2, Brd3, Brd4 y Brdt, que actúan como “lectores” de cromatina. Presentan 2 bromodominios muy conservados capaces de reconocer

los residuos de lisina acetilados de las histonas H3 y H4. Aunque en condiciones normales BRD4 ayuda a la expresión del genoma del VIH-1 reclutando al P-TEFb (se une al PDI) a los promotores celulares, cuando la célula está infectada sobreexpresa el dominio de interacción con P-TEFb (PDI). En este caso, BRD4 secuestra al P-TEFb, inhibiendo la transactivación de LTR viral mediada por Tat (reprime la expresión del virus)⁴². Como **inhibidores de BET** (inductores de la liberación de P-TEFb a fin de cuentas) destacamos el **JQ1**, que bloquea la interacción de P-TEFb con BRD4 y estimula su liberación del complejo inhibitorio, pudiendo entonces ser reclutado por Tat y unirse al promotor viral induciendo la reactivación. En un estudio de 2012 (Banerjee C et al.) mostró eficacia reactivando provirus latentes en células J-Lat y ACH2, e indujo la expansión del virus en cultivos de linfocitos T CD4+ en reposo en latencia en 1 de 3 pacientes VIH+ avirémicos en tratamiento cART. Además, inhibió la activación y proliferación de linfocitos T sin efecto citotóxico⁴³. También muestra efecto sinérgico al combinarlo con HDACis y agonistas de PKC³⁶. Otros ejemplos de inhibidores de BET son: **I-BET, I-BET151, OTX015, RVX-208 y PFI-1** (estos dos últimos fueron probados en un estudio de 2017 de Lu P et al., reactivando la latencia de VIH-1 en linfocitos T Jurkat infectados por VIH-1 en latencia *in vitro* y en linfocitos T CD4+ en reposo de pacientes en cART *ex vivo*, sin provocar una activación inmune sistémica⁴⁴).

No obstante, todavía no se han realizado ensayos clínicos o estudios *in vivo* en humanos, por lo que su eficacia y posible toxicidad en terapia aún son desconocidas.

4.1.5. **Otros LRAs:**

Disulfiram: Fármaco que se utiliza para el tratamiento del alcoholismo crónico. Su mecanismo de acción con respecto a los reservorios virales no es del todo conocido, pero se cree que reduce los niveles de proteína PTEN, lo que resulta en un aumento en la fosforilación de proteína quinasa B (Akt) y activación de su ruta de señalización, que estimula la transcripción viral a través de NF-kB. Como es un fármaco que lleva décadas utilizándose para otra indicación, su seguridad está contrastada. Según un estudio de 2013 de Doyon G et al., reactivó la expresión de VIH-1 en la línea celular U1, pero no en ACH2 ni J89GPF (no expresan PTEN)⁴⁵. En los dos ensayos clínicos en los que ha sido testado, disulfiram no ha demostrado reducir el tamaño del reservorio ni tener eficacia suficiente en monoterapia⁴⁶.

Interleucinas y factores de crecimiento: En los primeros estudios en los que se buscaba eliminar los reservorios de VIH-1, se probaron citoquinas como IL-2, IL-7 e IL-15, capaces de reactivar la expresión proviral activando linfocitos T CD4+, pero que no afectaron al tamaño del reservorio en monoterapia. En combinación, IL-2 y anticuerpos anti CD3 redujeron significativamente el tamaño del reservorio, pero con una toxicidad demasiado elevada⁴⁷.

En este grupo de fármacos podemos incluir el recientemente estudiado **N-803** (McBrien JB et al., 2019), un superagonista de IL-15, que combinado con un agotamiento de linfocitos T CD8+ (con el anticuerpo anti-CD8 α MT807R1), mostró una reactivación robusta y significativa del virus *in vivo* en macacos Rhesus infectados con VIS en cART (viremia >60 copias/ml en el 100% de los individuos y el 73.2% de las muestras obtenidas cada semana tras la administración de N-803) y en ratones BLT humanizados. En co-cultivo de linfocitos T CD4+ humanos infectados por VIH-1 en latencia y linfocitos T CD8+, la reversión de la latencia *in vitro* inducida por N-803 se bloqueó. Esto prueba la existencia de un mecanismo de mantenimiento de la latencia o inhibición de la reactivación desconocido hasta la fecha mediado por linfocitos T CD8+, pues N-803 solo conseguía reactivar la latencia en ausencia de estas células⁴⁸.

Agonistas de TLR: Los TLRs son receptores presentes en células del sistema inmune innato que reconocen PAMPs. Sus agonistas estimulan la replicación viral y revierten la latencia mediante la activación de los factores NF- κ B y AP1, que dejan de estar secuestrados en el citoplasma y se traslocan al núcleo para unirse a sus elementos de respuesta en los promotores y activar la transcripción. Algunos de los agonistas de TLR estudiados para su aplicación en la infección por VIH-1 son: flagelina (potente estimulador de TLR-5, reactiva el VIH-1 latente en linfocitos T CD4+ de memoria central en reposo⁴⁹), Pam3CSK4 (agonista de TLR-1/2, reactiva la latencia en un modelo *in vitro* y en linfocitos T CD4+ en reposo de pacientes avirémicos, sin activación ni proliferación de linfocitos T⁵⁰), MGN1703 (agonista de TLR9, estimula la transcripción proviral en linfocitos T CD4+ e induce potentes respuestas antivirales mediadas por células NK (posible efecto dual), además de tener un buen perfil de seguridad y tolerabilidad frente a otros agonistas TLR-9. Esto indica que puede ser incluido en ensayos clínicos en un futuro próximo⁵¹) y GS-9620 (agonista de TLR-7, induce la expresión de VIH-1 en PBMCs de pacientes VIH+ en cART, activa los linfocitos T específicos de VIH-1 y estimula la eliminación de células infectadas por VIH-1 mediada por anticuerpos⁵²). Algunos ligandos de TLR-8 como CL75 o pU/pLA están en estudio con este propósito⁵³.

Miméticos de SMAC: La proteína SMAC es uno de los principales activadores de la muerte celular y es lanzada desde las mitocondrias para promover la apoptosis de células dañadas o anómalas en un entorno estresante. Los fármacos de este grupo activan la vía no canónica del NF- κ B, que estimula la transcripción de una manera lenta pero persistente y duradera. Actúan inhibiendo las proteínas celulares inhibitoras de apoptosis 1 y 2 (cIAP1, cIAP2), de forma que se acumula la quinasa inducida por NF- κ B (NIK) y se procesa p100 a p52. RelB/p52 entonces se puede traslocar al núcleo y activar la transcripción. Al imitar a la proteína SMAC estimulan también la apoptosis de las células VIH+ en latencia, adquiriendo importancia a su vez en la fase “kill” de la estrategia. Podemos mencionar el birinapant, el SBI-0637142⁵⁴ y el recientemente estudiado AZD5582 (Nixon C et al., 2020). En este estudio, el AZD5582 fue probado en macacos Rhesus VIS+ y en ratones BLT humanizados, y mostró pocos y transitorios efectos secundarios además de un incremento significativo en los niveles de ARN viral (VIH y VIS) tanto en plasma como en linfocitos T CD4+ en reposo de todos los tejidos analizados de los ratones BLT y de los ganglios linfáticos de los macacos Rhesus. Estos resultados otorgan una evidencia *in vivo* de reversión de la latencia de linfocitos T CD4+ en reposo provocada por AZD5582. Aunque el uso de AZD5582 no está aún optimizado para humanos y es necesaria más investigación al respecto, estos resultados convierten a la activación de la vía no canónica de NF- κ B en una estrategia prometedora para la eliminación de los reservorios virales, siempre junto con las herramientas necesarias para la eliminación sistémica de la infección persistente por VIH-1⁵⁵.

Benzotriazoles: Bloquean la sumoilación de STAT5 fosforilado, lo activan y aumentan la ocupación de LTR 5'. Reactivan la latencia de VIH-1 de manera dosis-dependiente *in vitro* (en un modelo de latencia de células primarias) y *ex vivo* (en células de donantes avirémicos en cART), sin producir proliferación celular, activación de linfocitos T ni liberación masiva de citoquinas (en presencia de IL-2)⁵⁶. Ejemplos: 1-hidroxibenzotriazol (HOBt), HODHBt, etc.

Inhibidores de *immune checkpoints* (ICPis): Estos fármacos son anticuerpos monoclonales que están cobrando mucha importancia en la actualidad para el tratamiento de diversos tipos de cáncer. Las proteínas *immune checkpoints* actúan como reguladores negativos del sistema inmune disparando cascadas inmunosupresoras, y su expresión aumenta en el caso de la

infección crónica persistente por VIH-1. Estos *immune checkpoints* están representados por moléculas como PD-1 o CTLA-4, y por tanto los anticuerpos frente a estas moléculas (inhibidores) mejoran la respuesta inmune facilitando así la eliminación de las células infectadas (vía estimulación de linfocitos T CD8+ VIH-específicos) previa reactivación de la latencia. Son especialmente interesantes debido a que los *immune checkpoints* se establecen preferentemente en células infectadas en latencia, por lo que la terapia puede ir más dirigida a las células del reservorio⁵⁷. El bloqueo de PD-1 con anticuerpos monoclonales como pembrolizumab activa la producción viral *ex vivo* en PBMCs sin CD8 ni CD56 de pacientes con VIH-1 en cART, en combinación con briostatina, sin activación ni proliferación de linfocitos T (según un estudio de 2019 de Fromentin R et al.). Sumado a ello, en un paciente tratado con pembrolizumab para el tratamiento de un melanoma metastásico, VIH+ y en cART, se observó una disminución progresiva en el ADN de VIH-1 tanto total como integrado así como en el ARN viral asociado a células *in vivo*⁵⁸. El caso del nivolumab (anticuerpo antiPD-1) es el único en el que se ha observado una clara y sostenida reducción en el tamaño del reservorio de VIH-1 *in vivo*, en un paciente tratado de cáncer de pulmón. Esto se debe a dos mecanismos sinérgicos: reactivación de la replicación del VIH en linfocitos T CD4+ junto con una activación de los linfocitos T y una recuperación de la función de los linfocitos T CD8+ VIH-específicos, que destruyen a las células que producen VIH-1⁵⁹. Esto le da a los ICPis una especial importancia en estudios futuros, pues participan tanto en la fase de reactivación (*shock*) como en la de estimulación de la muerte de células que expresan el virus (*kill*).

Algunas de las **limitaciones** de esta terapia de “**shock and kill**” son que los LRAs no actúan en macrófagos y células de la microglía o que no son capaces de reactivar todos los provirus que pueden replicarse, así como la presencia de santuarios virales anatómicos como el SNC donde los LRAs y CTLs tienen menos acceso y por tanto menos eficacia¹². Tras la reactivación de la latencia, llega el turno de la **fase “kill”** en la que se eliminan las células infectadas. Parece que no es suficiente con los LRAs, por lo que se pueden adoptar **estrategias** como la pre-estimulación del sistema inmune con bnABs (anticuerpos neutralizantes de gran espectro), que se dirigen específicamente a las células infectadas por VIH-1, se unen a la envuelta viral y activan la respuesta de los CTL (linfocitos citotóxicos), con agonistas de TLR, ICPis o con vacunas terapéuticas, o como la sensibilización del virus a la apoptosis con antagonistas del factor antiapoptótico Bcl2, induciendo la muerte celular en las células infectadas¹³.

4.2. Block and lock

Esta estrategia previene la reactivación de la latencia, siendo un intento de conseguir la cura funcional para la infección por VIH (silencia permanentemente la transcripción proviral y evita el rebote). Consiste en el uso de **agentes promotores de la latencia** (LPAs), que son moléculas que bloquean la región promotora del VIH-1 (*block*) y por tanto impiden la transcripción de los provirus en el genoma hospedador (*lock*). Buscan entrar en un estado profundo de latencia e impedir la reactivación. Algunos ejemplos de LPAs son: inhibidores de Tat (dCA), inhibidores de FACT (curaxina 100), inhibidores de HAT y HDM, de NF-kB (inhiben Hsp90), de CDK9, de NFAT, de ciclina T1 o de mTOR, levosimendan y espironolactona (aprobados por la FDA), entre otros^{12,13}. Esta terapia se caracteriza por ser de fácil administración y relativamente de bajo coste. Como estrategia prometedora, el siguiente paso sería llevarla a modelos *in vivo* y a ensayos clínicos en los que poder valorar sus efectos en los reservorios latentes y posibles efectos secundarios *in vivo*⁶⁰.

4.3. Escisión de ADN proviral (gene-editing technology)

Esta técnica se basa en el uso de un ARN guía (gARN) que reconoce y genera mutaciones en el ADN del genoma del VIH-1 utilizando el sistema de edición genética CRISPR/Cas9, más sensible y específico que otros sistemas que utilizan TALENs o ZFNs. El gARN reconoce y se une a la secuencia complementaria del ADN proviral integrado (diana), se rompe y abre la doble cadena de ADN y la endonucleasa Cas9 corta y elimina el fragmento de ADN proviral. Así, cambiando la secuencia del extremo 5' del gARN se consigue dirigir el ataque y se consigue especificidad hacia la diana⁶¹. Se puede dirigir hacia genes cruciales del VIH-1 o directamente a las secuencias promotoras LTR, cuya escisión doble conlleva la eliminación del ADN proviral completo. Además, puede eliminar tanto secuencias virales codificantes como no codificantes, en estado de pre-integración o ya como provirus integrado. Otra de las ventajas de esta técnica es que inmuniza frente a posibles infecciones futuras por VIH-1. Tras la escisión, la célula tiene que reparar el ADN, bien mediante NHEJ o DSB recombinación homóloga. La reparación por NHEJ suele introducir errores y mutaciones que inactivan al virus, pero actúa principalmente en el genoma proviral y no en el genoma hospedador, por lo que los efectos tóxicos y off-target son mínimos¹². Este sistema ha demostrado buenos resultados *in vitro* en células T Jurkat infectadas con VIH-1⁶² y en células madre hematopoyéticas pluripotenciales humanas de un modelo de reservorio de VIH-1⁶³. También ha mostrado eficacia eliminando el ADN proviral de células del linaje mieloide (reservorio en cerebro), dirigida a la región U3 del promotor LTR del VIH⁶⁴. Por último, en un estudio *in vivo* con ratas y ratones transgénicos, demostró capacidad para escindir y eliminar el ADN de VIH-1 integrado⁶⁵. Sin embargo, todavía no ha sido testado *in vivo* en humanos, por lo que serán necesarios ensayos que den prueba de su eficacia y seguridad antes de convertirse en una estrategia terapéutica aplicable en la práctica clínica.

El problema de esta técnica, al igual que sucede con los trasplantes alogénicos de médula ósea de donantes homocigotos para la mutación CCR5Δ32 (técnica utilizada en los pacientes de Londres y de Berlín, únicas dos curaciones de la infección por VIH-1 hasta la fecha, aunque el objetivo del trasplante era el de tratar y curar un cáncer), es que es cara y requiere tecnología avanzada y especializada.

5. CONCLUSIONES

1. En la perspectiva actual se contemplan varias estrategias farmacológicas para la eliminación de los reservorios virales, siendo la técnica "shock and kill" la más estudiada, y de hecho la única que ha sido sometida a ensayos clínicos en humanos. Sin embargo, ninguno de los fármacos utilizados como LRAs han inducido una reducción considerable en el tamaño del reservorio, lo que indica que a día de hoy todavía hace falta mucha investigación al respecto.
2. Con respecto a los mecanismos de acción de los LRAs, se dirigen principalmente a dianas epigenéticas, factores de transcripción y proteínas relacionadas con el grado de activación del sistema inmune y con la apoptosis. Los problemas de seguridad de esta estrategia terapéutica son debidos a liberación masiva y sistémica de citoquinas proinflamatorias, a la indeseable activación y proliferación de linfocitos T, o a la mutagenicidad de ciertos mecanismos de acción.

La práctica totalidad de los LRAs utilizados son más eficaces y seguros en combinación, presentando un efecto sinérgico. Tras la reactivación, parece que es necesario ayudar a la fase *kill* estimulando la respuesta inmune (CTLs o células NK) o promoviendo la apoptosis de las células infectadas. Muchos fármacos han demostrado reactivar la latencia del VIH-1 tanto *in vitro* como *ex vivo* e incluso en algunos casos *in vivo* en ratones y simios, pero únicamente el nivolumab ha demostrado reducir el tamaño del reservorio viral en un paciente humano.

3. Con vistas al futuro, la estrategia de "block and lock" y sobre todo el sistema CRISPR/Cas9 para la escisión del ADN proviral han obtenido resultados prometedores en la eliminación de los reservorios de VIH-1 *in vitro* y *ex vivo*, y se prevé que sean importantes en la terapéutica de los próximos años, cuando sean incluidos en ensayos clínicos y testados en humanos.

6. BIBLIOGRAFÍA

- ¹ Hoja informativa — Últimas estadísticas sobre el estado de la epidemia de sida. ONUSIDA. Consultado a 10 de marzo de 2020. Disponible en: <https://www.unaids.org/es/resources/fact-sheet>
- ² Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades, 2019. Consultado a 10 de marzo de 2020. Disponible en: <https://www.cdc.gov/hiv/spanish/basics/transmission.html>
- ³ Cortés S. Esteban. HIV: Acute infection, screening and management. Revista Médica Clínica Las Condes Volume 25, Issue 3, May 2014, Pages 419-424.
- ⁴ Visión general de la infección por el VIH, 2019. InfoSIDA. National Institutes of Health of the USA. Consultado a 11 de marzo de 2020. Disponible en: <https://infosida.nih.gov/understanding-hiv-aids/fact-sheets/19/45/vih-sida--conceptos-basicos>
- ⁵ Codina C, Martín M T, Ibarra O. La infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (Cap 21). Sociedad Española de Farmacia Hospitalaria, 2002. Tomo 2: 1493-1516.
- ⁶ Seitz R. Human Immunodeficiency Virus (HIV). PubMed, 2016 May 9; 43(3): 203–222.
- ⁷ Santana A, Domínguez C, Lemes A, Molero T, Salido E. Biología celular y molecular del virus de inmunodeficiencia humana (VIH). Revista de Diagnóstico Biológico (sciELO), vol.52 no.1 ene/mar 2003
- ⁸ López Huertas MR. Regulación de la expresión del VIH-1 por la modulación de nfkb/ikba. Modificaciones celulares inducidas por la proteína tat del VIH-1. Universidad Autónoma de Madrid. Departamento de Biología Molecular (UAM_Biblioteca). 2008.
- ⁹ Soto Ramírez L. Mecanismos patogénicos de la infección por VIH. Revista de investigación Clínica (sciELO), vol.56 no.2 México abr. 2004.
- ¹⁰ Delgado R. Características virológicas del VIH. Revista de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 2011; 29 (1): 58-65.
- ¹¹ Cantero-Pérez J et al. Resident memory T cells are a cellular reservoir for HIV in the cervical mucosa. Nature Communications (2019) 10:4739.
- ¹² Castro-Gonzalez S, Colomer-Lluch M, Serra-Moreno R. Barriers for HIV Cure: The Latent Reservoir. AIDS Res Hum Retroviruses. 2018 Sep 1; 34(9): 739–759.
- ¹³ Jean M, Fiches G, Hayashi T, Zhu J. Current Strategies for Elimination of HIV-1 Latent Reservoirs Using Chemical Compounds Targeting Host and Viral Factors. AIDS Res Hum Retroviruses. 2019 Jan 1; 35(1): 1–24.
- ¹⁴ Friedman J, Cho WK, Chu CK, et al.: Epigenetic silencing of HIV-1 by the Histone H3 Lysine 27 methyltransferase enhancer of Zeste 2. J Virol 2011; 85: 9078–9089.
- ¹⁵ Boehm D, Jeng M, Camus G, et al.: SMYD2-mediated histone methylation contributes to HIV-1 latency. Cell Host Microbe 2017; 21:569–579.e6.
- ¹⁶ Blazkova J, Murray D, Justement JS, et al.: Paucity of HIV ADN methylation in latently infected, resting CD4+ T cells from infected individuals receiving antiretroviral therapy. J Virol 2012; 86: 5390–5392.
- ¹⁷ Arcia Anaya ED, Montoya Guarín CJ, Rugeles López MT. Reservorios del virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1): mecanismos de latencia y estrategias terapéuticas. Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. IATREIA Vol 27(3): 320-329, julio-septiembre 2014.

- ¹⁸ García-Rodríguez C, Rao A: Nuclear factor of activated T cells (NFAT)-dependent transactivation regulated by the coactivators p300/CREB-binding protein (CBP). *J Exp Med* 1998; 187: 2031–2036.
- ¹⁹ Sengupta S, Siliciano R. Targeting the latent reservoir for HIV-1. *Immunity*. 2018 May 15; 48(5): 872–895.
- ²⁰ Terapia antiretroviral (TARV). InfoRED SIDA, 2014. Hoja 403. Consultado a 28 de marzo de 2020. Disponible en: http://www.aidsinfonet.org/fact_sheets/view/403?lang=spa
- ²¹ Zaikos TD, Painter MM, Sebastian Kettinger NT, Terry VH, Collins KL. 2018. Class 1- selective histone deacetylase (HDAC) inhibitors enhance HIV latency reversal while preserving the activity of HDAC isoforms necessary for maximal HIV gene expression. *American Society for Microbiology: J Virol* 92:e02110-17.
- ²² Reuse S, Calao M, Kabeya K, et al. Synergistic activation of HIV-1 expression by deacetylase inhibitors and prostratin: implications for treatment of latent infection. *PLoS One*. 2009; 4:e6093.
- ²³ Archin NM et al. Valproic acid without intensified antiviral therapy has limited impact on persistent HIV infection of resting CD4+ T cells. *AIDS*. 2008 June 19; 22(10).
- ²⁴ Barton K et al. Broad activation of latent HIV-1 in vivo. *Nat. Commun.* 7:12731 doi: 10.1038/ncomms12731 (2016).
- ²⁵ Archin NM et al. Administration of vorinostat disrupts HIV-1 latency in patients on antiretroviral therapy. *Nature*. 2012; 487(7408): 482–485. doi:10.1038/nature11286.
- ²⁶ Tsai P et al. In vivo analysis of the effect of panobinostat on cell-associated HIV ARN and ADN levels and latent HIV infection. *Retrovirology* (2016) 13:36 DOI 10.1186/s12977-016-0268-7
- ²⁷ Shirikawa K et al. Reactivation of latent HIV by histone deacetylase inhibitors. *Trends Microbiol.* 2013 June; 21(6): 277–285. doi:10.1016/j.tim.2013.02.005.
- ²⁸ Wightman F, Lu HK, Solomon AE, et al. Entinostat is a histone deacetylase inhibitor selective for class 1 histone deacetylases and activates HIV production from latently infected primary T cells. *AIDS*. 2013; 27: 2853–2862.
- ²⁹ Wei DG, Chiang V, Fyne E, et al. Histone deacetylase inhibitor romidepsin induces HIV expression in CD4 T cells from patients on suppressive antiretroviral therapy at concentrations achieved by clinical dosing. *PLoS Pathog.* 2014; 10:e1004071. [PubMed: 24722454]
- ³⁰ Sjøgaard OS, Graversen ME, Leth S, Olesen R, Brinkmann CR, Nissen SK, et al. (2015) The Depsipeptide Romidepsin Reverses HIV-1 Latency In Vivo. *PLoS Pathog* 11(9): e1005142. doi:10.1371/journal.ppat.1005142.
- ³¹ Gunst JD, Kjær K, Olesen R, Rasmussen TA, Østergaard L, Denton PW, Sjøgaard OS, Tolstrup M. Fimepinostat, a novel dual inhibitor of HDAC and PI3K, effectively reverses HIV-1 latency ex vivo without T cell activation. *J Virus Erad.* 2019 Sep 18; 5(3):133-137.
- ³² Laird GM, Bullen CK, Rosenbloom DI, et al.: Ex vivo analysis identifies effective HIV-1 latency-reversing drug combinations. *J Clin Invest* 2015; 125:1901–1912.
- ³³ Gutiérrez C, Serrano-Villar S, Madrid-Elena N, Pérez-Elías MJ, Martín ME, Barbas C, Ruipérez J, Muñoz E, Muñoz-Fernández MA, Castor T, Moreno S. Bryostatín-1 for latent virus reactivation in HIV-infected patients on antiretroviral therapy. *AIDS*. 2016 Jun 1; 30(9):1385-92.
- ³⁴ Xing S, Siliciano RF. Targeting HIV latency: pharmacologic strategies toward eradication. *Drug Discovery Today* Volume 18, Numbers 11/12 June 2013 (ELSEVIER)
- ³⁵ Spivak AM et al. Janus kinase inhibition suppresses PKC-induced cytokine release without affecting HIV-1 latency reversal ex vivo. *Retrovirology*. 2016 Dec 20; 13(1):88. doi: 10.1186/s12977-016-0319-0.
- ³⁶ Martin AR, Pollack RA, Capoferri A, Ambinder RF, Durand CM, Siliciano RF. Rapamycin-mediated mTOR inhibition uncouples HIV-1 latency reversal from cytokine-associated toxicity. *J Clin Invest*. 2017 Feb 1; 127(2):651-656.
- ³⁷ Gama L, Abreu CM, Shirk EN, Price SL, Li M, Laird GM, Pate KA, Wietgreffe SW, O'Connor SL, Pianowski L, Haase AT, Van Lint C, Siliciano RF, Clements JE, LRA-VIS Study Group. Reactivation of simian immunodeficiency virus reservoirs in the brain of virally suppressed macaques. *AIDS*. 2017 Jan 2; 31(1):5-14.
- ³⁸ Grau-Expósito J, Luque-Ballesteros L, Navarro J, Curran A, Burgos J, Ribera E, et al. Latency reversal agents affect differently the latent reservoir present in distinct CD4+ T subpopulations. *PLoS Pathog* 2019, 15(8): e1007991. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007991>
- ³⁹ Hakre S, Chavez L, Shirakawa K, Verdin E. HIV latency: experimental systems and molecular models. *FEMS Microbiol Rev*. 2012 May; 36(3):706-16.
- ⁴⁰ Bouchat S et al. Sequential treatment with 5-aza-2'-deoxycytidine and deacetylase inhibitors reactivates HIV-1. *EMBO Mol Med* (2016)8:117-138 doi:10.15252/emmm.201505557
- ⁴¹ Choudhary SK, Archin NM, Margolis DM: Hexamethylbisacetamide and disruption of human immunodeficiency virus type 1 latency in CD4+ T cells. *J Infect Dis* 2008; 197:1162–1170.
- ⁴² Budhiraja S, Rice AP. Reactivation of latent HIV: do all roads go through P-TEFb? *Future Virol.* 2013; 8(7):10.2217/fvl.13.52. doi:10.2217/fvl.13.52

- ⁴³ Banerjee, C. et al. BET bromodomain inhibition as a novel strategy for reactivation of HIV-1. *J. Leukoc. Biol.* 2012 <http://dx.doi.org/10.1189/jlb.0312165>
- ⁴⁴ Lu P et al., BET inhibitors RVX-208 and PFI-1 reactivate HIV-1 from latency. *Scientific Reports (Nature Research JouARNI)*, 2017, 7(1), pp.1–12.
- ⁴⁵ Doyon, G. et al. Disulfiram reactivates latent HIV-1 expression through depletion of the phosphatase and tensin homolog. *AIDS.* 2013 27, F7–F11.
- ⁴⁶ Spivak AM, Planelles V. HIV-1 Eradication: Early Trials (and Tribulations). *Trends in Molecular Medicine*, January 2016, 22(1): 10-27 <http://dx.doi.org/10.1016/j.molmed.2015.11.004>
- ⁴⁷ Schwartz C et al. On the way to find a cure: Purging latent HIV-1 reservoirs. *Biochemical Pharmacology (ELSEVIER)* 146 (2017):10–22.
- ⁴⁸ McBrien JB et al. Robust and persistent reactivation of VIS and HIV by N-803 and depletion of CD8+ cells. *Nature* (2020). <https://doi.org/10.1038/s41586020-1946-0>
- ⁴⁹ Spivak AM, Planelles V. Novel Latency Reversal Agents for HIV-1 Cure. *Annu Rev Med.* 2018; 69:421–436. doi:10.1146/annurev-med-052716-031710
- ⁵⁰ Novis CL, Archin NM, Buzon MJ, et al. Reactivation of latent HIV-1 in central memory CD4+ T cells through TLR-1/2 stimulation. *Retrovirology.* 2013; 10:119. doi:10.1186/1742-4690-10-119
- ⁵¹ Offersen R, Nissen SK, Rasmussen TA, et al. A Novel Toll-Like Receptor 9 Agonist, MGN1703, Enhances HIV-1 Transcription and NK Cell-Mediated Inhibition of HIV-1-Infected Autologous CD4+ T Cells. *J Virol.* 2016; 90(9):4441–4453. doi:10.1128/JVI.00222-16
- ⁵² Tsai A, Irrinki A, Kaur J, et al. Toll-Like Receptor 7 Agonist GS-9620 Induces HIV Expression and HIV-Specific Immunity in Cells from HIV-Infected Individuals on Suppressive Antiretroviral Therapy. *J Virol.* 2017; 91(8):e02166-16. doi:10.1128/JVI.02166-16
- ⁵³ Meås HZ, Haug M, Beckwith MS, et al. Sensing of HIV-1 by TLR8 activates human T cells and reverses latency. *Nat Commun.* 2020; 11(1):147. doi:10.1038/s41467-019-13837-4
- ⁵⁴ Ait-Ammar A, Kula A, Darcis G, Verdikt R, De Wit S, Gautier V, Mallon PWG, Marcello A, Rohr O and Van Lint C. Current Status of Latency Reversing Agents Facing the Heterogeneity of HIV-1 Cellular and Tissue Reservoirs. *Front. Microbiol.* 2020, 10:3060 doi: 10.3389/fmicb.2019.03060
- ⁵⁵ Nixon CC et al. Systemic HIV and SIV latency reversal via non-canonical NF-κB signalling in vivo. *Nature* (2020). <https://doi.org/10.1038/s41586020-1951-3>
- ⁵⁶ Bosque A, Nilson KA, Macedo AB, et al. Benzotriazoles Reactivate Latent HIV-1 through Inactivation of STAT5 SUMOylation. *Cell Rep.* 2017; 18(5):1324–1334. doi:10.1016/j.celrep.2017.01.022
- ⁵⁷ Wykes MN, Lewin SR. Immune checkpoint blockade in infectious diseases. *Nat Rev Immunol.* 2018; 18(2):91–104. doi:10.1038/nri.2017.112
- ⁵⁸ Fromentin R et al. PD-1 blockade potentiates HIV latency reversal ex vivo in CD4+ T cells from ART-suppressed individuals. *Nature Communications.* 2019; 10.1038/s41467-019-08798-7.
- ⁵⁹ Guihot, A et al. Drastic decrease of the HIV reservoir in a patient treated with nivolumab for lung cancer. *Ann. Oncol.* 2018;29, 517–518. doi: 10.1093/annonc/mdx696.
- ⁶⁰ Vansant G, Bruggemans A, Janssens J, Debyser Z. Block-And-Lock Strategies to Cure HIV Infection. *Viruses.* 2020; 12(1):84. doi:10.3390/v12010084
- ⁶¹ Dash PK, Kevadiya BD, Su H, Banoub MG, Gendelman HE. Pathways towards human immunodeficiency virus elimination. *EBioMedicine.* 2020; 53:102667. doi:10.1016/j.ebiom.2020.102667.
- ⁶² Ebin H, Misawa N, Kanemura Y, Koyanagi Y. Harnessing the CRISPR/Cas9 system to disrupt latent HIV-1 provirus. *Sci Rep.* 2013; 3:2510. doi:10.1038/srep02510
- ⁶³ Liao HK, Gu Y, Diaz A, et al. Use of the CRISPR/Cas9 system as an intracellular defense against HIV-1 infection in human cells. *Nat Commun* 2015; 6:6413.
- ⁶⁴ Hu W, Kaminski R, Yang F, et al. ARN-directed gene editing specifically eradicates latent and prevents new HIV-1 infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014; 111(31):11461–11466. doi:10.1073/pnas.1405186111
- ⁶⁵ Kaminski R, Bella R, Yin C, et al. Excision of HIV-1 ADN by gene editing: a proof-of-concept in vivo study. *Gene Ther.* 2016; 23(8-9):690–695. doi:10.1038/gt.2016.41