CRISPR-Cas9 knockout de co-receptores CCR5 y CXCR4 como estrategia para disminuir la susceptibilidad de reconocimiento de linfocitos T CD4+ a VIH-1

Universidad Marista de Mérida[1]

Alan Avalos Burgos,[1] Eduardo José Figueroa Gómez,[1] Ana Lucia Patrón Anchondo,[1] Mariana Segura Herrera[1]

INTRODUCCIÓN

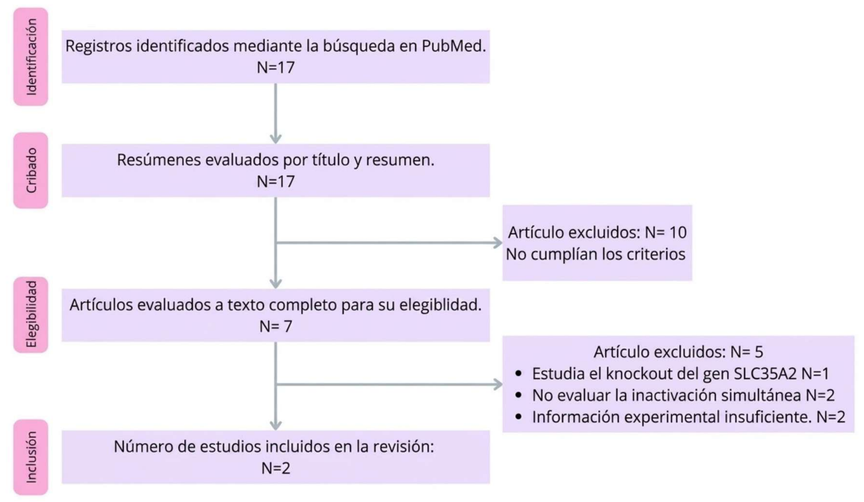
El Virus de la Inmunodeficiencia Humana tipo 1 **(VIH-1)** infecta los **linfocitos T CD4+** mediante la unión de gp120 a CD4 y a un co-receptor, **CCR5 o CXCR4**.[1] La terapia antirretroviral combinada (TAR) controla la replicación, pero no elimina el reservorio latente y debe mantenerse de por vida.[1] **CRISPR-CAS9** es una estrategia potencial para inactivar estos co-receptores y reducir la susceptibilidad a la infección.

OBJETIVO

Describir el desarrollo de CRISPR-Cas9 para generar knockout de co-receptores CCR5 y CXCR4 como estrategia para disminuir la susceptibilidad de reconocimiento de linfocitos T CD4+ a VIH-1.

MÉTODOS

Revisión literaria **descriptiva, transversal y retrospectiva** de publicaciones de PubMed entre 2015 y 2026 mediante la búsqueda HIV-1 AND CRISPR-Cas9 AND CCR5 AND CXCR4.



RESULTADOS

1 . *Desarrollo y Evaluación del Vector Lentiviral*

Se seleccionaron los sgRNA **sgX4-2** y **sgR5-H**, que fueron empaquetados en **células HEK293T** para generar los vectores lentivirales **LV-X4R5**.[2] La eficiencia de edición, evaluada mediante el ensayo Surveyor, fue de **24.4 %** para CXCR4 y **48.2 %** para CCR5 en células GHOST X4R5, y de **9.6 %** y **12.6 %**, respectivamente, en linfocitos T CD4+ primarios.[2] (fig. 1)

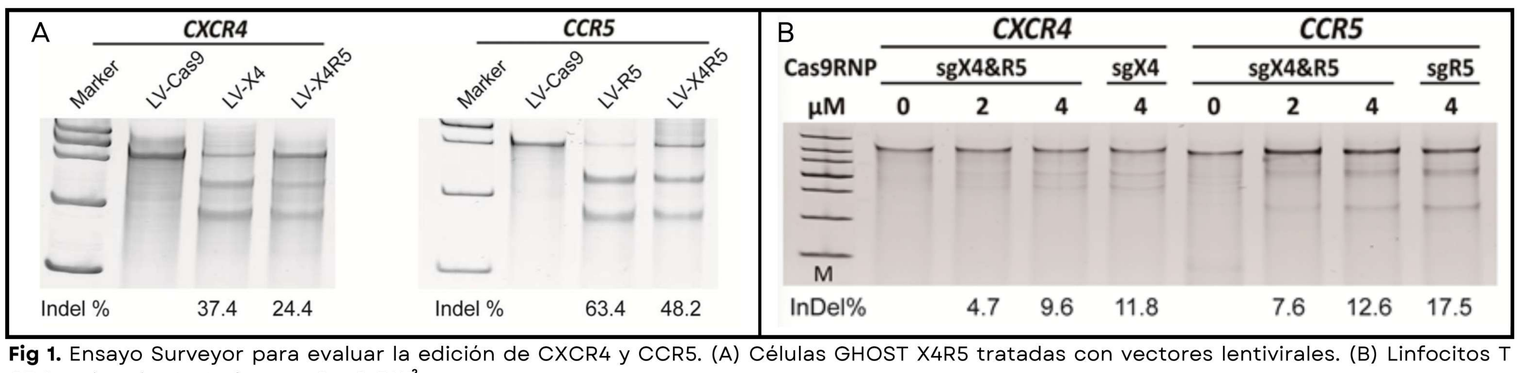


Fig 1. Ensayo Surveyor para evaluar la edición de CXCR4 y CCR5. (A) Células GHOST X4R5 tratadas con vectores lentivirales. (B) Linfocitos T CD4+ primarios tratados con Cas9-RNP[3]

2 . Pruebas en Modelos Celulares

Tras confirmar la formación de indels, la expresión de CCR5 y CXCR4 se evaluó mediante Western blot, observándose una reducción de ambos co-receptores en células.[2] **La disminución fue más pronunciada para CCR5**[2] (fig.2)

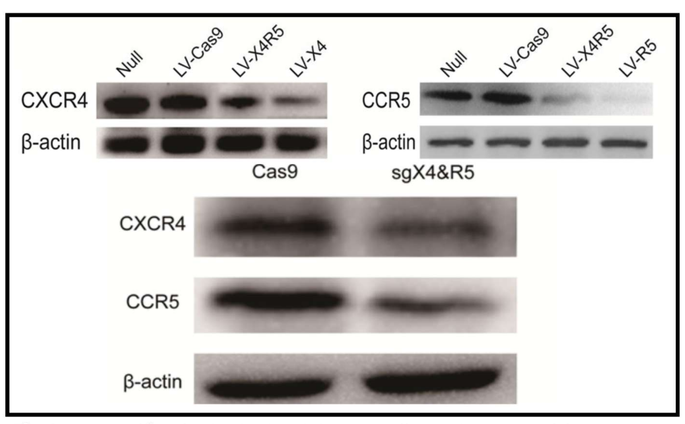


***Fig 2**. Expresión de CXCR4 y CCR5 mediante Western blot. (A) Células GHOST X4R5 tratadas con vectores lentivirales. (B) Linfocitos T CD4+ tratados con Cas9.*[2]

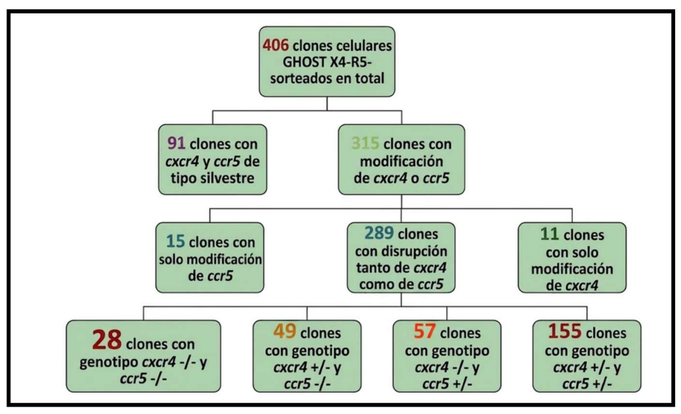


***Fig 3**. Clasificación de clones secuenciados según la disrupción génica individual o dual y el tipo de modificación genética (heterocigota u homocigota).*[2]

Susceptibilidad con Serotipos de VIH-1

La susceptibilidad al VIH-1 se evaluó mediante la cuantificación de **p24** por ELISA tras la infección con variantes de tropismo **R5 (YU-2)** y **X4 (NL4-3)**.[2] La edición dual de CCR5 y CXCR4 produjo una mayor reducción de la replicación viral que la modificación individual.[2] (figs. 4,5)

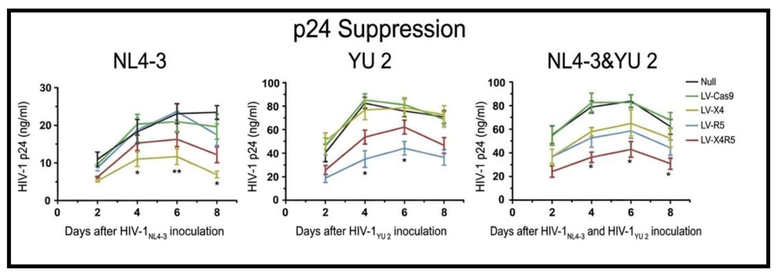


***Fig 4**. Concentración de p24 en células GHOST X4R5 posterior a la infección con VIH-1 NL4-3 (X4), YU-2 (R5) o ambas.*[2]

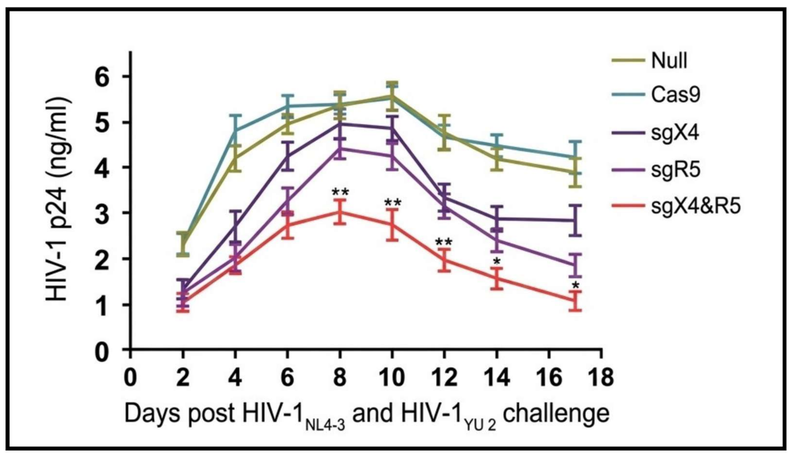


***Fig 5**. Concentración de p24 en linfocitos T CD4+ primarios posterior al desafío simultáneo con VIH-1 NL4-3 y YU-2.*[2]

3 . Pruebas en Modelos Animales

Tras la edición dual de CCR5 y CXCR4, la población de linfocitos T CD4+ doble negativa aumentó del 32 % al 85 %.[3] (fig.6, 7) Después de 56 días del trasplante, la distribución celular fue comparable en sangre periférica, bazo y pulmones, pero **disminuyó significativamente en la médula ósea** (fig. 8), posiblemente debido a la pérdida de CXCR4.[3]

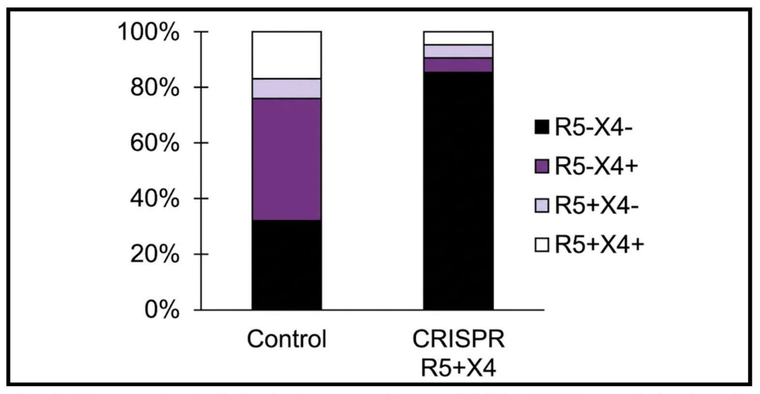


***Fig 6**. Citometría de flujo de la expresión de CCR5 y CXCR4 en linfocitos T CD4+ posterior a la edición, la población doble negativa (CCR5-CXCR4-) aumento de ~32% a ~85%.*[3]

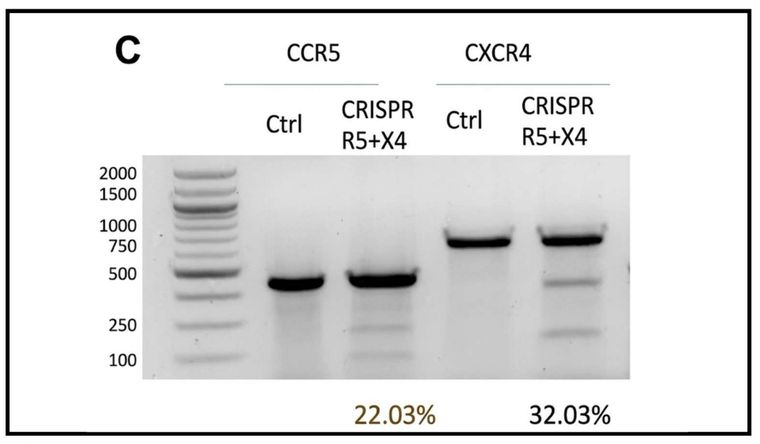


Fig 7. Ensayo Surveyor posterior a la electroporación con Cas9-RNP: La presencia de bandas adicionales indica indels, con disrupcion del 22 en CCR5 y 32% en CXCR4.[3]

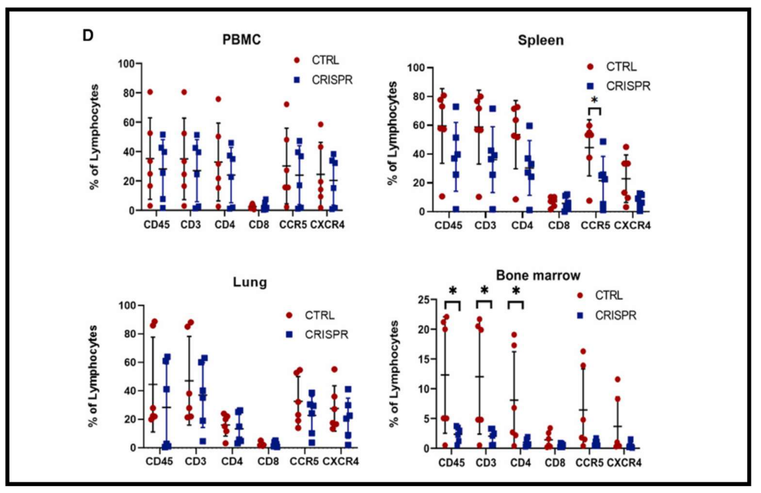


Fig 8. Biodistribución en ratones NSG hu-PBMC. La presencia celular fue comparable entre grupos, salvo en médula ósea, donde CD45+, CD3+ y CD4+ disminuyeron significativamente.[3]

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

La inactivación simultánea de CCR5 y CXCR4 ofrece una protección más amplia frente a variantes del VIH-1. Sin embargo, su eficacia está limitada por la eficiencia de edición, ya que pocos clones presentaron la inactivación de ambos alelos de los dos genes.[2] (fig.2) Además, el knockout de CCR5 fue más eficiente que el de CXCR4, cuya pérdida puede afectar la migración y distribución de los linfocitos, especialmente en la médula ósea.[3] A pesar de estas limitaciones, esta estrategia es prometedora y podría combinarse con la terapia antirretroviral (TAR) y la edición del ADN proviral para abordar tanto la prevención de nuevas infecciones como el reservorio latente del VIH-1.

REFERENCIAS

1. Delgado R. Características virológicas del VIH. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2011;29(1):58-65. doi:10.1016/j.eimc.2010.10.001.
2. Yu S, Yao Y, Xiao H, Li J, Liu Q, Yang Y, et al. Simultaneous knockout of CXCR4 and CCR5 genes in CD4+ T cells via CRISPR/Cas9 confers resistance to both X4- and R5-tropic human immunodeficiency virus type 1 infection. Hum Gene Ther. 2018;29(1):51-67. doi:10.1089/hum.2017.032.
3. Li S, Holguin L, Burnett JC. CRISPR-Cas9-mediated gene disruption of HIV-1 co-receptors confers broad resistance to infection in human T cells and humanized mice. Mol Ther Methods Clin Dev. 2022;24:321-331.