



**FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

**TRABAJO FIN DE GRADO
TÍTULO: ESTRATEGIAS DE ERRADICACIÓN
DEL VIH**

Autor: Elena Hidalgo Cardeñoso

Fecha: Junio 2019

Tutor: Javier Sánchez-Rubio

Índice

1	Resumen	3
	Abstract.....	3
2	Introducción.....	3
2.1	Problema del VIH.....	3
2.2	El VIH	4
2.3	Terapia antirretroviral de alta eficacia (TARGA).	5
3	Objetivos	5
4	Metodología.....	5
5	Resultados y discusión	6
5.1	Estrategia de activación y eliminación del reservorio	6
5.2	Anticuerpos ampliamente neutralizantes.....	9
5.3	Terapia génica	13
6	Conclusiones	17
7	Bibliografía.....	18

1 Resumen

Cuando hablamos de la cura del virus de inmunodeficiencia humana (VIH) hay que diferenciar entre dos conceptos; la erradicación y la cura funcional. La cura funcional se refiere a conseguir un mayor control inmune sobre la replicación del virus, mientras que la erradicación se refiere a una completa eliminación del reservorio viral, de forma que se pueda eliminar definitivamente el virus del organismo de los pacientes infectados.

En los últimos años, la investigación en las estrategias de erradicación del VIH ha experimentado un fuerte impulso, y se han desarrollado nuevas terapias, aún en investigación, con las que se espera que la eliminación completa del virus sea una realidad en unos años.

En este trabajo clasifico las diferentes estrategias en desarrollo e investigación en tres grupos; estrategias de activación y eliminación del reservorio, estrategias que utilizan anticuerpos ampliamente neutralizantes y estrategias desarrolladas a partir de la terapia génica.

Abstract

When we talk about curing the human immunodeficiency virus (HIV) there are two concepts to differentiate between; eradication, and a functional cure. A functional cure refers to larger immune system control over the replication of the virus, while eradication refers to complete elimination of the viral reservoir so that the virus can be definitively eliminated from an infected patients' organism.

Over the last few years research into HIV eradication strategies has experienced a strong push, and although still in investigation, new therapies have been developed, with which it is expected that the complete elimination of the virus will become a reality in a few years

In this paper I classify the different strategies in research and development into three groups; strategies of activation and elimination of reservoirs, strategies that use broadly neutralising antibodies and strategies developed from gene therapy.

2 Introducción

2.1 Problema del VIH

La infección por el VIH es un problema de salud pública de primera magnitud.

Hoy en día, y a pesar de la eficacia de los tratamientos antirretrovirales y de la información que se dispone sobre el virus y su transmisión, la infección por VIH sigue estando muy presente y cada año se notifica un alto número de nuevos casos. Solo en España, en el año 2017 se recibió la notificación de 3.381 nuevos diagnósticos de VIH (hasta el 30 de junio de 2017), según datos del Instituto de Salud Carlos III de Madrid. En cuanto a la mortalidad, en el año 2016 se produjeron 498 fallecimientos por VIH y Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), suponiendo un 1,2 por 1000 de los fallecimientos totales. Separándolo por sexos, el 77,3% de los fallecimientos se dieron en hombres y el 22,7% en mujeres. [1,2] (Figura 1)

	Defunciones totales	Defunciones por VIH y sida	Defunciones por VIH y sida (‰)	Tasa de mortalidad VIH y sida por 100.000 habitantes
Hombres	208.993	385	1,8	1,7
Mujeres	201.618	113	0,6	0,5
Total	410.611	498	1,2	1,1

Figura 1: Tabla de defunciones totales, defunciones por VIH y sida, mortalidad proporcional por VIH y sida, y tasa de mortalidad VIH y sida por 100.000 habitantes total y por sexo. 2016 [1]

A nivel mundial, la Organización Mundial de la Salud (OMS) estimó que en 2016 había 36,7 millones de personas infectadas por el VIH aproximadamente, de las cuales el 51% eran mujeres. En este año, se dieron 1,8 millones de nuevos casos de infección en todo el mundo, lo que supuso una reducción del 11% desde 2010, mientras que un millón de individuos falleció por causas relacionadas con el SIDA, lo que supuso una reducción del 48% comparando con 2005. [3]

La prevalencia del VIH en cada país determina cuál es el riesgo de infección en cada grupo poblacional; en países con una alta prevalencia (este y sur del continente africano), las mujeres jóvenes son el principal grupo de riesgo, mientras que, en países con una prevalencia baja, los grupos de riesgo son los hombres que tienen sexo con otros hombres, la población transgénero, los usuarios de drogas por vía parenteral y los trabajadores sexuales. [4]

2.2 El VIH

El virus de la inmunodeficiencia humana o VIH es un retrovirus que infecta a los linfocitos T CD4+ que forman parte de nuestro sistema inmune, provocando la muerte de estas células. El recuento de células va disminuyendo hasta que el sistema inmune no es capaz de hacer frente a diferentes infecciones que pueden acabar con la vida del paciente infectado. Cuando el recuento de linfocitos T CD4+ es menor a 200 cel/μl, se considera que el paciente tiene SIDA. [5]

Cuando el VIH entra en el organismo, reconoce los receptores en la superficie de las células T CD4+ y se une a ellos en una primera etapa de fijación. En este proceso, el virus emplea como correceptor la proteína CCR5 de la superficie de los linfocitos. (Figura2)

Una vez fijado a los receptores del linfocito, empieza una etapa de fusión en la que el virus libera su RNA en el interior de la célula huésped.

Una vez en el citoplasma de la célula anfitriona, el RNA vírico de cadena simple, se convierte en una cadena doble de DNA vírico, gracias a la acción de la enzima vírica transcriptasa inversa. A continuación, este nuevo DNA vírico penetra en el núcleo de la célula donde una nueva enzima llamada integrasa, lo “integra” en el material genético de la célula, de forma que éste pasa a ser un DNA proviral (o provirus), que podrá permanecer inactivo durante años sin producir nuevas copias del VIH. A estas células infectadas que no están produciendo activamente nuevos virus, se les conoce como reservorio del VIH latente.

En un momento dado, la célula huésped recibe un estímulo para volverse activa, y el DNA proviral utiliza la enzima celular ARN Polimerasa para replicar el material genético del virus y transcribir el DNA en segmentos de RNA mensajero (mRNA). Este mRNA provírico utiliza los ribosomas de la célula anfitriona para llevar a cabo la traducción y producir proteínas víricas de cadena larga.

A continuación, la proteasa vírica divide las cadenas largas de proteínas del VIH en proteínas individuales, que se unen a las copias de material genético del RNA vírico, ensamblándose y generando una nueva partícula de virus.

El nuevo virus ensamblado sale de la célula huésped llevándose parte de la envoltura exterior de la célula que pasará a ser parte de los nuevos virus. Sobre esta envoltura vírica, aparecen las glucoproteínas del VIH, que serán necesarias para que el nuevo virus interactúe con los receptores de las células T CD4+. [5]

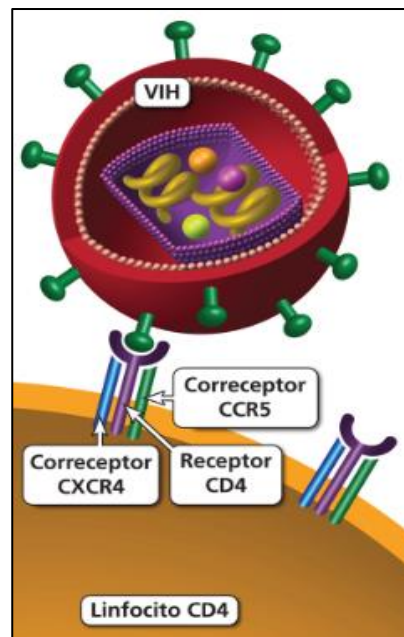


Figura 2: Interacción del VIH con linfocito CD4+ [5]

Una de las características del VIH es que es capaz de crear reservorios, que se definen como provirus de VIH capaces de replicarse integrados en células vivas quiescentes, que persisten a pesar del tratamiento con TARGA. Este reservorio se forma en las células T de memoria, células Th1, células T reguladoras y macrófagos entre otros, aunque mayoritariamente, el reservorio está compuesto por células T CD4+ de memoria.

En cuanto a la distribución anatómica de los reservorios, se forman en los llamados sitios inmunológicamente privilegiados (“sanctuary sites”), lugares del organismo donde la introducción de un antígeno no provoca una respuesta inmune inflamatoria, tales como el tejido linfoide. [6]

En cuanto a la transmisión de este virus, el VIH se trasmite a través del intercambio de fluidos corporales, como la sangre, la leche materna, el semen o las secreciones vaginales, de la persona infectada a una persona sana. Por lo tanto, los mecanismos de transmisión serán la vía sexual, parenteral y vertical. No es posible infectarse a través de agua o alimentos, besos (saliva), contacto directo o por compartir objetos personales.

2.3 *Terapia antirretroviral de alta eficacia (TARGA).*

Hoy en día, la infección por VIH es incurable, aunque existe un tratamiento antirretroviral de alta eficacia (TARGA) que consigue disminuir la carga viral a niveles indetectables y mantener un recuento adecuado de linfocitos T CD4+. Este tratamiento es muy eficaz en evitar que el virus se multiplique, pero los pacientes tienen que estar tomando la medicación durante toda su vida, con los consecuentes efectos adversos (toxicidad acumulativa, aparición de virus mutantes de escape o disfunción inmunitaria persistente) y un coste económico sustancial para el Sistema de Salud.

Existen cuatro clases de medicamentos frente al VIH; los inhibidores de la transcriptasa inversa, los inhibidores de proteasa, los inhibidores de entrada y los inhibidores de integrasa [7]. El tratamiento TARGA, consiste por lo general en la combinación de tres fármacos de distinta clase frente al VIH, siendo estos generalmente dos inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleótido, más otro fármaco que puede ser un inhibidor de proteasa, un inhibidor de la transcriptasa inversa no análogo de nucleósido o un inhibidor de la integrasa. [4]

Sin embargo, este tratamiento no actúa sobre los reservorios de VIH latente, que se han convertido en el principal obstáculo para la erradicación del VIH en pacientes seropositivos. Principalmente, este reservorio está formado por células de memoria T CD4+ infectadas, que entran en un estado de latencia persistente en el organismo [8].

3 **Objetivos**

El objetivo del trabajo es realizar una revisión bibliográfica de las diferentes líneas de trabajo dirigidas hacia la posible erradicación del VIH del organismo humano, conociendo y comprendiendo las dificultades que se presentan ante la erradicación del VIH en base al ciclo de vida del virus y sus mecanismos de autodefensa frente a nuestro sistema inmune.

4 **Metodología**

En este trabajo se ha realizado una revisión bibliográfica guiada y tutorizada. La información se ha obtenido a través de una búsqueda en PubMed de artículos en inglés o español, empleando el término “HIV” en combinación con otras palabras clave como “eradication”, “impact”, “ART”, “life cycle”, “reservoirs”, “latency” and “cure”, sumado a la información presentada en la CROI 2019 (“Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections”), he seleccionado alguna de las estrategias en investigación para la cura del VIH, de las que voy a hablar en este trabajo.

5 Resultados y discusión

Entendemos la erradicación del VIH como la completa eliminación de los virus con capacidad replicativa del individuo, lo que requiere una reducción sustancial del reservorio del virus.

El virus se apoya en diferentes mecanismos para su supervivencia en el organismo del paciente infectado; el reservorio latente, la replicación persistente a pesar del tratamiento, los santuarios anatómicos y el fallo del sistema inmune para lograr eliminarlo, por lo que en los últimos años se han buscado diferentes estrategias para su eliminación atacando a cada uno de estos mecanismos.

5.1 Estrategia de activación y eliminación del reservorio

Una de las opciones para la erradicación del VIH es la inmunoterapia con la terapia de activación y eliminación (“shock and kill approach”). Las células latentes que forman parte del reservorio viral expresan bajos o nulos niveles de proteínas virales, por lo que no pueden ser directamente eliminadas por mecanismos del sistema inmune del paciente, tales como los linfocitos T citotóxicos o las natural killer, ya que estas células necesitan la expresión de proteínas virales (antígenos) para detectar las células infectadas y poder eliminarlas [11]. Por esto se ha desarrollado esta nueva terapia, en la que en primer lugar se revierte la latencia del reservorio, y en segundo lugar se eliminan dichas células reactivadas mediante la acción de linfocitos T citotóxicos CD8+ específicos para el VIH. (Figura 3)

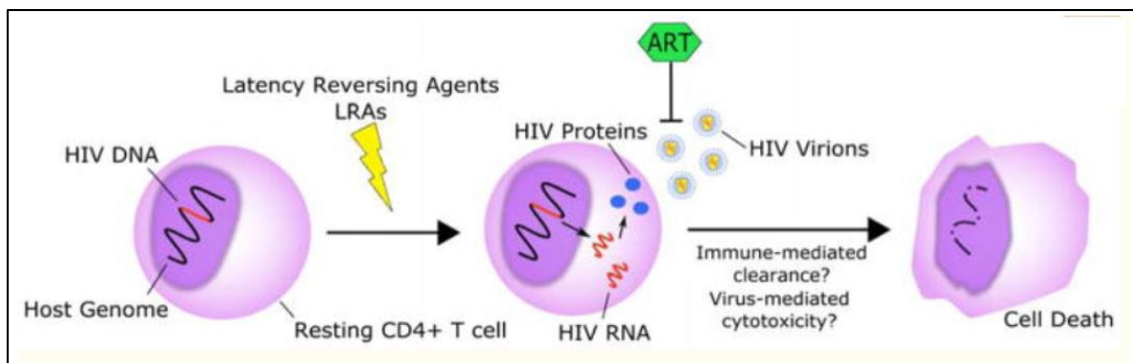


Figura 3: Esquema de la terapia de activación y eliminación.
Kim et al., Cell Host Microbe 2018.

El primer componente de esta terapia son los agentes de reversión de latencia o LRAs, cuyo objetivo es, partiendo de células en estado de latencia, activar la replicación viral para que se expresen antígenos en superficie. [6] (Figura 4)

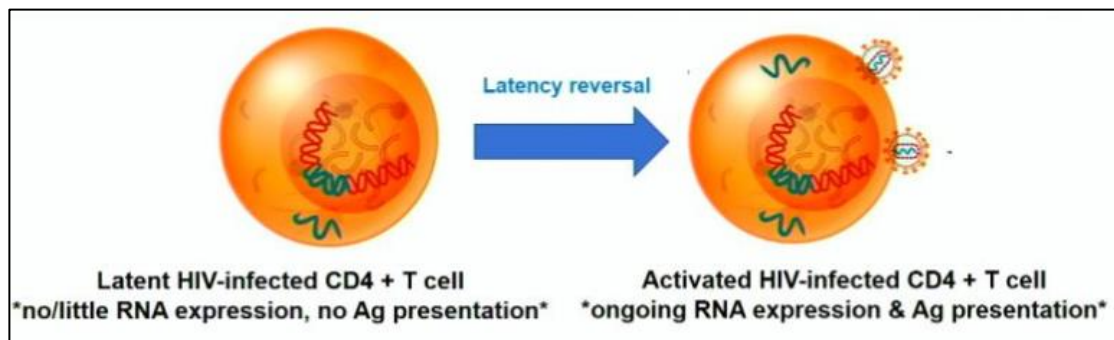


Figura 4: Esquema de reversión de la latencia [6]

Esta activación debe cumplir dos requisitos, en primer lugar, debe hacerse sin la activación generalizada de todas las células T, ya que se ha visto que esto produce problemas de toxicidad y efectos secundarios. En segundo lugar, la activación debe darse en la proporción adecuada y siempre en coordinación con las estrategias de muerte. [6]

Se han identificado varios LRAs, tales como los moduladores de la proteína-kinasa C (PKC), aunque se han dejado de emplear por efectos adversos como tumorigénesis o sobreexpresión de citoquinas. Otros LRAs identificados son los inhibidores de la histona desacetilasa, como el panobinostat, sin embargo, aunque estos inhibidores de la histona deacetilasa mostraron cierto grado de reactivación *in vitro* de líneas celulares latentes infectadas por VIH, su eficacia en pacientes con VIH-1, en ratones BLT infectados (ratones dotados de un sistema inmune humano, pues se les trasplanta tejido de médula ósea, hígado y timo humanos) y *ex vivo*, es relativamente pobre, por esto, la identificación de nuevos LRAs potentes y seguros es uno de los objetivos necesarios para la erradicación de reservorio viral. [11]

Siguiendo esta línea, se han identificado nuevos LRAs, tales como los “SMAC mimetics” y los súper-antagonistas de IL-15 y agonistas TLR9/7 que son inmunomoduladores y LRAs. [6]

El problema a la hora de desarrollar esta estrategia fue que, aunque los LRAs consiguieran la reactivación de las células infectadas que conformaban el reservorio, esta reactivación no llevaba a una activación eficiente de las células T citotóxicas CD8+ o las células natural killer para que eliminaran las células reactivadas [10]. Y esto es así por diversos motivos; la exposición crónica al antígeno puede agotar a las células del sistema inmune, que además pueden haberse deteriorado por la toxicidad de los propios LRAs o pueden tener una baja actividad en tejidos. [6]

En un estudio reciente, se desarrolló un modelo llamado “resting-like” o RELI, con el que se evaluaba la terapia de “shock and kill”, en el que se desarrollaron las llamadas células RELI en estado de latencia, que posteriormente se trataron con LRAs, consiguiendo su reactivación. (Figura 5)

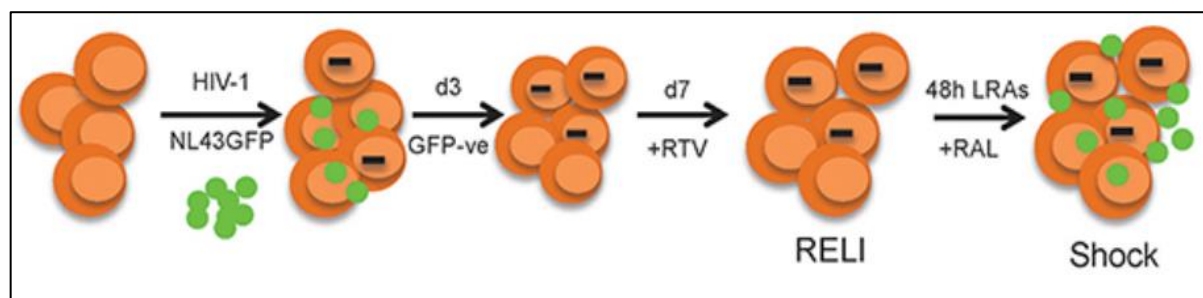


Figura 5: Esquema del desarrollo de las células resting-like [9]

Una vez se vio que los LRAs habían activado las células RELI, se evaluó si el tratamiento con LRAs permitía la presentación de antígeno del VIH a las moléculas HLA de clase I, para su posterior reconocimiento por parte de los linfocitos T CD8+. Se consiguió demostrar así que el tratamiento con LRAs para la reactivación de las células infectadas por VIH del reservorio, permite la posterior presentación de antígenos a través de las moléculas HLA de clase I, por lo que esta terapia permite la acción del sistema inmune una vez se han reactivado las células infectadas en latencia. [9]

Sin embargo, se ha visto que la capacidad para reactivar la expresión génica del virus de los LRAs estudiados hasta el momento, es limitada, incluso hay algunos provirus latentes que parecen ser refractarios a estos agentes. Además, ninguno de los LRAs ha demostrado ser

específicos para las células del reservorio, y mucho de ellos presentan toxicidad dependiente de dosis, por lo que siguen siendo una estrategia poco desarrollada. [23]

En la búsqueda de nuevos enfoques para estrategia, aparece en el mapa el Fingolimod (FTY720), un fármaco empleado en el tratamiento de la Esclerosis Múltiple. El mecanismo de acción de este compuesto consiste en su fosforilación *in vivo* a Fingolimod-fosfato, que es similar a la esfingosina-1-fosfato (S1P), un mediador lipídico extracelular agonista de receptores acoplados a proteína G. Existen al menos cinco subtipos de receptores S1P, de los cuales, el receptor S1P₁ desempeña un papel clave en el sistema inmunológico, regulando la salida de los linfocitos de los tejidos linfoides hacia la circulación. [21]

El receptor S1P₁ se expresa en la superficie de los linfocitos, permitiendo su migración según el gradiente de concentración de S1P. Este compuesto se encuentra en concentraciones superiores en los nódulos linfáticos, donde interacciona con S1P₁ promoviendo la activación y migración de los linfocitos a linfa y sangre. Así, este mecanismo homeostático, que tiende a excluir los linfocitos de los ganglios linfáticos puede ser la razón de la limitada habilidad de estas células para eliminar el reservorio viral de VIH. [24] Cuando un agonista se une a estos receptores, además de las acciones celulares, se produce la internalización del receptor, que se recicla en la membrana plasmática o se degrada. [22]

El Fingolimod es un agonista del receptor S1P₁, al interactuar con dicho receptor lo activa y a continuación produce su internalización, inhibiendo la salida de los linfocitos de los ganglios linfáticos. [21] Con esto, el Fingolimod induce una linfopenia periférica profunda y promueve la retención de múltiples poblaciones de linfocitos en tejidos linfoides. [24]

Utilizando el mecanismo de acción del Fingolimod, se ha estudiado su utilidad en la reactivación del reservorio latente de VIH. Este año 2019 se ha presentado en la “Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections” (CROI) celebrada en Seattle una de las últimas hipótesis en la que se está trabajando. En este estudio, se pensó que si se era capaz de retener los linfocitos T en los tejidos linfoides durante la infección por VIH y VIS (Virus de la Inmunodeficiencia en Simios), utilizando el tratamiento con Fingolimod, se conseguiría, por un lado, reducir el reservorio de sangre periférica al limitar la recirculación de los linfocitos T CD4+, y por otro lado, disminuir los niveles de reservorio viral en los tejidos linfoides mediante la retención de los linfocitos T CD8+.

Para esto, se trabajó con macacos que se dividieron en dos grupos en función de la dosis administrada. Durante el estudio se obtuvieron importantes conclusiones, en primer lugar, se vio que el Fingolimod no causó complicaciones ni reacciones de toxicidad en ninguno de los animales, además, no afectó al recuento celular ni al peso de los macacos, por lo que se concluyó que la administración de Fingolimod es segura y bien tolerada.

La segunda conclusión a la que se llegó fue que el Fingolimod produce una reducción dosis-dependiente del número de células T circulantes CD4+, CD3+ y CD8+. Además, se vio que se producía un aumento de los niveles de células T citotóxicas en los nódulos linfoides.

La última conclusión a la que se llegó es que el Fingolimod (FTY720) reduce el DNA de VIS en las células polimorfonucleares de sangre periférica y en las células T helper de los nódulos linfoides.

Sin embargo, la utilidad del Fingolimod en la eliminación del reservorio viral es aún una estrategia en investigación, pues este estudio fue bastante pequeño y se requieren nuevos enfoques. [24]

Otra de las estrategias para la reactivación del reservorio es el bloqueo de los checkpoints inmunológicos. Los receptores inmunológicos más conocidos son PD-1, CTLA-4, LAG-3, TIM-3, TIGIT y 2B4 [25] que, además de como diana terapéutica para una cura funcional del VIH, podrían usarse como biomarcadores para monitorizar el avance de la enfermedad y la respuesta al tratamiento. [30]

De estas moléculas, la más conocida es PD-1 o proteína de muerte celular programada-1, que se expresa junto con CTLA-4 en la superficie de las células T de memoria CD4+ que conforman el reservorio del VIH. Estas dos moléculas se encargan de limitar la reactivación de estas células latentes y, además, la expresión de PD-1 contribuye a la disfunción de las células T CD8+ citotóxicas durante la infección por VIH. [31]

Cuando PD-1 interactúa con sus ligandos PD-L1 o PD-L2 genera una señal inhibitoria a los linfocitos T que reduce su activación y proliferación, y con ello la replicación del VIH. [25,32,33] Esta molécula se expresa en altos niveles en la superficie de las células T CD4+ y CD8+ durante la infección por VIH y, además, aquellas células T CD4+ que expresan PD-1 son infectadas preferentemente con respecto a las células PD-1 negativas.

Al bloquear PD-1, se consigue liberar a los linfocitos T de la señal inhibitoria. Utilizando el anticuerpo Pembrolizumab en combinación con el agente de reversión de latencia (LRA) Briostatina *in vitro* se incrementa la producción viral, es decir, se revierte la latencia. Sin embargo, estos resultados no prueban la reversión de la latencia *in vivo*. [33]

5.2 Anticuerpos ampliamente neutralizantes

Los anticuerpos frente al VIH tienen la capacidad de bloquear la infección y replicación del virus gracias a un amplio abanico de actividades antirretrovirales. Por un lado, tienen la capacidad de neutralizar el virus impidiendo su entrada en las células, y por otro lado son capaces de reclutar y activar células inmunes efectoras para eliminar las células infectadas. [14]

En una infección vírica, la respuesta inmune que se pone en marcha incluye una respuesta celular, mediante la activación de linfocitos T CD8+, que ayuda al control y erradicación de la infección, y una respuesta humoral, a través de la producción de anticuerpos neutralizantes que permiten reducir el inóculo infeccioso durante las primeras etapas de las replications.

Los primeros anticuerpos sintetizados tras la infección por VIH son los anticuerpos neutralizantes autólogos (NAbs) que son específicos para cada cepa. Más tarde, en algunos casos, se originan los llamados anticuerpos ampliamente neutralizantes (bNAbs), que tienen actividad neutralizante frente a una amplia gama de cepas del VIH extracelulares y asociadas a células. [12] La diana de estos bNAbs es la proteína Env, presente tanto en los viriones como en las células infectadas. [14]

En la primoinfección, el VIH penetra en las células T CD4+ del huésped utilizando el receptor de superficie CD4 de los linfocitos y el correceptor CCR5, como ya se habló en la introducción. En la infección tardía, la proteína Env (codificada por el gen env y expresada en la envoltura viral), ante la falta de anticuerpos neutralizantes que la bloqueen, se une a receptores CD4 de otras células utilizando correceptores alternativos CXCR4, de forma que el virus es capaz de infectar otras células huésped. Así, podemos hablar de dos tipos de virus; los virus que tienen tropismo por R5 y los que tienen tropismo por X4. Además, una pequeña porción de los virus R5 son capaces de infectar macrófagos.

La proteína Env es una glicoproteína constituida por dos subunidades; gp120 y gp41. Estas dos subunidades se encuentran unidas de manera no covalente formando una estructura de “espiga trimérica” en la envoltura del virión. La subunidad gp41 es la subunidad C-terminal y contiene un dominio citoplasmático, un dominio transmembrana y un dominio extracelular que será el encargado de mediar el cambio conformacional para la fusión con la célula huésped. Por otro lado, la subunidad gp120 se encuentra en el exterior de la envoltura viral. [15]. Esta gp120 está compuesta por cinco regiones variables (V1-V5) y cinco regiones constantes (C1-C5), que tienden a ser similares entre los diferentes aislamiento víricos. Las regiones V1 y V2 se encuentran unidas por puentes de disulfuro y forman el dominio V1/V2, mientras que las otras 3 regiones (V3, V4 y V5) forman asas independientes dentro de la gp120. [13]

Esta proteína Env es fundamental para la entrada del virus en la célula; gp120 interacciona con el receptor de membrana CD4, lo que lleva a cambios conformacionales tanto en la glicoproteína como en el receptor, facilitando la interacción con los correceptores CCR5 y CXCR4. (Figura 6)

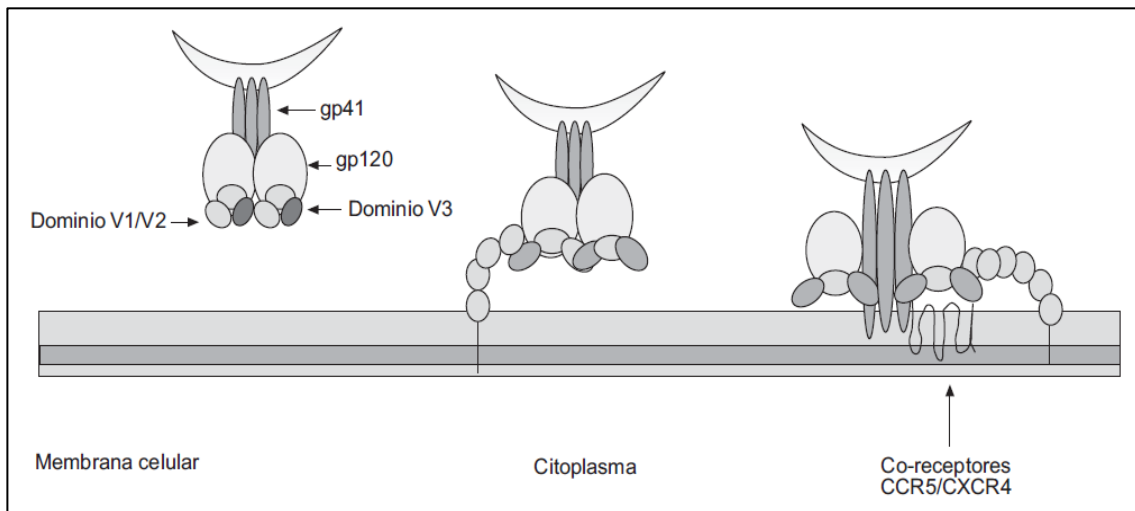


Figura 6: Esquema de la mediación de gp120 en la entrada del VIH a la célula diana [13]

Tanto la gp120 como la gp41 presentan una gran variabilidad (más de un 35%) en la secuencia primaria entre los diferentes subtipos del VIH-1 descritos. Esta variabilidad genética es fundamental tanto en la evasión de la respuesta inmune sobre la acción de los anticuerpos neutralizantes como en el desarrollo de la resistencia a los antirretrovirales. [12] Sin embargo, se han identificado varios anticuerpos ampliamente neutralizantes (bNAbs) que interactúan con regiones relativamente conservadas de Env, denominadas regiones de vulnerabilidad que son además el sitio de unión a CD4. [14]

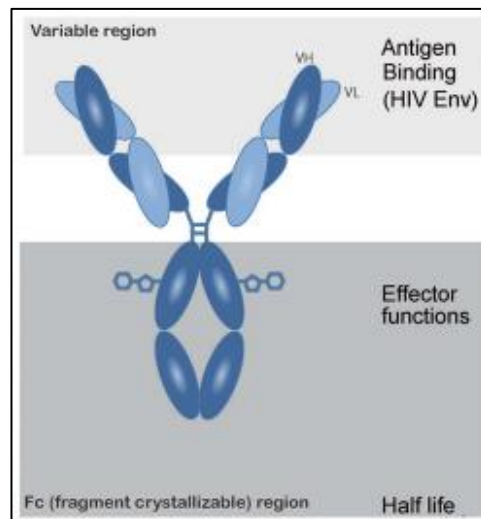


Figura 7: Estructura de los anticuerpos [14]

Las regiones de vulnerabilidad de la proteína Env son la región V2 externa y los bucles V3 de la subunidad gp120, la interfaz gp120/gp40, y la región externa proximal (MPER) en la subunidad gp41.

Además de la actividad neutralizante mediada a través de la interacción con la proteína Env, los anticuerpos poseen otras funciones efectoras que requieren el reclutamiento y activación de células del sistema inmune, tales como las células NK o los macrófagos, y que dependen de la interacción de los fragmentos cristalizables (Fc) del anticuerpo con los receptores de Fc específicos (FcR) expresados en la superficie de las células inmunes. [14] (Figura 7)

Entre estas funciones efectoras destacan la lisis mediada por el complemento, la agregación de partículas víricas infecciosas y la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCAD). [13] (Figura 8)

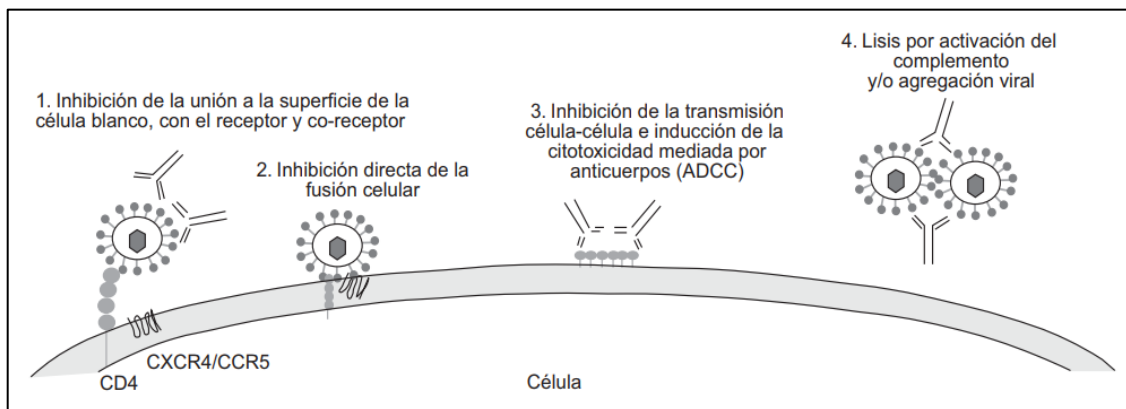


Figura 8: Mecanismos de acción de los anticuerpos neutralizantes contra el VIH [13]

Además de las funciones efectoras descritas anteriormente, la porción Fc de las IgG también es responsable de la interacción con el receptor neonatal de Fc (FcRn) expresado ampliamente en las células endoteliales. La interacción con este receptor desempeña un papel importante en el control de la vida media en plasma de los anticuerpos al regular la degradación ácida de las IgG en el lisosoma de las células endoteliales. El mecanismo se basa en la dependencia del pH de la unión de los anticuerpos a FcRn. La unión muestra mayor afinidad a pH 6, que es el pH endosomal y baja afinidad a pH neutro (extracelular). Este hecho permite que los anticuerpos captados por las células endoteliales permanezcan unidos al FcRn y se reciclen a la superficie celular, evitando la degradación ácida.

Una vez que el complejo anticuerpo / FcRn alcanza el compartimiento de pH neutro extracelular, se liberan los anticuerpos. Es importante destacar que, además de regular la vida media en plasma, este proceso de reciclaje también modula la transcitosis de anticuerpos a los tejidos. Aprovechando este mecanismo, un anticuerpo VRC01 modificado (VRC01-LS), que mostró una mejor unión al FcRn a pH = 6, proporcionó una capacidad de protección superior a la versión de tipo salvaje en macacos Rhesus, no solo incrementando su vida media in vivo, sino también al alcanzar una mayor concentración a nivel mucoso. [14]

Recientes estudios han demostrado que la capacidad neutralizadora del anticuerpo no es suficiente para conferir protección contra el VIH, y probablemente se requiera la combinación de la neutralización y las funciones efectoras dependientes de Fc. Por lo tanto, los bNAbs cuya porción Fc se modificó para aumentar la unión y activación de FcR, mostraron una capacidad protectora mayor frente al VIH cuando se analizaron en modelos de ratones humanizados. [14] En una infección por VIH, la principal limitación de la acción de los anticuerpos frente al virus, como parte de la respuesta humoral, es la complejidad estructural y la variabilidad de la proteína Env, que hacen que no todos los anticuerpos anti-VIH Env se unan a epítopos triméricos complejos, y los que lo hacen suelen ser específicos para una cepa. Es decir, solo una pequeña porción de los anticuerpos anti-VIH Env son bNAbs, por lo que solo una pequeña porción de los anticuerpos anti-VIH Env pueden bloquear un gran número de variantes de la proteína.

Hoy en día, se ha conseguido identificar nuevos anticuerpos, más amplios y más potentes que actúan sobre los sitios de vulnerabilidad de Env. Entre estos nuevos anticuerpos aislados, destacan cuatro tipos; los anticuerpos anti-CD4bs, que presentan una potencia intermedia y una gran amplitud (más del 80%), y entre los que destacan VRC01, 3BNC117, VRC07 y N6, los anticuerpos dirigidos contra el bucle V2, como PG9 o PG16, los anticuerpos dirigidos contra el bucle V3 que muestran una mayor potencia pero menor cobertura (aproximadamente del 60%), entre los que destacan 10-1074 y PGT121 y el anticuerpo anti MPER 10E8, que muestra una cobertura más amplia, pero tiene una potencia limitada.

De estos nuevos anticuerpos, VRC01, 10-1074, 3BNC117, VRC07 y sus combinaciones, se han empezado a utilizar en ensayos clínicos en humanos, abriendo así la puerta a terapias basadas en anticuerpos para curar la infección por VIH. [14]

A pesar de la identificación de estos nuevos bNAbs con una potencia mayor y de los numerosos éxitos de su uso, sigue habiendo limitaciones terapéuticas obvias cuando se usa un solo bNAb, ya que ningún bNAb puede neutralizar todos los aislamientos de VIH, es más, la mayoría de los bNAbs caracterizados no logran neutralizar más del 30% de los aislamientos analizados. [17] Por esto, se han llevado a cabo múltiples modificaciones sobre los anticuerpos naturales, que incluyen modificaciones en las regiones variables y en las regiones Fc, con el fin de modular su unión al antígeno y sus funciones efectoras respectivamente.

Una de las modificaciones llevadas a cabo sobre los bNAbs consistió en diseñar anticuerpos con una especificidad dual o anticuerpos biespecíficos, con lo que se consiguió un aumento notable de la amplitud y potencia en la neutralización del virus. [16]. En 2016, Huang et al diseñó dos anticuerpos biespecíficos; 10E8_{v1.1}/P140 y 10E8_{v2.0}/iMab, que presentaron una potencia de neutralización frente al VIH mucho mayor a la de los anticuerpos naturales.

(Figura 9)

De todos los virus analizados, el 98% fueron neutralizados por cada anticuerpo biespecífico, con una CL₅₀ media geométrica de 0,002 µg/ml, mucho menor a la obtenida para los anticuerpos 10E8, P140 y iMab. (Figura 10)

Es decir, estos anticuerpos modificados mostraron una gran capacidad neutralizante del VIH. Además, se vio que 10E8_{v2.0}/iMab es activo tanto en el tratamiento como en la prevención del VIH-1 en un modelo de ratón humanizado. [16]

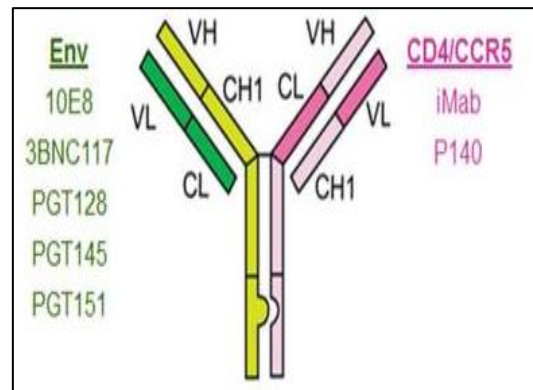


Figura 9: Esquema del diseño de un anticuerpo biespecífico para el VIH [16]

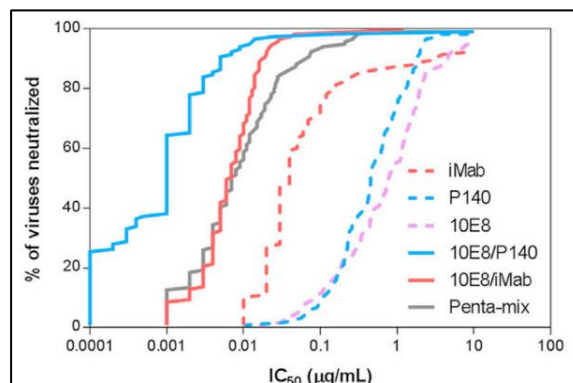


Figura 10: Capacidad neutralizadora de los anticuerpos biespecíficos en comparación a la actividad de los anticuerpos 10E8, P140 y iMab [16]

Otras modificaciones que se han diseñado han sido, por un lado, la adición de moléculas específicas al extremo C terminal de la IgG, haciendo más específico el anticuerpo. Uno de los problemas de los bNAbs es que uno o ambos de sus dominios se unen a epítomos que entran en contacto con los residuos de la región variable de la proteína Env, por lo que se facilita el escape viral, al ser residuos no conservados. Intentando evitar esto, en 2017 Gardner et al diseñaron la molécula eCD4-Ig, generada a partir de la unión de un sulfopéptido mimético corto de CCR5 en el extremo C-terminal del dominio CD4-Ig del receptor CD4. Con esto se consiguió un anticuerpo con una amplia capacidad neutralizante (mucho mayor a la de cualquier otro anticuerpo descrito), que se une a Env utilizando los sulfopéptidos miméticos CCR5 y un brazo CD4, neutralizando los aislamientos de VIH. [17]

Por último, otra de las modificaciones llevadas a cabo es la adición de una segunda región variable a los brazos del anticuerpo, que, junto con el ensamblaje de una cadena asimétrica, da lugar a un anticuerpo trispecífico. Una molécula de este tipo ha sido diseñada recientemente combinando las regiones variables del VRC01, el PGDM1400 y los anticuerpos 10E8. [14] (Figura 11)

En cuanto a las modificaciones de la región Fc de los anticuerpos, la modificación más común está relacionada con la unión a FcRn. El aumento de la afinidad de IgG por FcRn a pH 6 reduce la degradación lisosomal de IgG por las células endoteliales y prolonga la vida media plasmática de IgG. Por ejemplo, las mutaciones M428L y N434S en Fc, que confieren un perfil de unión mejorado a FcRn, se han introducido en los anticuerpos VRC01, 10-1074 y 3BNC117, lo que resulta en un aumento de la vida media en plasma in vivo y también alcanza una mayor concentración a nivel mucoso.

Alternativamente, la porción Fc de anticuerpos puede eliminarse completamente. Las pequeñas moléculas resultantes llamadas proteínas de redirección de doble afinidad (DART) están compuestas por dos regiones variables de unión a antígeno unidas por una secuencia corta que permite el reconocimiento de dos antígenos diferentes. Cuando una especificidad se dirige contra el Env del VIH y la otra contra CD16 o CD3, las moléculas resultantes pueden servir como un enlazador entre las células infectadas por el VIH y las células efectoras, NK o CTL, respectivamente.

Estas moléculas, a pesar de su corta vida media en plasma, pueden facilitar la eliminación de las células infectadas por el VIH, explotando el repertorio completo de células T CD8+, ya que la célula efectora no proporciona la especificidad del antígeno, sino la molécula.

Sin embargo, la contribución de los anticuerpos a la eliminación del reservorio del VIH todavía está mal definida. [14]

5.3 Terapia génica

El objetivo principal de la terapia génica es sustituir las células infectadas por el VIH por una población de células resistentes al virus. En este apartado se recogen algunas de las estrategias estudiadas para conseguirlo.

Uno de los pasos fundamentales en el ciclo infeccioso del VIH es su integración en el genoma de la célula huésped, catalizada por la enzima integrasa a través de la interacción directa con la proteína LEDGF/p57 de la célula huésped, codificada por el gen PSIP1 en el cromosoma 9.

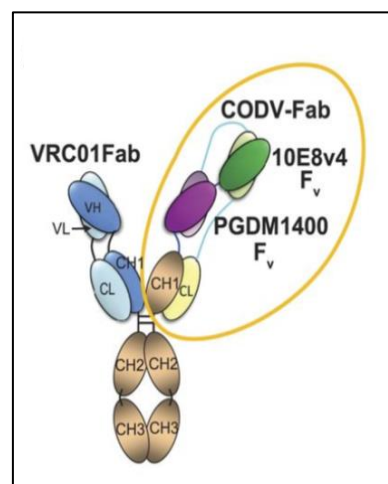


Figura 11: Esquema del diseño de un anticuerpo trispecífico para el VIH.

Xu et al. Science 2017

Esta proteína es utilizada como cofactor por todos los virus de crecimiento lento, como el VIH o el HTLV 1 y 2, para integrarse en el genoma de la célula infectada, por lo que se trata de una diana potencial para hacer que las células primarias sean resistentes a la infección por VIH. La integrasa vírica se une a esta proteína a través del residuo de ácido aspártico que se encuentra en la posición D366, por lo que la mutación de este residuo de anula la unión de la integrasa. [18]

Otra idea que se tuvo en consideración fue la inactivación de LEDGF/p57, sin embargo, esta proteína no solo guía la integración del virus en el genoma de la célula, sino que es un coactivador transcripcional que regula la transcripción mediante la interacción de las proteínas implicadas en la transcripción con sitios concretos de la cromatina. [19] Por esto se desarrolló un enfoque más sutil dirigido únicamente a la interacción con la integrasa vírica, ya que la inactivación completa de la proteína puede afectar a varias vías endógenas reguladas a través de la misma.

Utilizando la tecnología CRISPR/Cas9 se diseñó una mutación específica del residuo de aspártico de la posición 366 a asparagina, de forma que LEDGF/p57 no pueda unirse a la interfaz de la integrasa vírica, pero sí a otras proteínas que intervengan en rutas reguladas por la proteína. [18] Con esto se consiguieron resultados positivos *in vitro*.

Esta tecnología es una herramienta molecular que permite “editar” el genoma de una célula, constituida por CRISPR, un ARN guía específico para una secuencia de ADN, y Cas9, una nucleasa. Diseñando el ARN se consigue crear un ADN concreto. [20]

En esta línea, otro de los enfoques estudiados fue la eliminación del gen PSIP1 en células T CD4+ utilizando la tecnología CRISPR en células SubT1, en las que se obtuvieron niveles más bajos de ARNm de PSIP1 y una pérdida de la proteína LEDGF/p75. [18]

Además de la tecnología CRISPR/Cas9, se han utilizado otras enzimas para la modificación genética, entre las que se encuentran las nucleasas de dedos de zinc y las nucleasas efectoras con función de activador de transcripción. [25]

Por otro lado, la terapia génica se ha utilizado también para potenciar los linfocitos T en su tarea de eliminación de las células infectadas por el VIH. Para esto se ha estudiado el empleo de los receptores antigénicos quiméricos o CAR; receptores que se expresan en células T modificadas genéticamente para conseguir una especificidad antigénica mejorada. [25] Estos receptores reconocen epítopos

específicos en la superficie de las células, de forma que se consigue que las células T que expresen CAR se dirijan a células diana concretas e induzcan la respuesta de las células T citotóxicas contra las mismas independientemente del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH). [26] Esta nueva estrategia comenzó a usarse en terapia oncológica con el fin de evitar que las células cancerígenas escapasen del reconocimiento inmune. Los receptores CAR son proteínas constituidas por la combinación de un dominio extracelular de reconocimiento de antígeno derivado de un anticuerpo (se trata de un

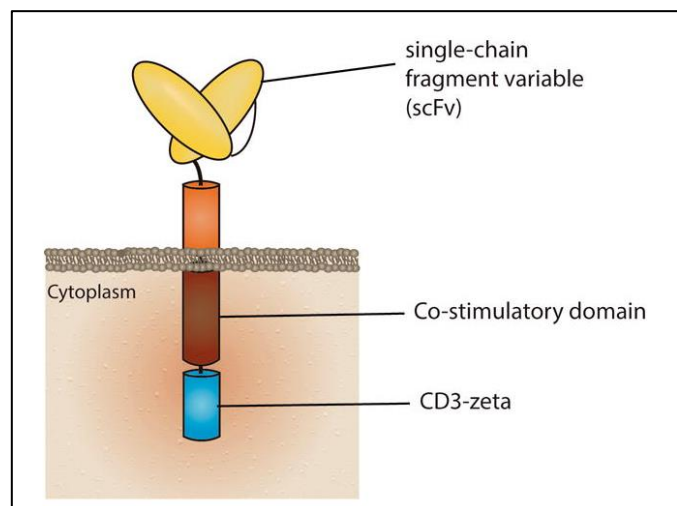


Figura 12: Representación esquemática de un Receptor Antigénico Quimérico (CAR) [27]

fragmento variable monocatenario (scFv) derivado de anticuerpo), con un dominio intracelular de activación derivado del receptor del linfocito T (TCR) CD3-zeta. [27] (Figura 12)

Estos receptores CAR han demostrado tener un alto beneficio clínico en el ataque a células infectadas por VIH. El atractivo del desarrollo de este tipo de células modificadas genéticamente en la terapia frente al VIH se debe principalmente a tres razones; en primer lugar, como ya se ha dicho, las células T CAR son independientes del CMH, por lo que pueden dirigirse contra células diana infectadas por VIH que no han sido eliminadas eficientemente por las células T endógenas, ya que el factor regulador negativo (nef) del VIH regula a la baja la expresión del CMH-I. En segundo lugar, se ha visto que las células T CAR conservan la actividad citotóxica durante al menos 6 meses y su ADN es detectable en sangre periférica durante al menos 10 años, por lo tanto, estas células podrán actuar tanto sobre las células que expresan activamente el VIH como las que se reactivarán en un futuro. Por último, las células T CAR pueden entrar en el sistema nervioso central (SNC), un reservorio de VIH difícil de tratar con los agentes farmacológicos tradicionales al ser un sitio inmunológicamente privilegiado. [26]

Hoy en día existen ya varias generaciones de células T CAR. Las células de primera generación conseguían destruir las células diana y secretar IL-2 tras el reconocimiento de la diana *in vitro*, sin embargo, presentaban una expansión y persistencia *in vivo* limitadas. Por lo tanto, se añadió un dominio coestimulador (CD28 o 4-1BB) creando la segunda generación de células T CAR. Se vio que las células T CAR a las que se había incluido CD28 presentaban un incremento en la proliferación celular, en la secreción de citoquinas tras el reconocimiento de la diana y en la persistencia de las células T CAR, incluso se vio una mejora en el efecto antitumoral *in vivo*. Por otro lado, los CAR que contenían 4-1BB mostraron un aumento de la secreción de citoquinas, una regulación positiva de los genes antiapoptóticos y una mayor persistencia *in vivo*. Se ha desarrollado además una tercera generación de CARs, que contienen dos dominios coestimulantes, con lo que se consiguieron respuestas tumorales *in vivo* más potentes y una expansión mejorada *in vivo* de las células. [28] (Figura 13)

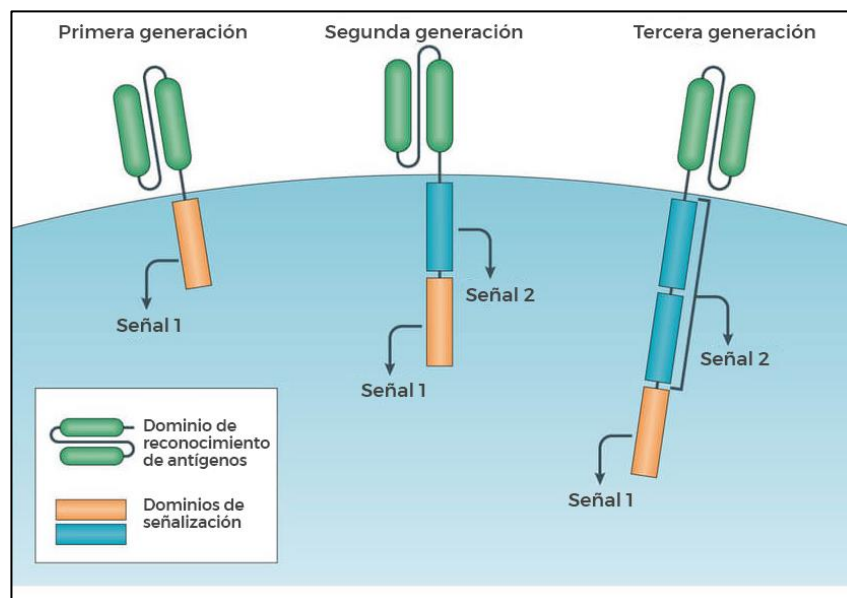


Figura 13: Representación esquemática de las tres generaciones de CARs. Brentjens R et al., Nat Rev Clin Oncol 2016.

En el diseño de los CARs es crítica la elección del epítipo. En el desarrollo de células T CAR anti-VIH se siguieron dos estrategias diferentes; en primer lugar, se pensó en usar CD4 para dirigir las células T CAR contra las células infectadas por VIH que expresaran la proteína Env en su superficie. CD4 es la proteína que el virus reconoce y utiliza para entrar en las células

huésped, por lo que utilizar esta estrategia debería resultar en una alta afinidad de unión para todas las variables de la proteína Env del VIH con una mínima posibilidad de escape viral, sin embargo, se vio que las células T CAR basadas en CD4 no eran capaces de competir con las células T CD4+ nativas.

Por otro lado, se pensó en utilizar un anticuerpo anti-HIV. Con esto, se conseguía evitar alguno de los problemas que surgían al utilizar CD4 como dominio de unión a las células infectadas, sin embargo, surgieron otras complicaciones, como que este CAR necesitaría incorporar dominios de unión a numerosos anticuerpos monoclonales con el fin de dirigirse a todas las variantes del virus y prevenir así el escape viral. En los últimos años, la potencia y amplitud de los anticuerpos anti-VIH ha mejorado mucho, por lo que la combinación de CAR basados en múltiples anticuerpos ampliamente neutralizantes con TARGA, debería reducir el riesgo de escape viral.

A pesar de los grandes avances en el diseño de las célula T CAR, esta estrategia se encuentra aún en investigación para el tratamiento de la infección por VIH. [26]

Otra de las estrategias dentro de la terapia génica es la que ha permitido la remisión completa de la infección, sin rebote viral en ausencia de TARGA, es decir, la que ha permitido la erradicación del VIH. [25]

En el año 2006, el conocido como el paciente de Berlín, recibió dos trasplantes de médula ósea como tratamiento para su leucemia. La médula ósea utilizada fue donada por un individuo con una mutación $\Delta 32$ en CCR5. [34]

La mutación $\Delta 32$ en el correceptor CCR5 es una delección de un par de bases que produce un CCR5 no funcional. El 1% de los europeos son homocigotos en la mutación $\Delta 32$ y resistentes a la entrada del HIV empleando el correceptor CCR5, que es el más comúnmente utilizado por el virus para entrar en las células diana T CD4+. [35]

Además, el paciente recibió quimioterapia intensiva y radiación por todo el cuerpo. A fecha de hoy se considera que está curado de su infección por VIH, ya que, además de no haberse detectado ningún rastro de virus en su organismo, ya no presenta anticuerpos anti-VIH. [34]

En 2016, otro individuo, conocido ahora como el paciente de Londres, diagnosticado de infección por VIH en 2003 y de linfoma de Hodgkin estadio IV en 2013, recibió un trasplante alogénico de células madre homocigotas con una mutación $\Delta 32/\Delta 32$ en CCR5. TARGA se mantuvo tras el trasplante y hasta 16 meses después del mismo, no se recibió aprobación para interrumpir el tratamiento. A fecha de hoy, el paciente ha estado sin tratamiento antirretroviral ni rebotes virales durante más de 18 meses. [29,34,35]

Existen múltiples diferencias entre estos dos pacientes. En primer lugar, las células trasplantadas en el paciente de Londres eran células madres homocigotas con una mutación $\Delta 32/\Delta 32$ en CCR5, mientras el genotipo observado en el paciente de Berlín era un genotipo heterocigoto. En segundo lugar, el paciente de Londres recibió un solo trasplante con acondicionamiento de intensidad reducida, mientras que el paciente de Berlín recibió dos trasplantes con acondicionamiento de alta intensidad e irradiación por todo el cuerpo. [29, 34]

Hay otro caso de un paciente que recibió un trasplante con células con mutación $\Delta 32/\Delta 32$ en CCR5; el paciente de Essen. En este caso, TARGA se interrumpió una semana antes del trasplante alogénico y se produjo un rebote viral de una pequeña cepa de VIH preexistente que era capaz de infectar las células diana a través del correceptor CXCR4. Estas cepas preexistentes no se observaron en el paciente de Berlín.

Se han realizado trasplantes con células con CCR5 mutado en otros 3 pacientes, y en los tres casos se produjo un rebote viral a las 12, 32 y 41 semanas tras suspender TARGA, sin embargo, en todos los casos se produjo una disminución sustancial del reservorio viral.

Así, el caso de los pacientes de Londres y Berlín ha dado pie al desarrollo de esta nueva estrategia; una posible alternativa en pacientes candidatos a un trasplante de células madre infectados por VIH. [29].

6 Conclusiones

Las principales conclusiones son:

- La infección de VIH sigue siendo un problema de magnitud elevada en la sociedad actual a pesar de que la disponibilidad de uso y los avances terapéuticos con la implantación del tratamiento TARGA han permitido una mejora en la calidad y esperanza de vida de los pacientes infectados.
- La existencia de un tratamiento eficaz y seguro que permite que la mayoría de los pacientes tengan carga viral indetectable, ha dado paso a la investigación del gran abanico de estrategias para erradicar el VIH.
- La estrategia de “shock and kill” ha presentado grandes avances, pero a pesar de la identificación de una gran variedad de LRAs aún no se ha encontrado la forma de hacer que estas moléculas sean efectivas al 100% sin causar toxicidad. En cuanto a moléculas como el Fingolimod, no existen estudios del alcance necesario para demostrar su efectividad, por lo que son estrategias aún en investigación.
- La acción frente al VIH de los anticuerpos ampliamente neutralizantes o bNAbs combina su interacción con la proteína vírica Env con las funciones efectoras dependientes de Fc. El problema de esta estrategia es la amplia variabilidad genética de Env, que provoca que sólo una pequeña porción de los anticuerpos anti-VIH Env sean bNAbs, y por lo tanto efectivos contra la infección por VIH. Esto ha llevado al diseño de anticuerpos modificados con los que se han conseguido avances en la eliminación de células infectadas por el VIH activas, pero no se conoce su papel en la reactivación del reservorio viral.
- Utilizando la terapia génica, una de las líneas más prometedoras es el empleo de las células T CAR (ya empleadas en el tratamiento de tumores) en la erradicación del VIH.
- A día de hoy, la única estrategia que ha dado resultados ha sido el trasplante de médula ósea con células mutadas en $\Delta 32$ en CCR5. Sin embargo, este enfoque es poco realista desde el punto de vista de la seguridad de los pacientes y el coste económico que supone.

7 Bibliografía

1. Área de vigilancia de VIH y conductas de riesgo. Mortalidad por VIH y sida en España, año 2016. Evolución 1981-2016. Centro Nacional de Epidemiología/ Subdirección General de Promoción de la Salud y Vigilancia en Salud Pública- Plan Nacional sobre el Sida. Madrid; 2018.
2. Área de Vigilancia de VIH y Comportamientos de Riesgo. Vigilancia Epidemiológica del VIH y sida en España 2017: Sistema de Información sobre Nuevos Diagnósticos de VIH y Registro Nacional de Casos de Sida. Plan Nacional sobre el Sida – D.G. de Salud Pública, Calidad e Innovación / Centro Nacional de Epidemiología – ISCIII. Madrid; Nov 2018.
3. Organización Mundial de la Salud (OMS). VIH/sida. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/hiv-aids>.
4. Ghosn J, Taiwo B, Seedat S, Autran B, Katlama C. HIV. *The Lancet*. 2018; 392(10148):685-697. Doi: 10.1016/S0140-6736(18)31311-4
5. InfoSIDA. Ciclo de vida del VIH. 2015. Disponible en: <http://files.sld.cu/sida/files/2011/08/ciclodevidadelvih-infosida-2005.pdf>
6. Bar K. Update on HIV cure. Lecture presented at; 2019; Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections 2019, Seattle.
7. Medicinas para el VIH y el sida: MedlinePlus en español. 2019. Disponible en: <https://medlineplus.gov/spanish/hivaidsmedicines.html>
8. Bermejo M, Ambrosioni J, Bautista G, Climent N, Mateos E, Rovira C et al. Evaluation of resistance to HIV-1 infection ex-vivo of PBMCs isolated from patients with chronic myeloid leukemia treated with different tyrosine kinase inhibitors. *Biochem Pharmacol*. 2018 Oct; 156:248-64. Doi: 10.1016/j.bcp.2018.08.031.
9. Ruiz A, Blanch-Lombarte O, Jimenez-Moyano E, Ouchi D, Mothe B, Peña, Galvez C, Genescá M, Martínez-Picado J, Goulder P, Barnard R, Howell B, Clotet B, Prado JG. Antigen Production After Latency Reversal and Expression of Inhibitory Receptors in CD8+ T Cells Limit the Killing of HIV-1 Reactivated Cells. *Front in Immunol*. 2019 Jan 22; 9:3162. Doi: 10.3389/fimmu.2018.03162.
10. Kimata J, Rice A, Wang J. Challenges and Strategies for the Eradication of the HIV Reservoir. *Curr Opin Immunol*. 2019 Oct; 42:65-70. Doi: 10.1016/j.coi.2016.05.015.
11. Bobardt M, Kuo J, Chatterji U, Chanda SJ, Little S, Wiedemann, Vuagniaux G, Gally PA. The inhibitor apoptosis protein antagonist Debio 1143 is an attractive HIV-1 latency reversal candidate. *PLoS One*. 2019 Feb 4;14(2): e0211746. Doi: 10.1371/journal.pone.0211746.
12. Vzorov AN, Uryvaev LV. Requirements for the Induction of Broadly Neutralizing Antibodies against HIV-1 by Vaccination. *Mol Biol (Mosk)*. 2017; 51(6): 819-29. Doi: 10.1134/S0026893317060176.
13. Granados-González V, Piedrahita LD, Matínez M, Genin C, Riffard S, Urcuqui-Inchima S. Papel del dominio V1/V2 de la glucoproteína 120 del virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1 en la inducción de anticuerpos neutralizantes. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2009; 27(9):523-30. Doi: 10.1016/j.eimc.2008.02.010.
14. Carrillo J, Clotet B, Blanco J. Antibodies and Antibody Derivates: New Partners in HIV Eradication Strategies. *Front. Immunol* 2018; 9:2429. Doi: 10.3389/fimmu.2018.02429
15. Twigg Arrildt K, Joseph S, Swanstrom R. The HIV-1 Env Protein: A Coat of Many Colors. *Curr HIV/AIDS Rep*. 2012;9(1): 52–63. Doi: 10.1007/s11904-011-0107-3.
16. Huang Y, Yu J, Lanzi A, Yao X, Andrews CD, Tsai L, Gajjar M, Sun M, Seaman MS, Padte NN, Ho DD. Engineered Bispecific Antibodies with Exquisite HIV-1 Neutralizing Activity. *Cell*. 2016; 165(7):1621-1631. Doi: 10.1016/j.cell.2016.05.024
17. Gardner MR, Farzan M. Engineering antibody-like inhibitors to prevent and treat HIV-1 infection. *Curr Opin HIV AIDS*. 2017;12(3):294-301. Doi: [10.1097/COH.0000000000000367](https://doi.org/10.1097/COH.0000000000000367)

18. Lampi Y, Van Looveren D, Vranckx LS, Thiry I, Bornschein S, Debyser Z, Gijssbers R. Targeted editing of the PSIP1 gene encoding LEDGF/p57 protects cells against HIV infection. *Sci Rep.* 2019; 9(1): 2389. Doi: 10.1038 / s41598-019-38718-0.
19. Sharma S, Cermáková K, De Rijck J, Demeulemeester J, Fábry M, El Ashkara S, Van Belle S, Lepsík M, Tesina P, Duchoslav V, Novák P, Hubálek M, Srb P, Frauke C, Rezáčová P, Hodges HC, Debyser Z, Veverka V. Affinity switching of the LEDGF/p57 IBD interactome is governed by kinase-dependent phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2018; 115 (30): E7053-E7062. Doi: 10.1073/pnas.1803909115
20. Cannon P. Engineering the Latent Reservoir. Lecture presented at; 2019; Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections 2019, Seattle
21. Chun J, Hartung H. Mechanism of Action of Oral Fingolimod (FTY720) in Multiple Sclerosis. *Clin Neuropharmacol.* 2010; 33(2):91–101. Doi:10.1097/WNF.0b013e3181cbf825
22. Bazúa-Valenti S, García Sainz J. La esfingosina 1-fosfato y su receptor S1P₁: reguladores de la respuesta inmune. *Revista de la Facultad de Medicina (México)* 2012; v. 55, n. 6, p. 53-57.
23. Duquenne C, Gimenez S, Guigues A, Viala B, Boulouis C, Mettling C, Maurel D, Campos N, Doumazane E, Comps-Agrar L, Tazi J, Prézeau L, Psomas C, Corbeau P, François V. Reversing HIV latency via sphingosine-1-phosphate receptor 1 signaling. *AIDS.* 2017 28;31(18):2443-2454. Doi: 10.1097/QAD.0000000000001649.
24. Pino M. FTY720 Limits T Follicular Helper Cell Infection in Lymphoid Sites of SIV Persistence. Lecture presented at; 2019; Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections 2019, Seattle.
25. Rodríguez-Muñoz J, Moreno S. Estrategias de curación de la infección por VIH. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.* 2019; 37 (4): 265-273. Doi: 10.1016/j.eimc.2018.01.0007
26. Wagner T. Quarter Century of Anti-HIV CAR T Cells. *Curr HIV/AIDS Rep.* 2018; 15(2):147-154. Doi: 10.1007/s11904-018-0388-x
27. Gomes-Silva D, Ramos C. Cancer Immunotherapy Using CAR-T Cells: From the Research Bench to the Assembly Line. *Biotechnol J.* 2018; 13 (2). Doi: 10.1002/biot.201700097.
28. Karlsson H, Svensson E, Gigg C, Jarvius M, Olsson-Strömberg U, Savoldo B, Dotti G, Loskog A. Evaluation of Intracellular Signaling Downstream Chimeric Antigen Receptors. *PLoS One.* 2015; 10 (12). Doi: 10.1371/journal.pone.0144787
29. Gupta R, Abdul-jawad S, McCoy L, Ping Mok H, Peppia D, Salgado M, Martínez-Picado J, Nijhuis M, Wensing A, Lee H, Grant P, Nastouli E, Lambert J, Pace M, Salasc F, Monit C, Innes A, Muir L, Waters L, Frater J, Lever A, Edwards SG, Gabriel I, Olavarria E. HIV-1 remission following CCR5 Δ 32/ Δ 32 haematopoietic stem-cell transplantation. *Nature.*2019. Doi: 10.1038/s41586-019-1027-4.
30. Sperk M, van Domselaar RV, Neogi U. Immune Checkpoints as the Immune System Regulators and Potential Biomarkers in HIV-1 Infection. *Int J of Mol Sci.* 2018 Jul; 19(7): 2000. Doi: 10.3390/ijms19072000.
31. Harper J, Gordon S, Galardi C, Wang H, McGary C, King C, Schawalder J, Sanderson A, Johns B, Lifson J, Estes J, Margolis D, Silvestri G, Favre D, Paiardini M. PD-1 and CTLA-4 blockade in macaques induces T-cell expansion and SIV reactivation. Lecture presented at; 2019; Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections 2019, Seattle.
32. Jin HT., Ahmed R., Okazaki T. Role of PD-1 in Regulating T-Cell Immunity. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2011; 350: 17-37. Doi: https://doi.org/10.1007/82_2010_116.
33. Fromentin R, DaFonseca S, Costiniuk CT, El-Far M, Procopio FA, Hecht FM, Hoh R, Deeks SG, Hazuda DJ, Lewin SR, Routy JP, Sékaly RP, Chomont N. PD-1 blockade

potenciates HIV latency reversal ex vivo in CD4+ T cells from ART-suppressed individuals. *NaT Commun.* 2019; 10 (814). Doi: 10.1038/s41467-019-08798-7.

34. Stevenson M. CROI 2019: Advances in Basic Science Understanding of HIV. *Top Antivir Med.* 2017;27.

35. Gupta R. Sustained HIV-1 remission following homozygous CCR5 delta32 allogenic HSCT. Lecture presented at; 2019; Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections 2019, Seattle.