

**Universidad de La Laguna
Sección de Medicina**

Trabajo de Fin de Máster

CRISPR/Cas9 Y VIH:

**¿Es este sistema de edición génica la solución terapéutica para
erradicar el virus?**

Yesid Fabián Mantilla Flórez, M.D.

**Trabajo para optar al título de Magíster en Investigación y
Diagnóstico de Enfermedades Tropicales**

Tutor

Agustín Valenzuela Fernández, Ph. D.

Profesor Facultad de Ciencias de la Salud, Sección de Medicina

Tenerife

2019

Índice

General

Objetivos	3
Materiales y métodos	4
Resumen	5
Introducción	6
Integración del VIH en el genoma de la célula huésped	7
Evasión viral de la respuesta inmune	7
Sistema CRISPR/Cas9: Las tijeras moleculares	11
CRISPR/Cas9 y VIH: análisis de las posibles dianas para intervención antiviral por edición génica (pros y contras)	13
Vehiculización del sistema CRISPR/Cas	17
Discusión: Perspectivas y consideraciones futuras	19
Conclusiones	20
Referencias	23

Índice de figuras y tablas

Figura 1. Ciclo de vida del VIH	8
Figura 2. Transporte intracelular del VIH	9
Figura 3. Integración del VIH	10
Tabla 1. Mecanismos de evasión de la respuesta inmune en la infección por el VIH	10
Figura 4. Cronología de la edición génica e hitos del VIH	12
Figura 5. Sistema CRISPR/Cas	13
Figura 6. Sistema CRISPS/Cas9	14
Figura 7. Potenciales aplicaciones de CRISPR/Cas9 en la terapia contra el VIH	15
Figura 8. Integrasa viral	17
Tabla 2. Dificultades en la entrega de CRISPR/Cas9 en las células diana	17
Figura 9. Aplicaciones del sistema CRISPR/Cas9 en el ciclo de vida del VIH	20

OBJETIVOS

En virtud del conocimiento de los alcances que suponen los avances tecnológicos en edición genómica y las dificultades que existen en la búsqueda de una cura para la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) se plantean a continuación los siguientes objetivos:

1. Establecer la utilidad de la herramienta CRISPR/Cas9 en el manejo de la infección por el VIH.
 - 1.1. Caracterizar las dianas posibles en el curso de la enfermedad para los cuales CRISPR/Cas9 constituiría una opción terapéutica.
2. Evaluar las estrategias en las cuales la edición génica con CRISPR/Cas9 supone una cura orientado a las células inmunológicas y el genoma viral.
3. Mencionar y debatir los desafíos a resolver que involucra el uso del sistema CRISPR/Cas9 en el tratamiento contra el VIH.
4. Discutir los conflictos bioéticos asociados al uso de este sistema de edición génica en los seres humanos y la necesidad de legislación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para la elaboración del siguiente trabajo se realizó una búsqueda bibliográfica no discriminatoria utilizando los términos "CRISPR", "CRISPR/Cas9", "HIV", "AIDS". Además, se hizo una búsqueda sistemática en PubMed empleando la siguiente estrategia: ((«CRISPR» [MeSH Terms] OR («CRISPR/Cas9» [All Fields] AND «HIV» [All Fields]) OR «Genome editing» [All Fields] OR «Genomic therapeutics» [All Fields]) AND «AIDS» [All Fields] AND («CRISPR/Cas» [MeSH Terms] OR «CRISPR/Cas9»[All Fields]) AND («Adverse events») OR («Immunity»)). No se estableció límite de fecha de publicación para la selección de los trabajos. Se tomaron artículos de revisión, trabajos originales, noticias de prensa y órganos de difusión informativa en línea.

RESUMEN

Desde su aparición en 1981, la infección por el VIH ha tomado la vida de aproximadamente 35 millones de personas. Aunque en más de 30 años se han realizado esfuerzos trascendentales para combatir esta enfermedad (hecho que se ve reflejado en los más de 25 fármacos antirretrovirales que actualmente hay disponibles en el mercado), hoy en día no contamos con un tratamiento definitivo.

En el año 2002 se describen las repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas (CRISPR, *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) y las proteínas asociadas a CRISPR (*Cas*, *CRISPR associate proteins*) en bacterias y arqueas que les confieren inmunidad frente a DNA exógeno. Este sistema se ha utilizado como un mecanismo eficiente de edición genómica en células eucariotas. Como el VIH durante su ciclo de vida forma intermediarios de DNA de doble cadena, el virus puede ser blanco de esta herramienta de edición. En el siguiente trabajo se discuten las aplicaciones del sistema CRISPR/Cas9 en el tratamiento de la infección por el VIH haciéndose énfasis en los reservorios y las metas a conquistar para así garantizar la erradicación total del microorganismo.

ABSTRACT

Since its discovery in 1981, human immunodeficiency virus (HIV) has taken the lives of approximately 35 million people. Although transcendental efforts have been made over the past 30 years to fight this disease (a fact that is reflected in the more than 25 antiretroviral drugs currently available), today we don't have a definitive treatment for HIV.

In the 2002s, Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR) and CRISPR-associated proteins (*Cas*) were described in bacteria and archaea which confer them immunity against exogenous DNA. This system has been used as an efficient tool for genomic editing in eukaryotic cells. During its lifecycle, HIV replicate through double stranded DNA intermediate and because of it, can be a target of this editing tool. Here, I discuss the potential applications of CRISPR/Cas9 system as a therapeutic approach for HIV infection, focusing on reservoirs and the goals to be achieved in order to meet the full eradication of the microorganism.

INTRODUCCIÓN

La infección por el VIH es una enfermedad crónica que afecta al sistema inmunológico y que en su fase avanzada se caracteriza por infecciones oportunistas y neoplasias, y se le conoce como Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA)¹. La enfermedad está ampliamente distribuida pero su prevalencia varía de país a país, siendo el África subsahariana la región más afectada con cerca de tres cuartos del total a nivel mundial. 36,9 millones de personas conviven con la infección y en el año 2017 se diagnosticaron 1,8 millones de casos nuevos en todo el mundo².

El VIH afecta la inmunidad innata a la vez que produce un descenso progresivo en el número de linfocitos T CD4⁺ (LTCD4⁺). Una vez el microorganismo se integra al genoma de estas células, se establecen los reservorios en los órganos linfoides secundarios y otros tejidos³.

Actualmente no existe cura para esta enfermedad. La terapia antirretroviral (TARV) se basa en la combinación de medicamentos que actúan en diferentes puntos cruciales del ciclo de vida del microorganismo. La TARV disminuye la carga viral en sangre hasta niveles indetectables y previene la progresión de la enfermedad, pero, si ésta es interrumpida, la concentración del virus aumenta hasta niveles pre-tratamiento. Esto se debe a que los fármacos no destruyen el microorganismo de los reservorios⁴. Como la infección nunca es depurada, los pacientes deben tomar medicamentos de por vida hasta que se logre desarrollar un tratamiento definitivo o vacuna. Actualmente, se espera tener resultados más prometedores con los nuevos fármacos que desestabilizan la nucleocápside viral y evitan tanto la fase tardía de replicación como la temprana de infección celular⁵.

La cura de esta enfermedad es un objetivo a conquistar en la actualidad y los avances en terapia génica suponen una gran esperanza. La importancia de estos métodos terapéuticos radica en la posibilidad de suprimir el virus logrando la llamada cura funcional, situación en la que el virus está bajo el control del sistema inmunológico sin necesidad de medicamentos.

La mayoría de los estudios de edición genómica se han centrado en dos objetivos: **1)** delección del gen que codifica para el correceptor de membrana CCR5; y **2)** generación de mutaciones en lugares concretos del genoma proviral⁶. Las tecnologías actuales están

orientadas a producir roturas en la doble cadena de DNA, como con las nucleasas con dedos de zinc (ZFN, *zinc finger nucleases*) y las nucleasas efectoras tipo activador de la transcripción (TALEN, *transcription activator-like effector nucleases*), que fueron las primeras herramientas aplicadas en humanos. Y actualmente, desde la última década, aparece un nuevo instrumento biotecnológico: el sistema CRISPR/Cas9. Esta tecnología, por su especificidad se ha convertido en toda una revolución para la edición genómica, uno de los descubrimientos más importantes de los últimos años, y la alternativa más esperanzadora en la lucha contra el VIH/SIDA⁷.

Para poder indicar las posibles utilidades de CRISPR/Cas9 en la infección por el VIH es necesario conocer su ciclo de vida (**Figura 1**).

INTEGRACIÓN DEL VIH EN EL GENOMA DE LA CÉLULA HUÉSPED

Antes de la integración del virus al genoma de la célula huésped, la partícula viral debe transitar a través del citoplasma y en esta fase intervienen múltiples factores (**Figura 2**).

Aunque el VIH puede integrarse en muchas regiones, el proceso no depende del azar; hay preferencia por zonas con mayor densidad génica y actividad transcripcional. Así, tras atravesar el NP, el CPI se localiza principalmente en la periferia del núcleo (**Figura 3**).

EVASIÓN VIRAL DE LA RESPUESTA INMUNE

El VIH tiene diversos mecanismos de escape inmunológico. Algunos de ellos se mencionan a continuación para poder considerar posibles blancos terapéuticos.

a. Tránsito furtivo

La respuesta inmune innata, por medio de los elementos de reconocimiento de patrones (PRR, *Pattern Recognition Receptor*), identifica ácidos nucleicos invasores y envía señales de estrés en forma de quimiocinas y citoquinas inflamatorias como el interferón (INF) de tipo 1 para activar factores intrínsecos de restricción que limiten la replicación del virus. Las principales moléculas reconocidas por el organismo son los elementos intermediarios de la transcripción reversa (DNA de cadena sencilla, híbridos de RNA/DNA y DNA de doble cadena) y las proteínas virales sintetizadas en la célula que formarán el nuevo virión¹⁵. A

pesar de esto, el VIH tiene mecanismos que le permiten evadir la respuesta inmune (**Tabla 1**).

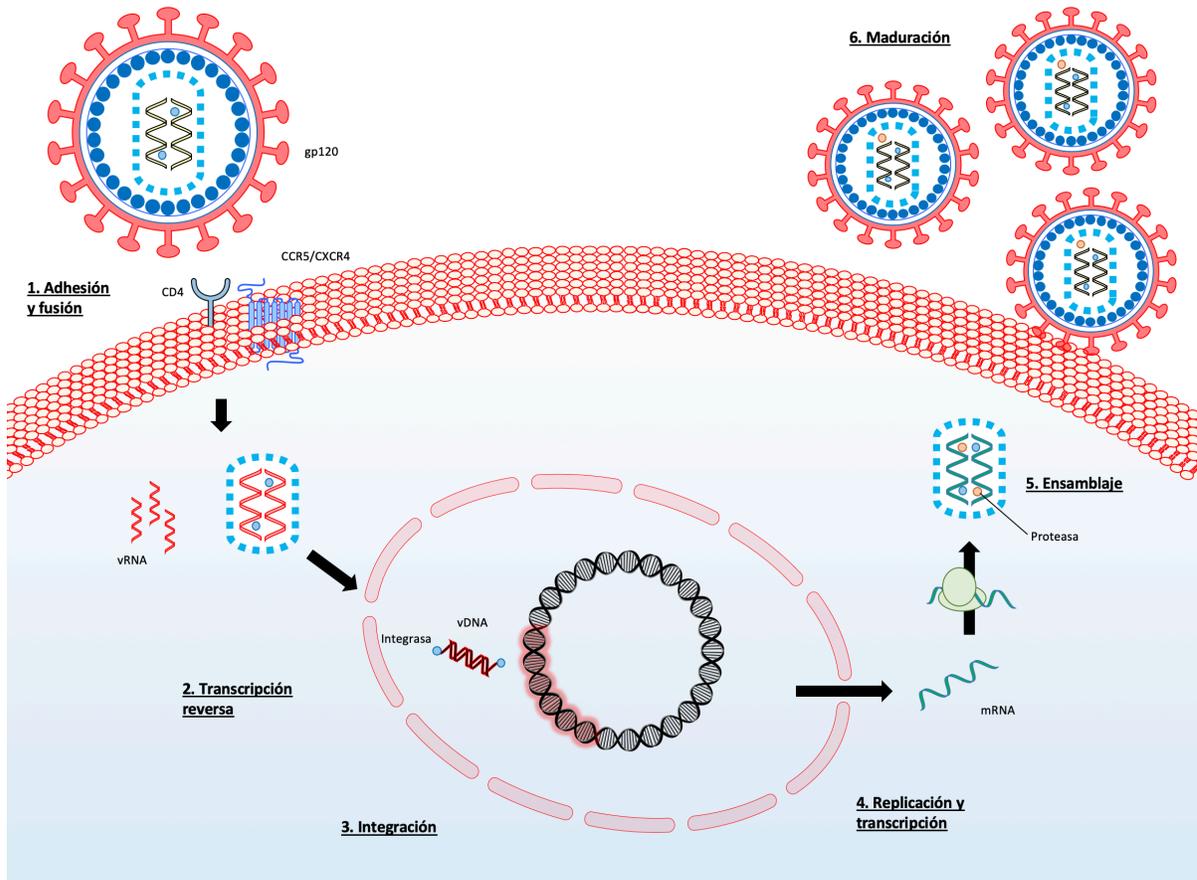


Figura 1. Ciclo de vida del VIH. Inicia con la unión de la proteína vírica gp120 al receptor CD4 de las células fagocíticas y los linfocitos T (el VIH infecta células hematopoyéticas CD4⁺). La fusión de membranas se ve facilitada por el dominio transmembrana gp41 del virus y los correceptores CCR5 ó CXCR4, respectivamente. Tras la fusión de membranas se libera la nucleocápside viral al citoplasma. La integrasa viral facilita el acople del vDNA al genoma de la célula huésped. Una vez integrado, la maquinaria enzimática celular transcribe los genes virales para dar origen al RNA mensajero (mRNA) que formará las proteínas estructurales y funcionales. Durante el ensamblaje, el RNA viral (vRNA) y las proteínas estructurales forman los viriones inmaduros que salen a la superficie de la célula. La proteasa viral se encarga de producir pequeñas proteínas virales que darán origen al virión maduro. *Imagen desarrollada por Fabián Mantilla.*

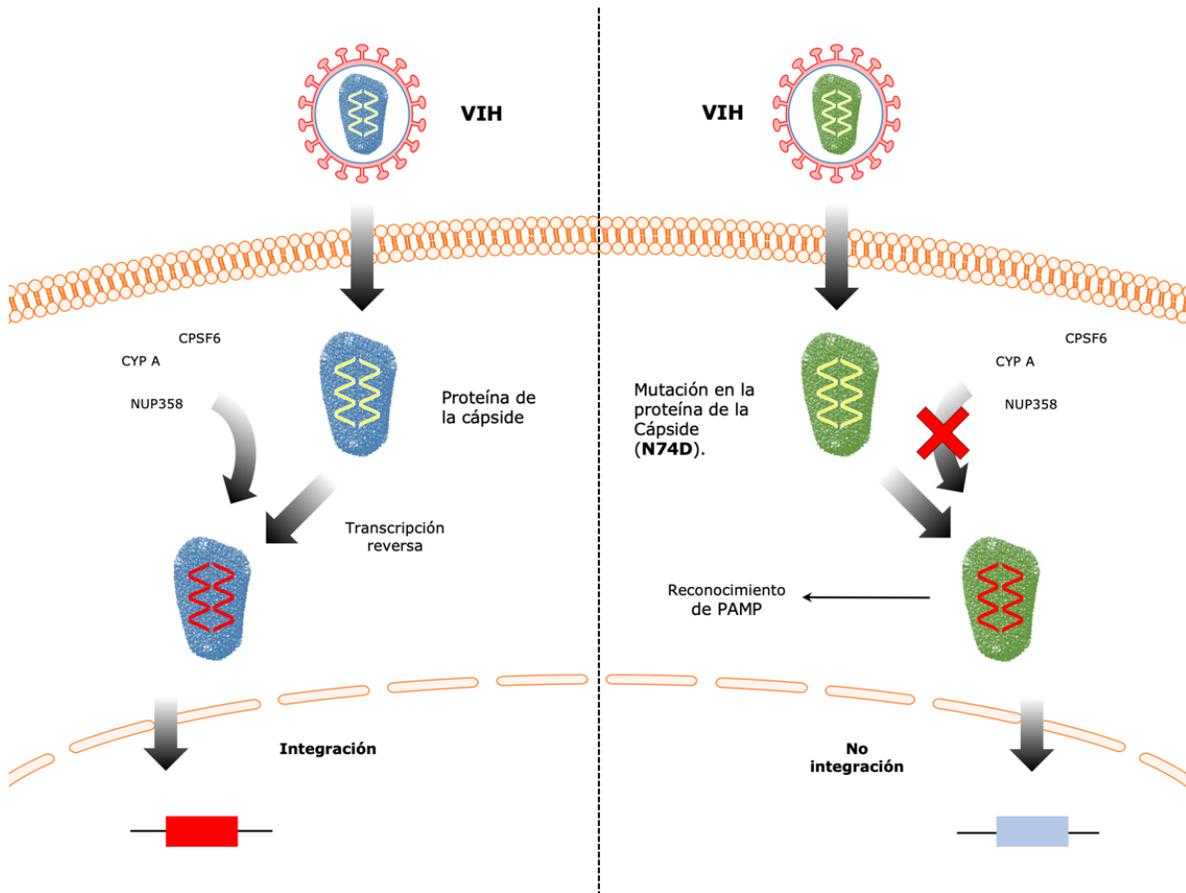


Figura 2. Transporte intracelular del VIH. La integración del vDNA sucede después de la transcripción reversa. La doble cadena de vDNA recién sintetizada formará el complejo de pre-integración (CPI) junto con la integrasa viral, proteínas de la cápside y otras proteínas celulares. El CPI llega al interior del núcleo a través del núcleo poro (NP) y allí la cápside viral interactúa con la nucleoporina 358 (NUP358) lo que sugiere que la liberación del material genético y la transcripción reversa ocurren en el NP⁸. La proteína viral Vpr facilita su introducción al núcleo. Como Vpr transita entre el citoplasma y el núcleo, se ha propuesto que esta proteína juega un papel en el transporte del vDNA⁹. Otras proteínas celulares que participan en este proceso son NUP358, ciclofilina A, CPSF6 y TNPO3¹⁰. El bloqueo de estos factores impide la infección¹¹. La liberación del genoma viral está estrechamente relacionada con la importación del CPI al núcleo y ambos fenómenos dependen de la cápside, la cual ingresa al núcleo junto con el vDNA^{12,13}. *Imagen desarrollada por Fabián Mantilla.*

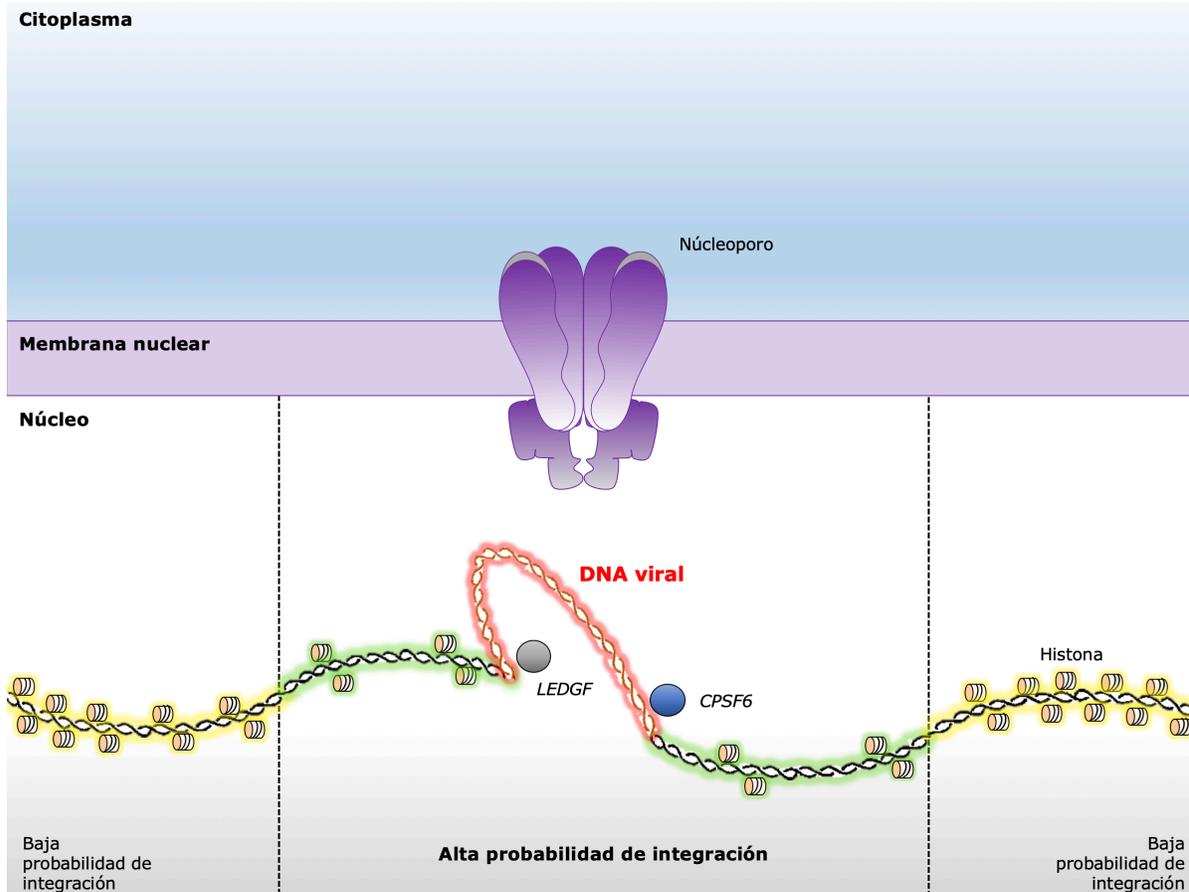


Figura 3. Integración del VIH. La integrasa se une a los LTR (*Long terminal repeats*) del vDNA y los modifica para transferir la doble hebra al DNA del individuo. El sitio de inserción del vDNA depende de la composición de la cromatina con la ayuda de algunos factores de anclaje celular como LEDGF (*Lens-epithelium derived growth factor*) y CPSF6 (*Cleavage and polyadenylation specificity factor 6*) que se unen a la cápside viral^{11, 14}. Regiones de cromatina abierta que predominan en la periferia del núcleo son más susceptibles a la integración. *Imagen desarrollada por Fabián Mantilla.*

Tabla 1. Mecanismos de evasión de la respuesta inmune en la infección por el VIH¹⁶⁻¹⁸.

Modelo I	El reconocimiento del VIH se ve obstaculizado por la enzima SAMHD1 que bloquea la transcripción reversa ya que limita la disponibilidad de dinucleósidos trifosfato (dNTP).
Modelo II	La cápside viral regula el reconocimiento a través de su unión a la ciclofilina A.
Modelo III	CPSF6 y TNPO3 actúan como chaperonas y facilitan el tránsito de la cápside viral hasta el núcleo sin que ésta sea reconocida.

Estos modelos propuestos hacen intuir que el sistema inmunitario debe reaccionar con gran rapidez. Si la respuesta antiviral no se pone en marcha antes de la integración al genoma, todo está perdido.

b. La hibernación viral

La latencia es el principal obstáculo para encontrar una cura contra el VIH. El reservorio es el tipo celular en donde el vDNA está integrado y se encuentra inactivo pero, es

transcripcionalmente competente. En el LTR-5' del provirus esta el elemento TAR (*Trans-Activating Response*), una cadena de RNA que recluta la proteína viral Tat para potenciar la actividad transcripcional¹⁹.

Otro mecanismo clave es la estructura de la cromatina. Modificaciones epigenéticas alteran esta estructura y por ende favorecen la transcripción. Estas afirmaciones se deben a estudios en los cuales se encontró que el tratamiento de LTCD4⁺ quiescentes con inhibidores de las histonas desacetilasas inducía la reactivación del VIH²⁰. La acetilación de las histonas reduce su capacidad para unirse al DNA y conlleva a la activación transcripcional, así mismo, la desacetilación crea una estructura cromatínica condensada que favorece el silenciamiento de los genes en esa región genómica²¹.

A continuación, se menciona el sistema CRISPR/Cas como instrumento terapéutico y sus posibles aplicaciones en la enfermedad por el VIH.

SISTEMA CRISPR/CAS9: LAS TIJERAS MOLECULARES

Las secuencias CRISPR son locus de DNA que contienen repeticiones cortas de nucleótidos y secuencias de DNA espaciador provenientes de bacteriófagos que les permiten defenderse de ataques futuros por virus similares y de las cuales se conoce desde hace más de 10 años (**Figura 4**). Están en el 40% de las bacterias y 90% de las arqueas²⁷. Estas secuencias junto con las enzimas Cas componen los sistemas CRISPR/Cas que permiten modificar los genes de forma específica²⁸.

a. ¿Cómo funciona CRISPR/Cas9?

Inicialmente, la célula procariota reconoce el DNA foráneo y por medio de las nucleasas CAS, lo fragmenta e integra en regiones CRISPR del cromosoma (**Figura 5**).

En la segunda fase, estas secuencias CRISPR son transcritas a una molécula denominada Pre-crRNA (*Precursor CRISPR RNA*) que es escindida por CAS II dentro de las secuencias repetidas, para así dar origen a los diferentes crRNA. Éstos se acoplan a proteínas CAS III para formar complejos de reconocimiento que permitirán la eliminación del DNA extraño con el que interacciona en el citoplasma bacteriano. Desde el momento en que se genera crRNA, la bacteria puede destruir el DNA infectante.

Finalmente, Cas9 rompe los enlaces fosfodiéster que hay entre los nucleótidos de ambas cadenas del material genético extraño anulando así el potencial nocivo del DNA viral (**Figura 6**).

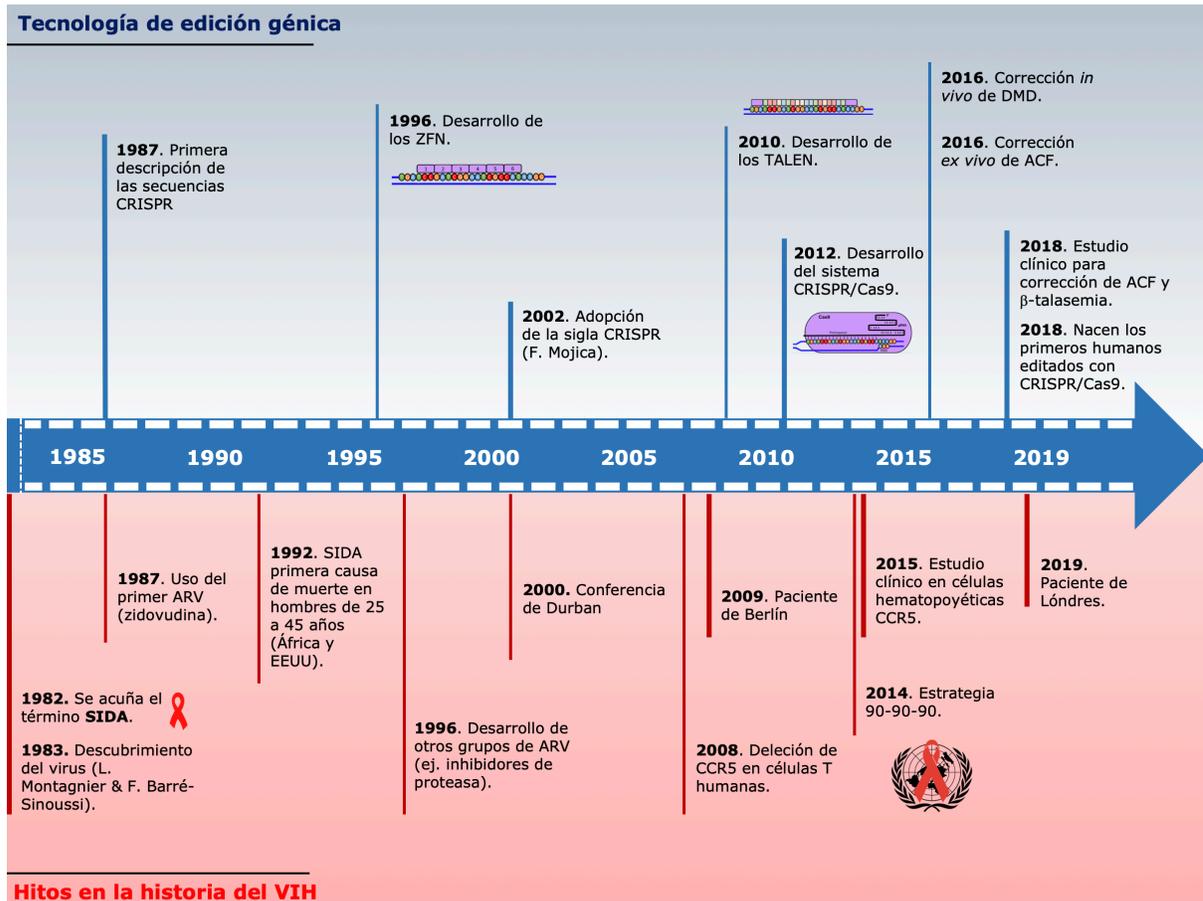


Figura 4. Cronología de la edición génica e hitos del VIH. El primer reporte de las secuencias CRISPR data de 1987²². En ese año, científicos japoneses encontraron una serie de secuencias repetidas interespaciadas sin conocerse su función. A principios de los años 90, el equipo de Francisco J. Mojica en la Universidad de Alicante, de forma independiente, encontró estas secuencias en bacterias y arqueas, y se postuló su presunta función en la replicación autónoma. Años después, en el 2002, el mismo equipo propuso el acrónimo CRISPR (del inglés: *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*). Desde ese momento, se conocería universalmente con ese término a estas secuencias. Fue en 2005 cuando se encontró que el DNA espaciador de las secuencias CRISPR provenían de bacteriófagos (virus fagos)^{23,24}. Nuevamente el grupo de Francisco J. Mojica sugirió que estas secuencias CRISPR podrían corresponder a un sistema inmunitario en procariontas²⁵. Durante los años siguientes se continuó con la investigación en este campo, de forma que, en agosto de 2012, los grupos de Jennifer Doudna de la Universidad de California en Berkeley, y de Emmanuelle Charpentier de la Universidad de Umeå demostraron que este sistema podía emplearse para la edición de los genes de cualquier hebra de DNA, y de forma programada²⁶. Desde ese momento, se han puesto en marcha investigaciones (ex vivo, ex vivo, entre otros) y nuevas herramientas para la edición génica han sido desarrolladas, basándose en CRISPR/Cas9 como: CRISPR/Cpf1, CRISPR/CasX, CRISPR/CasY, entre otras. *Imagen desarrollada por Fabián Mantilla.*

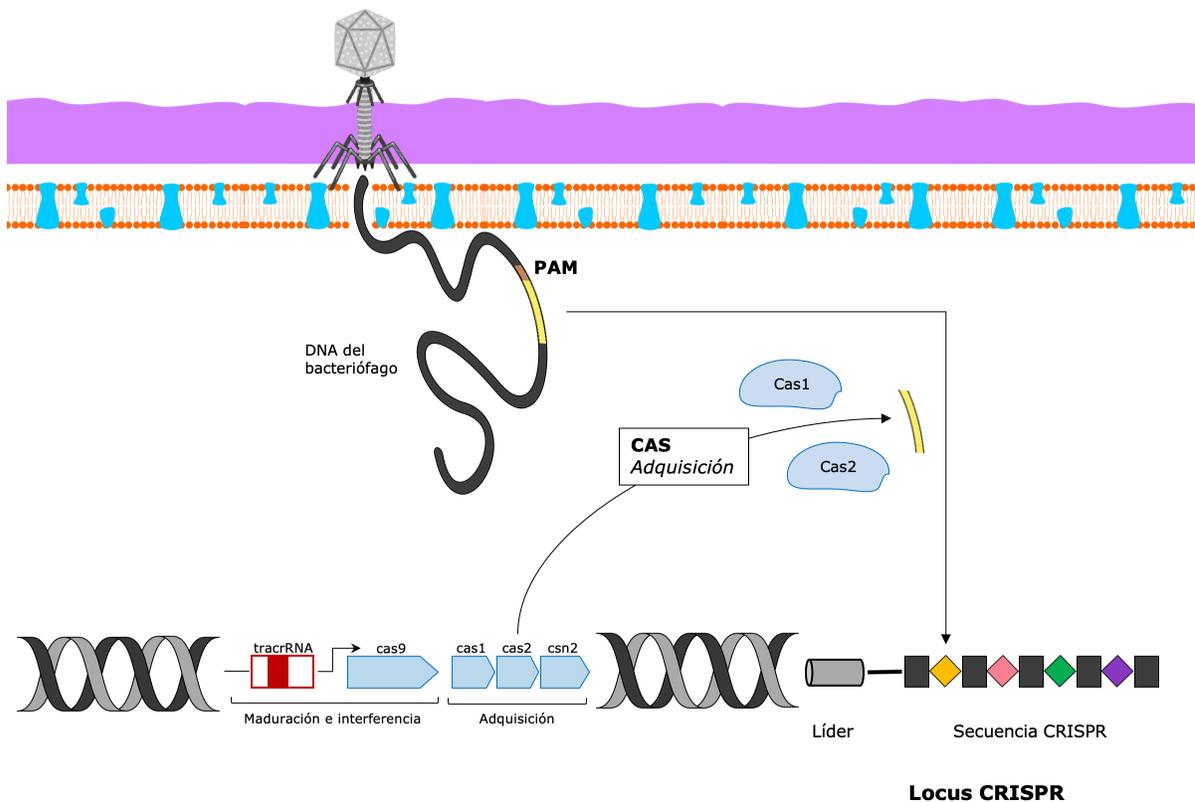


Figura 5. Sistema CRISPR/Cas. Sistema CRISPR/Cas en una bacteria grampositiva. El bacteriofago inyecta el DNA en el citoplasma bacteriano y este es reconocido por las nucleasas CAS (Cas 1 y Cas 2) que lo fragmentan y lo integran al cromosoma bacteriano en forma de espaciadores (barras en colores). *Imagen desarrollada por Fabián Mantilla.*

CRISPR/Cas9 y VIH: análisis de las posibles dianas para intervención antiviral por edición génica (pros y contras)

Actualmente, se investiga ampliamente con CRISPR/Cas9 en VIH por su eficiencia y simplicidad (**Figura 7**). Los principales blancos incluyen el genoma viral y los factores del huésped, como los receptores de quimiocina (**Figura 8**).

a) Prevención de la infección y cura funcional

Existen individuos con una mutación en la secuencia que codifica para el correceptor CCR5. La delección de 32 pares de bases (CCR5 Δ 32) inutiliza este gen y da como resultado un receptor no funcional que confiere resistencia a la infección por el VIH³⁰. El beneficio que ofrecería esta medida terapéutica se ha demostrado en el primer y hasta ahora único caso

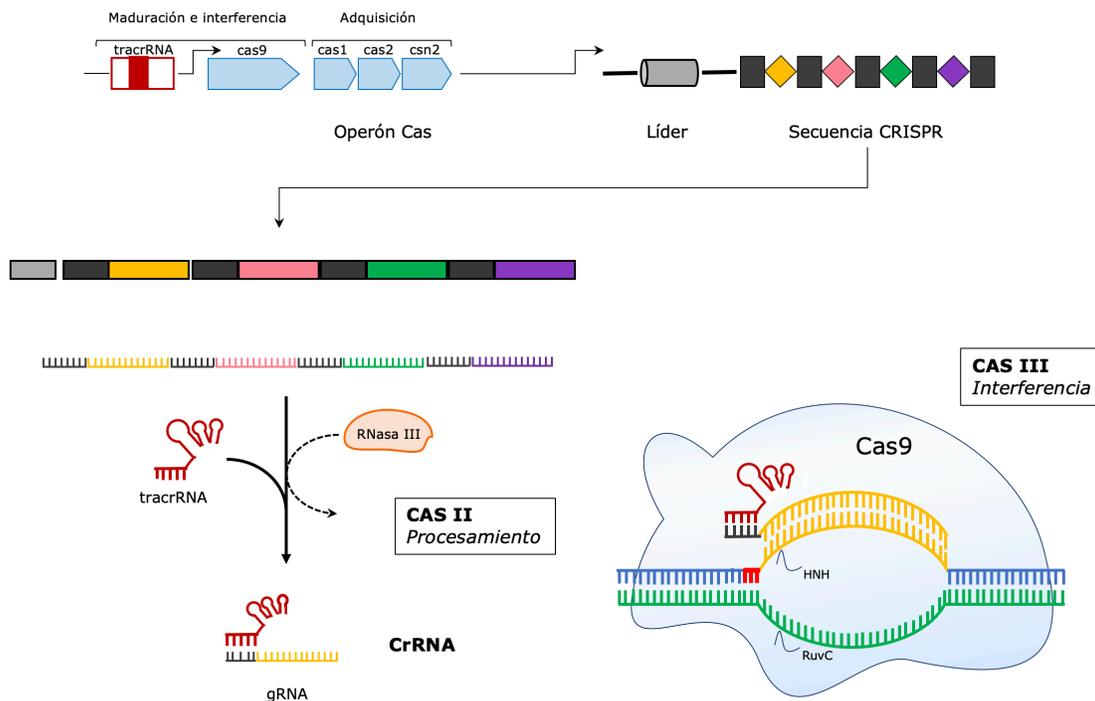


Figura 6. Sistema CRISPR/Cas9. En los sistemas CRISPR/Cas de tipo II la célula procariota sintetiza una cadena de RNA llamada tracrRNA (*trans-activating crRNA*) que, junto con el crRNA conforman el RNA guía (gRNA) y éste al unirse a la enzima Cas9 forman el complejo de reconocimiento (también llamado complejo crRNA/tracrRNA/Cas9). Posteriormente, crRNA/tracrRNA/Cas9 transitará por el citoplasma hasta unirse a la molécula de DNA invasor por la complementariedad de bases que existe entre estas dos moléculas. Cabe recordar que la secuencia crRNA no es más que el transcrito del fragmento de DNA viral integrado en los locus CRISPR y, por tanto, complementario al DNA viral original. También es importante la intervención de la secuencia PAM (*Protospacer adjacent motif*), que forma parte del genoma invasor pero no del locus CRISPR bacteriano, siendo un componente de orientación esencial hacia el DNA extraño y que impide que el locus CRISPR sea destruido por las nucleasas²⁹. *Imagen desarrollada por Fabián Mantilla.*

reportado de cura, el paciente de Berlín³¹. Si bien, en los primeros días del mes de marzo de 2019, se ha anunciado un segundo, el llamado paciente de Londres³². En pacientes VIH, conseguir el quimerismo completo CCR5 Δ 32 mediante el trasplante de médula ósea tiene una mortalidad del 50%. Por lo tanto, no se sugiere como opción para lograr la cura funcional a nivel mundial. Así, teóricamente, la inactivación de CCR5 con CRISPR/Cas9 en células madre y su posterior trasplante a los pacientes supondría una cura. No obstante, esta medida sería infructuosa contra las cepas de VIH con tropismo X4. Es importante resaltar que este fenotipo se asocia con una marcada susceptibilidad a infecciones por otros virus incluyendo el virus del nilo occidental y el virus influenza³³⁻³⁵.

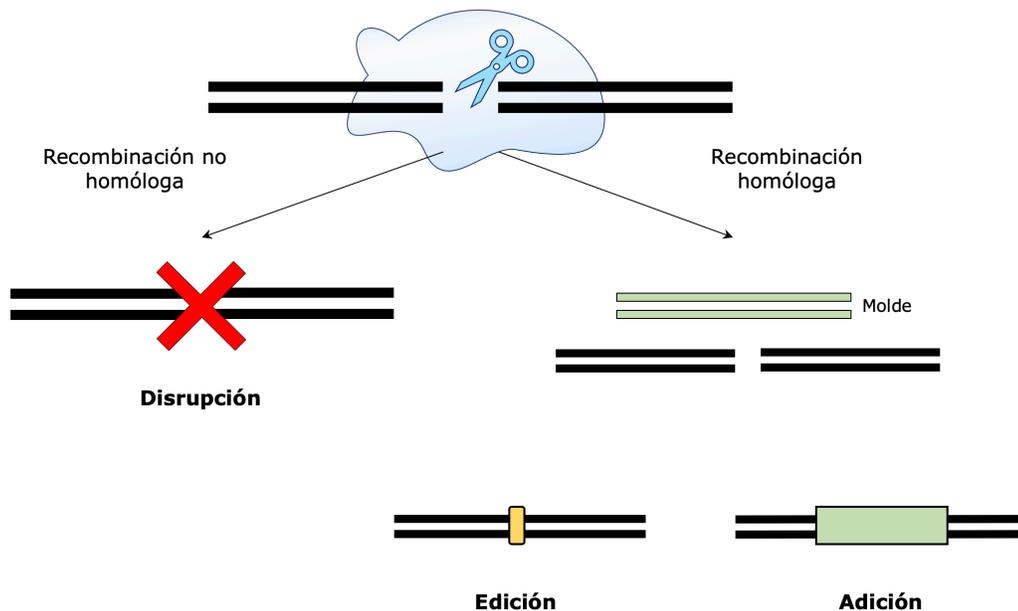


Figura 7. Potenciales aplicaciones de CRISPR/Cas9 en la terapia contra el VIH. La nucleasa Cas9 genera rupturas de doble hebra y la maquinaria de reparación celular puede llevar a 3 desenlaces. **1, Disrupción** de la secuencia diana por medio de la recombinación no homóloga. A través de la recombinación homóloga llevar a la **2, Edición** de pequeñas secuencias de DNA que codifiquen para factores de restricción y así reforzar la actividad antiviral o la **3, Adición** de genes que codifiquen para proteínas con actividad antiviral o receptores de antígeno quiméricos. *Imagen desarrollada por Fabián Mantilla.*

El correceptor CXCR4 interviene en múltiples funciones homeostáticas en la médula ósea. Esta molécula mantiene la quiescencia de las células madre hematopoyéticas y regula la activación de las células B³⁶. Es crucial su papel en la embriogénesis, la organogénesis y la regeneración de los tejidos³⁷. Por estas razones, no es factible como diana para el tratamiento contra el VIH.

b) Transporte e integración

Cuando la cápside ingresa a la célula, algunas moléculas median el transporte en el citoplasma y la internalización al núcleo. La familia de las ciclofilinas facilitan el plegamiento de las proteínas, CPSF6 permite la escisión del RNA mensajero en el extremo 3' y el procesamiento de la poliadenilación, y TNPO3 funciona como transportador de múltiples moléculas al interior del núcleo. Mutaciones en estos elementos moleculares ocasionan diferentes patologías como la distrofia muscular de cinturas³⁸. Por estos motivos, no es factible la edición génica a estos niveles.

c) **Escisión del genoma viral, el problema de los reservorios**

La principal dificultad que implica querer destruir el virus integrado es la ausencia de una secuencia específica e invariable que funcione como diana. Los LTR son los blancos más atractivos para CRISPR/Cas9. Estas secuencias se encuentran en ambos extremos del genoma viral y por lo tanto, un gRNA se acoplará a ambos extremos para que Cas9 escinda la doble hebra de DNA. Posteriormente, la ligadura de ambos extremos cromosómicos dará como resultado la eliminación de la mayor parte de las secuencias codificantes. Se ha demostrado que el tratamiento de células con CRISPR/Cas9 dirigido a los LTR produjo indels y, en menor medida, la delección de todas las secuencias dentro de esta diana. Emplear dos gRNA es más efectivo por producir cortes más precisos³⁹. Este sistema destruye el genoma viral y se acumulan mutaciones que hacen perder su potencial replicativo. Hipotéticamente, CRISPR/Cas9 podría garantizar la cura funcional del VIH, e incluso la erradicación del virus.

En los reservorios, la maquinaria celular permanece quiescente, el DNA condensado y el reconocimiento de las regiones diana por CRISPR/Cas9 se dificulta. Algunos autores han investigado el uso de múltiples medicamentos que faciliten el reconocimiento del DNA y los provirus, entre ellos están: los inhibidores de la histona desacetilasa que abren la estructura de la cromatina y el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) que activa la transcripción de los promotores LTR vía NF- κ B obteniéndose resultados alentadores^{40,41}. No obstante, aumentar la transcripción implica poner en marcha la maquinaria de reparación y algunos autores han reportado que la recombinación no homóloga puede facilitar el escape viral⁴².

Un blanco posible lo representa el gen que codifica para la integrasa viral. Los aminoácidos D64, D116 y E152 están altamente conservados en las diferentes especies de la enzima y suprimiendo la transcripción en estos codones darían como resultado una proteína inservible y se frenaría el ciclo del virus (**Figura 7**)^{11, 14}.

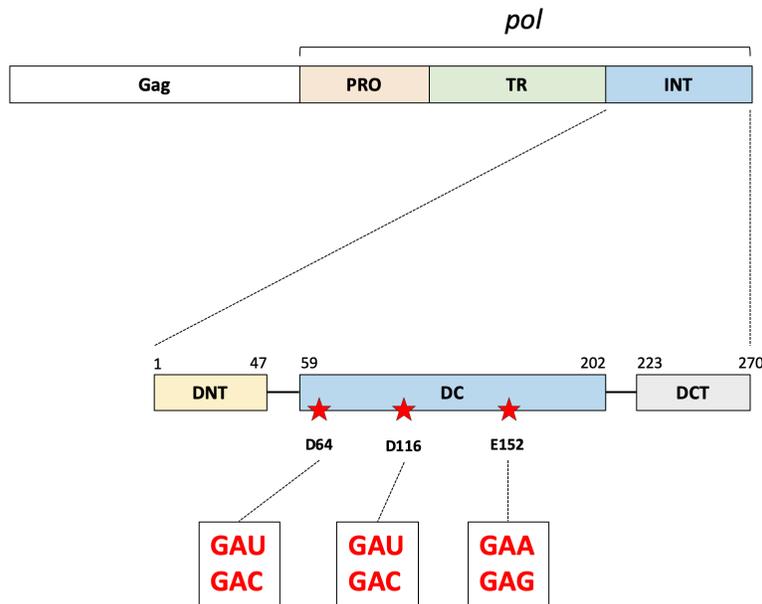


Figura 8. Integrasa viral. Representación esquemática del genoma del VIH en el gen *pol* que codifica para las enzimas del virus. La integrasa viral se compone de tres porciones DNT, DC y DCT. Los aminoácidos D64, D116 y E152 están conservados en la enzima y una mutación en estas localizaciones dan como resultado una enzima no funcional y el ciclo viral se interrumpe. PRO: proteinasa viral, TR: transcriptasa reversa, INT: integrasa, DNT: dominio N-terminal, DC: dominio catalítico, DCT: dominio C-terminal, D: ácido aspártico, E: ácido glutámico, G: guanosina, A: adenina, U: uracilo. *Imagen desarrollada por Fabián Mantilla.*

Vehiculización del sistema CRISPR/Cas

Algunos de los grandes problemas para CRISPR/Cas9 se presentan en la vehiculización del sistema (**Tabla 2**).

Tabla 2. Dificultades en la entrega de CRISPR/Cas9 en las células diana.

Dificultad	Aproximación	Referencia
Marcadores celulares	Los LTCD4 ⁺ en sangre periférica y en el tejido linfoide asociado a mucosas (MALT, <i>Mucosa Associated-Lymphoid Tissue</i>) positivos para los receptores CCR6 y CXCR3 (en estirpes Th1 y Th17), así como las células T CD4 ⁺ presentes en los ganglios linfáticos positivos para CXCR5 son los responsables de la persistencia del VIH en pacientes bajo TARV. Se ha observado un incremento en la expresión de CD30 al suspenderse el TARV y antes del rebote vírico. Un estudio identificó un paciente que recibió brentuximab vedotin, un anticuerpo monoclonal quimérico antitumoral, antagonista de CD30, por un linfoma cutáneo anaplásico. Tras 6 ciclos de tratamiento, no se detectó vDNA o vRNA en células mononucleares de sangre periférica. Esto sugiere que los LTCD4 ⁺ CD30 ⁺ serían células que recientemente han abandonado su estado de reposo y supondría postular a CD30 como diana para la identificación de células que promoverían la actividad transcripcional temprana del VIH.	43, 44, 45, 46, 47.
Vehiculización	Los candidatos más importantes son los vectores virales. Actualmente los virus adenoasociados (VAA) y los lentivirus son las herramientas disponibles para este propósito. Los VAA tienen ciertas limitaciones: su pequeño tamaño restringe la cantidad de secuencias exógenas que puede transportar, estos vectores no se	48, 49.

	<p>integran sino que mantienen varias copias en forma de plásmido por lo que la expresión es temporal; además, tienen un efecto inmunogénico importante. Por otro lado, los lentivirus permiten la integración en el genoma diana lo que generaría una expresión constante del sistema CRISPR/Cas pero esto, podría aumentar el riesgo de corte fuera de la secuencia objetivo y una exposición constante a elementos antigénicos.</p>	
Inmunogenicidad	<p>La respuesta inmune puede presentarse ante tres elementos: el vector, los transgenes y las proteínas resultado de la transcripción. Los VAA son partículas altamente inflamatorias pero evitar el uso de vehículos virales no resolvería el problema. Se ha probado el uso de ribonucleoproteínas (RNP) purificadas embebidas en liposomas y entregadas a través de la electroporación pero se ha observado una importante expresión de genes de la inmunidad innata que induce una mayor citotoxicidad mediada por LT. Los transgenes alojados en el vehículo pueden ser reconocidos por receptores intracelulares para DNA, y los gRNA presentan estructuras secundarias en horquilla que pueden unirse a PRR como TLR3, RIG-I y PKR y desencadenar una respuesta que conlleve a la destrucción de la célula hospedadora.</p>	50, 51.

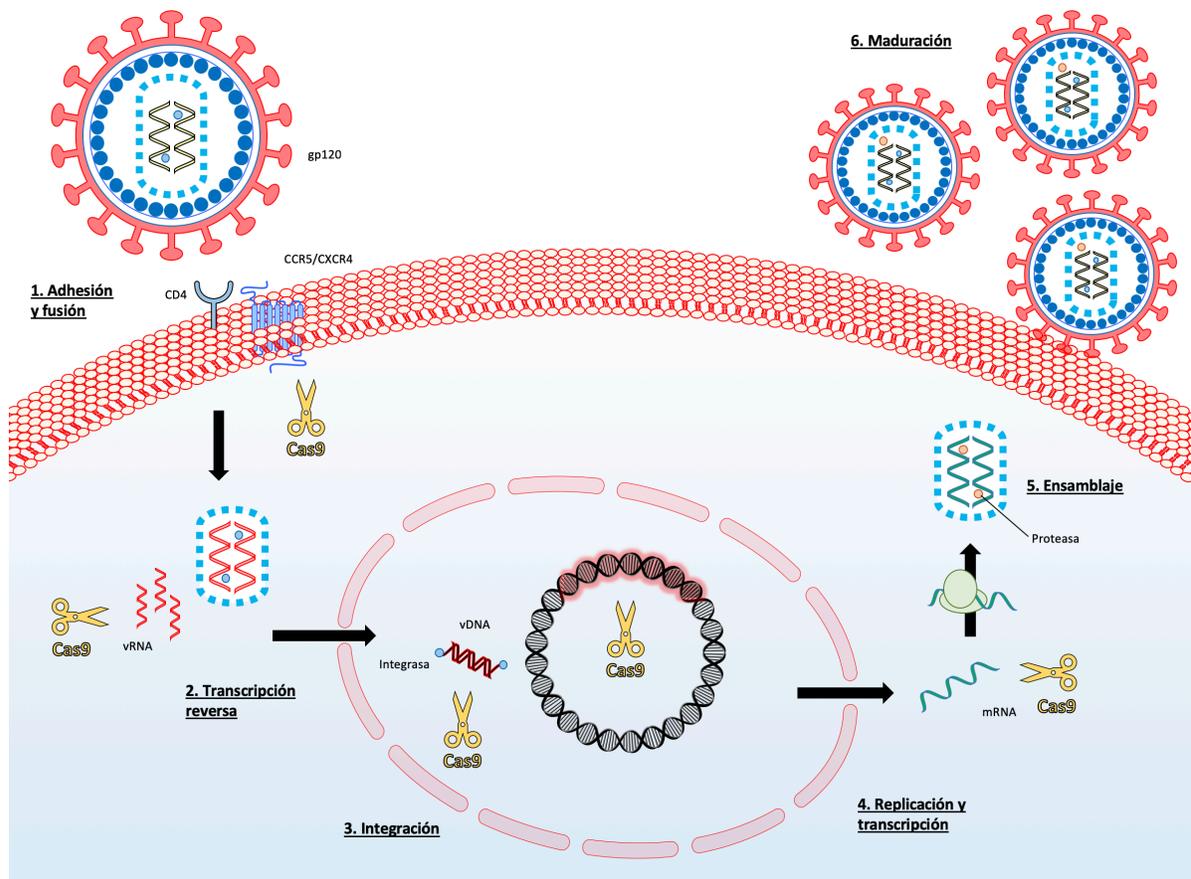


Figura 9. Aplicaciones del sistema CRISPR/Cas9 en el ciclo de vida del VIH. Se ilustran en la imagen los principales blancos terapéuticos a considerar para el sistema CRISPR/Cas9 en el ciclo del VIH. *Imagen desarrollada por Fabián Mantilla.*

DISCUSIÓN: PERSPECTIVAS Y CONSIDERACIONES FUTURAS

La terapia génica con CRISPR/Cas9 da inicio a una nueva era en la que modificar el genoma de cualquier organismo se puede lograr de una forma sencilla, rápida y económica. Aunque se investiga intensamente en este campo, existen varios retos a superar en la lucha contra el VIH. El principal obstáculo es la identificación de los reservorios ya que no hay marcadores específicos que permitan su localización. Además, los reservorios no solo son los LTCD4⁺. En estos momentos, cambiar la población linfocítica es la medida más efectiva. Si la definición de reservorio viral significa un estado de latencia, la eficacia del sistema CRISPR/Cas se vería obstaculizada por esta situación de baja actividad transcripcional. Se estudia la combinación de CRISPR/Cas con medicamentos que aumenten la expresión génica para exponer a las células infectadas y garantizar su erradicación; esta es la base de la terapia *shock and kill*. Resultaría conveniente estudiar la flexibilidad del sistema para que en la misma secuencia se codifique la información que lleve a la expresión de genes virales específicos en los reservorios y así se module su actividad transcripcional. Los gRNA deben diseñarse cuidadosamente para que dirijan de forma eficiente la edición del genoma del VIH y no secuencias propias de la célula hospedadora. Para este fin, usando herramientas bioinformáticas se pueden construir secuencias guía con alta afinidad para la diana viral y baja actividad fuera del blanco. Si bien CRISPR/Cas resulta muy específico, el riesgo de edición fuera de la secuencia objetivo supone un gran inconveniente. Los posibles resultados adversos son considerables. Un aspecto a considerar es la integración preferencial del VIH en zonas intrónicas del genoma. Esto hace suponer que cortes fuera de las dianas virales pero cercanos a ellas podrían desencadenar la formación de microRNA (miR) con los posteriores eventos celulares y sus inadvertidas consecuencias, ¿Podría DROSHA (maquinaria nuclear de edición por corte de cadenas dobles de hebras de RNA) unirse al RNA del complejo de reconocimiento y descomponerlo? Para esto, El uso de nickasas (versiones modificadas de Cas que rompen cadenas sencillas de DNA) con 2 gRNA diferentes que dirijan la nucleasa a la zona objetivo disminuiría la tasa de *off-targets*. Las dianas en los reservorios son los LTR por ser estos elementos, los más conservados en la secuencia del provirus.

Se debe trabajar arduamente en el desarrollo de sistemas de vehiculización más efectivos. Hoy resulta improbable llegar a todas las células infectadas por el VIH; primero, porque no se cuenta con un marcador específico y único que expresen las células afectadas; y

segundo, porque los métodos actuales como la vehiculización con AAV o lentivirus; y la transfección por electroporación, no entregan de forma homogénea las secuencias. El descubrimiento de enzimas más eficientes y que requieren de gRNA de menor tamaño como Cas12a (Cpf1) abre campo a la posibilidad de hacer más eficiente la entrega del sistema a la célula blanco y así superar algunas de las limitaciones que presenta CRISPR/Cas9.

Otra barrera a superar es la respuesta inmune que puede despertar CRISPR/Cas. Al igual que los vectores virales, los elementos moleculares del sistema son extraños y tanto los transgenes como los transcritos funcionales pueden desencadenar la destrucción de la célula tratada; limitando los alcances de la terapia génica y jugando en contra del beneficio del paciente. Reducir la respuesta inmune a través de la modificación química de los ácidos nucleicos sin que se afecte la expresión génica, aunque parece difícil, pueden ser vías a explorar. Estrategias que disminuirían la inmunogenicidad de las proteínas son la humanización de las nucleasas y la delección de los epítomos por bioingeniería. Cuando estas estrategias no funcionan, inmunosuprimir al paciente de forma selectiva y transitoria sería necesario.

La ética de la experimentación genética en seres humanos y animales se debe considerar antes de su aplicación. El nacimiento de dos bebés editadas genéticamente con CRISPR/Cas9 para la delección del gen *ccr5* y así hacerlas resistentes al VIH, provocó un importante revuelo a nivel mundial. Claramente, este trabajo no logró suplir los requerimientos éticos y carecía de toda razón pues quien tenía la enfermedad era el padre y con el uso de la terapia pre-exposición (PrEP) en la pareja serodiscordante, era virtualmente inexistente la probabilidad de transmisión a la madre y después a los fetos. Además, este experimento generó cambios en líneas germinales de las dos niñas, sanas, que serán transmitidos a generaciones futuras sin poderse advertir las consecuencias. Por último, recientemente se ha demostrado que la delección homocigota de *ccr5* se asocia con una expectativa de vida reducida a pesar de ser un fenotipo protector ante el VIH⁵².

CONCLUSIONES

La infección por el VIH representa una importante carga de morbimortalidad y sin lugar a dudas, la edición genómica con CRISPR/Cas9 resultaría considerablemente útil en la

terapia contra el VIH abriendo las puertas a nuevos horizontes que nos acercan más al día en que logremos erradicar esta enfermedad. El rápido avance en la elaboración de métodos de edición más específicos y con modelos de vehiculización más eficientes hacen aún más factible alcanzar esta meta. Considero que hoy día, la solución más efectiva es la extracción y modificación de las células hematopoyéticas del paciente para hacerlas resistentes suprimiendo *ccr5* y perfundiéndolas nuevamente (trasplante autólogo). Así se repoblaría la serie leucocitaria.

Propongo los siguientes elementos a considerar para el desarrollo de trabajos futuros que permitan evaluar la eficacia de CRISPR/Cas ex vivo o en pacientes VIH positivo:

1. El uso del sistema CRISPR/cpf1 para la edición del vDNA integrado en las células hospedadoras. Esto, por su mayor especificidad y facilidad en la vehiculización.
2. Los gRNA deben dirigirse a dos objetivos:
 - a. Los LTR por estar altamente conservados y ser los que inician la actividad transcripcional del provirus tanto en células activas como en los reservorios.
 - b. Los codones que codifican para los aminoácidos D64, D116 y E152 de la integrasa viral por ser estos altamente conservados y ser indispensables para el correcto funcionamiento de la enzima.
3. Los VAA deben ser los vehículos para transportar las secuencias del gRNA y la nucleasa Cas. El tamaño se adecua al genoma que se requiere y su expresión es temporal. La humanización de los elementos antigénicos del vector y las proteínas disminuirían el riesgo de fenómenos inflamatorios.
4. Las células diana son los LTCD4⁺CD30⁺ y esta terapia se debe instaurar justo después de suspenderse la TARV. Esto permite a los reservorios el aumento de la expresión de CD30⁺, y por lo tanto una entrega más competente del sistema CRISPR/Cas. La adecuación del vector con un CD30L aumentaría la entrega del sistema a las células diana.
5. De acuerdo a las condiciones del paciente se debe evaluar el uso concomitante de inhibidores de la histona desacetilasa ya que esto expondría el provirus y la acción de CRISPR/Cas se vería facilitada.

Después de tratar las células se debe instaurar la TARV para disminuir la tasa de replicación del vDNA residual y así aumentar las tasas de éxito. Es importante aclarar que conseguir la eliminación de la quasiespecie viral integrada, en los distintos puntos reseorios del

organismo, por CRISPR/Cas, en el momento es un reto mayor, que difícilmente podremos solventar para erradicar el VIH hasta que no seamos capaces de controlar completamente los *off-targets* de Cas, la selectividad y especificidad de corte en el genoma viral integrado e impedir que se induzcan mutaciones en el genoma proviral, editado de esta forma, que generen especies virales nuevas y más infectivas.

REFERENCIAS

1. Programa Conjunto de las Naciones Unidas sobre el VIH/SIDA (ONUSIDA). Monitoreo Global del Sida 2019. Indicadores para el seguimiento de la Declaración Política de las Naciones Unidas para poner fin al sida de 2016. Ginebra: ONUSIDA; 04 de diciembre de 2018.
http://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/global-aids-monitoring_es.pdf
2. The Joint United Nations Programme on HIV/AIDS (UNAIDS). State of the epidemic. In: UNAIDS Data 2018. Geneva: UNAIDS; 2018.
http://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/unaid-data-2018_en.pdf
3. Finzi D, Hermankova M, Pierson T, *et al.* Identification of a reservoir for HIV-1 in patients on highly active antiretroviral therapy. *Science*. 1997;278:1295-300.
4. Ghosn J, Taiwo B, Seedat S, Autran B, Katlama C. HIV. *Lancet*. 2018;392:685-97. doi: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31311-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31311-4)
5. Thenin-Houssier S, Valente S T. HIV-1 Capsid Inhibitors as Antiretroviral Agents. *Curr HIV Res*. 2016;14(3):270-82. doi: 10.2174/1570162X14999160224103555
6. Wang C, Cannon P. The clinical applications of genome editing in HIV. *Blood*. 2016;127:2546-52.
7. Doudna J A, Charpentier E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*. 2014;346:1258096. doi: 10.1126/science.1258096.
8. Matreyek K, Engelman A. Viral and cellular requirements for the nuclear entry of retroviral preintegration nucleoprotein complex. *Viruses*. 2013;5:2483-511.
9. Guenzel C, Herate C, Benichou S. HIV-1 Vpr - A still "enigmatic multitasker". *Frontiers in Microbiology*. 2014;5:127. doi: 10.3389/fmicb.2014.00127.
10. Brass A, Dykxhoorn D, Benita Y, Yan N, Engelman A, Xavier R. Identification of host proteins required for HIV infection through a functional genomic screen. *Science*. 2008;319(5865):921-6. doi: 10.1126/science.1152725.
11. Lusic M, Siliciano R. Nuclear landscape of HIV-1 infection and integration. *Nature Reviews*. 2017;15:69-82. doi: 10.1038/nrmicro.2016.162.
12. Schaller T, Ocwieja K, Price A, Brady T, Roth S, Hué S, *et al.* HIV-1 capsid-cyclophilin interactions determine nuclear import pathway, integration targeting and replication efficiency. *PLOS Pathogens*. 2011;7(12):e1002439. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002439>.
13. Arhel N, Souquere-Besse S, Munier S, Souque P, Guadagnini S, Rutherford S, *et al.* HIV-1 DNA Flap formation promotes uncoating of the pre-integration complex at the nuclear pore. *EMBO J*. 2007;26(12): 3025-37.
14. Sherrill-Mix S, Lewinski M, Famiglietti M, Bosque A, Malani N, Ocwieja E, *et al.* HIV latency and integration site placement in five cell-based models. *Retrovirology*. 2013;10:90. doi: <https://doi.org/10.1186/1742-4690-10-90>.
15. Landau N R. The innate immune response to HIV-1: To sense or not to sense. *DNA and Cell Biology*. 2014;33(5):271-274.
16. Hrecka K, Hao C, Gierszewska M, Swanson S K, Kesick-Brodacka M, Srivastava S, *et al.* Vpx relieves inhibition of HIV-1 infection of macrophages mediated by SAMHD1 protein. *Nature*. 2011;474:658-61.
17. Lahaye X, Satoh T, Gentili M, Cerboni S, Conrad C, Hurbain I, *et al.* The capsids of HIV-1 and HIV-2 determine immune detection of the viral cDNA by the innate sensor cGAS in dendritic cells. *Immunity*. 2013;39:1132-42.
18. Rasaiyaah J, Tan C P, Fletcher A J, Price A J, Blondeau C, Hilditch L, *et al.* HIV-1 evades innate immune recognition through specific cofactor recruitment. *Nature*. 2013;503:402-5. doi: 10.1038/nature12769.

19. Barber S A, Gama L, Dudaronek J M, Voelker T, Clements J E. Mechanism for the establishment of transcriptional HIV latency in the brain in a simian immunodeficiency virus-macaque model. *J Infect Dis*. 2006;193(7):963-70. doi: 10.1086/500983.
20. Williams S, Cheng L F, Kwon H, Ruiz-Jarabo C, M, Verdin E, Greene W. NF- κ B p50 promotes HIV latency through HDAC recruitment and repression of transcriptional initiation. *The EMBO Journal*. 2006;25:139-49. doi: 10.1038/sj.emboj.7600900.
21. Shirakawa K, Chavez L, Hakre S, Calvanese V, Verdin E. Reactivation of latent HIV by histone deacetylase inhibitors. *Trends Microbiol*. 2013;21:277-85. doi: 10.1016/j.tim.2013.02.005.
22. Jansen R, van Embden J D, Gaastra W, Schouls L. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Molecular Microbiology*. 2002;43(6):1565-75.
23. Mojica F J, Díez-Villaseñor C, Soria E, Juez G. Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of archaea, bacteria and mitochondria. *Molecular Microbiology*. 2000;36(1):244-6.
24. Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, Amemura M, Nakata A. Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J Bacteriol*. 1987;169(12):5429.
25. Pourcel C, Salvignol G, Vergnaud G. CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies. *Microbiology*. 2005;151(3):653-63.
26. Bolotin A, Quinquis B, Sorokin A, Erhlich S D. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology*. 2005;151(8):2551-61.
27. Mojica F J, Díez-Villaseñor C, García-Martínez J, Soria E. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *J Mol Evol*. 2005;60(2):174-82.
28. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna J A, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*. 2012;337(6096):816-21. doi: 10.1126/science.1225829.
29. Mali P, Esvelt K, Church G. Cas9 as a versatile tool for engineering biology. *Nat Methods*. 2013;10:957-63. doi: <https://dx.doi.org/10.1038/nmeth.2649>.
30. Dean M, Carrington M, Winkler C, Huttley G A, Smith M W, Allikmets R, *et al*. Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the *CCR5* structural gene. Hemophilia Growth and Development Study, Multicenter AIDS Cohort Study, Multicenter Hemophilia Cohort Study, San Francisco City Cohort, ALIVE Study. *Science*. 1996;273(5283):1856-1862.
31. Hutter G, Nowak M, Mossner S, Ganepola A, Mussig K, Allers T, *et al*. Long-term control of HIV by *CCR5* Δ 32/ Δ 32 stem-cell transplantation. *N Engl J Med*. 2009;360(7):692-8.
32. Gupta R, Abdul-Jawad S, McCoy L, Ping H, Peppas D, Salgado M. HIV-1 remission following *CCR5* Δ 32/ Δ 32 haematopoietic stem-cell transplantation. *Nature*. 2019. doi: 10.1038/s41586-019-1027-4.
33. Durrant D, Daniels B, Pasiaka T, Dorsey D, Klein R. *CCR5* limits cortical viral loads during West Nile virus infection of the central nervous system. *J Neuroinflammation*. 2015;12:233. doi: 10.1186/s12974-015-0447-9.
34. Lim J, Murphy P. Chemokine control of West Nile virus infection. *Exp Cell Res*. 2011;317(5):569-74.
35. Falcon A, Cuevas M, Rodriguez-Frandsen A, Reyes N, Pozo F, Moreno S, *et al*. *CCR5* deficiency predisposes to fatal outcome in influenza virus infection. *J Gen Virol*. 2015;96:2074-8. doi: 10.1099/vir.0.000165.
36. Majka M, Ratajczak M Z. Biological role of the *CXCR4*-*SDF-1* axis in normal human hematopoietic cells. *Methods Mol Biol*. 2006;332:103-14.

37. Wysoczynski M, Reza R, Ratajczak J, Kucia M, Shirvaikar N, Honczarenko M, *et al.* Incorporation of CXCR4 into membrane lipid rafts primes homing-related responses of hematopoietic stem/progenitor cells to an SDF-1 gradient. *Blood*. 2005;105:40-8.
38. Melià M J, Kubota A, Ortolano S, Vílchez J J, Gámez J, Tanji K, *et al.* Limb-girdle muscular dystrophy 1F is caused by a microdeletion in the transportin 3 gene. *Brain*. 2013;136(5):1508-17. doi: 10.1093/brain/awt074.
39. Hu W, Kaminski R, Yang F, Zhang Y, Cosentino L, Li F, *et al.* RNA-directed gene editing specifically eradicates latent and prevents new HIV-1 infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(31):11461-6.
40. Zhu W, Lei R, Le Duff Y, Li J, Guo F, Wainberg M A, *et al.* The CRISPR/Cas9 system inactivates latent HIV-1 proviral DNA. *Retrovirology*. 2015;12(1):22.
41. Wang G, Zhao N, Berkhout B, Das A. CRISPR-Cas based antiviral strategies against HIV-1. *Virus Research*. 2018;244:321-32.
42. Wang Z, Pan Q, Gendron P, Zhu W, Guo F, Cen S, *et al.* CRISPR/Cas9-Derived mutations both inhibit HIV-1 replication and accelerate viral escape. *Cell Rep*. 2016;15(3):481-9.
43. Luther S A, Cyster J G. Chemokines as regulators of T cell differentiation. *Nat Immunol*. 2001;2:102-7.
44. Gosselin A, Salinas T R, Planas D, *et al.* HIV persists in CCR6+CD4+ T cells from colon and blood during antiretroviral therapy. *AIDS*. 2017;31:35-48.
45. Banga R, Procopio F A, Ruggiero A, *et al.* Blood CXCR3+ CD4 T cells are enriched in inducible replication competent HIV in aviremic antiretroviral therapy treated individuals. *Front Immunol*. 2018;9:144.
46. Fromentin R, Bakeman W, Lawani M B, *et al.* CD4+ T cells expressing PD-1, TIGIT and LAG-3 contribute to HIV persistence during ART. *PLoS Pathog*. 2016;12:e1005761.
47. Banga R, Procopio F A, Noto A, *et al.* PD-1+ and follicular helper T cells are responsible for persistence HIV-1 transcription in treated aviremic individuals. *Nat Med*. 2016;22:754-61.
48. Hogan L E, Vásquez J, Hobbs K S, *et al.* Increased HIV-1 transcriptional activity and infectious burden in peripheral blood and gut-associated CD4+ T cells expressing CD30. *PLoS Pathog*. 2018;14:e1006856.
49. Deng Q, Zisheng C, Lei S, Huafeng L. Developmental progress of CRISPR/Cas9 and its therapeutic applications for HIV-1 infection. *Rev Med Virol*. 2018;28(5):e1998. doi: 10.1002/rmv.1998.
50. Chew W L, Tabebordbar M, Cheng J K, Mali P, Wu E Y, Ng A H, *et al.* A multifunctional AAV-CRISPR-Cas9 and its host response. *Nat methods*. 2016;13:868-74.
51. Chew W L. Immunity to CRISPR Cas9 and Cas12a therapeutics. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*. 2018;10(1):1-23. doi: 10.1002/wsbm.1408.
52. Wei X, Nielsen R. *CCR5-Δ32* is deleterious in the homozygous state in humans. *Nature medicine*. doi:10.1038/s41591-019-0459-6, 2019.