

## Biología molecular del virus de la inmunodeficiencia humana y los recientes progresos en el tratamiento del SIDA

Lautaro Pérez S.<sup>1</sup>

### Resumen

El virus de inmunodeficiencia humana (VIH), causante del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), ha constituido desde su emergencia hace 2 décadas, un enorme desafío a la investigación biomédica. Utilizando una amplia gama de recursos para interferir y evadir la respuesta inmune normal, infecta las células CD4<sup>+</sup>, ingresa a ellas a través de sus receptores de superficie, y expresa una alta frecuencia de mutación lo que le permite cambiar repetidamente sus determinantes antigénicos. Los VIH tipo 1 y 2 corresponden a lentivirus, los cuales, junto a los oncornavirus y espumavirus integran la familia de retrovirus RNA humanos. En este artículo se revisan los conocimientos actuales de la biología molecular del virus, se comentan modernas técnicas de diagnóstico como la reacción de transcriptasa reversa y polimerasa en cadena, usadas actualmente para medir la replicación del virus en la sangre del huésped infectado, y se discuten las actuales líneas de tratamiento exploradas, las que básicamente se dirigen a blancos moleculares susceptibles de intervención farmacológica que no afecten la funcionalidad celular, como son la interacción virus-receptor celular, transcripción reversa del RNA viral, integración del provirus, procesamiento proteolítico del precursor gag-pol, y la regulación transcripcional virus específica por los productos tat y rev. Finalmente se comentan aspectos relacionados a la investigación en el campo de la inmunización VIH, desafío pendiente para la primera década de este nuevo siglo.

(**Palabras clave:** virus de inmunodeficiencia humana, VIH, SIDA, retrovirus, RNA.)

### Molecular biology of HIV and recent progress in the treatment of AIDS

*HIV, the causal agent of AIDS, has caused since its emergence 2 decades ago, an enormous challenge for biomedical investigation. Utilising a wide spectrum of mechanisms to interfere with and evade the normal immune response it infects the CD4 lymphocytes via surface receptors. By expressing a high frequency of mutation this allows the virus to repeatedly change its antigenic determinants. HIV types 1 and 2 are lentiviruses, and together with oncornaviruses and espumaviruses form the family of human RNA retroviruses. This article focuses on the current status of the viral molecular biology, the modern diagnostic techniques, such as reverse transcriptase and PCR used to measure viral replication in the infected host. We discuss the lines of treatment explored, which are directed at molecular targets susceptible to pharmacological intervention and which does not affect cellular function. Such as virus-receptor interaction, reverse transcriptase of viral RNA, proviral integration, proteolytic processing of the precursor gag-pol and viral specific transcriptional regulation for the products tat and rev. Finally we discuss aspects in the field of anti-HIV immunisation, a pending challenge in the first decade of the 21st century.*

(**Key words:** HIV, AIDS, retrovirus, RNA.)

Desde su emergencia hace 20 años, el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) ha sido uno de los agentes infecciosos más

estudiados, lográndose importantes avances en el conocimiento de la biología molecular y patogenia de este retrovirus humano. El VIH, causante del síndrome de la inmunodeficiencia adquirida (SIDA), es un paradigma del agente infeccioso que utiliza todos los mecanismos de evasión de la respuesta in-

1. Ph.D. Profesor Asistente. Programa de Virología, Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

mune: infecta las células CD4<sup>+</sup> del sistema inmune cuya función es la presentación de antígenos; ingresa a las células utilizando receptores de superficie que participan en la respuesta inmunológica como la molécula CD4 y los componentes de la familia de receptores de quimioquinas (CXCR4, CCR5 y CCR3) y posee una alta frecuencia de mutación que le permite cambiar sus determinantes antigénicos. En este artículo revisaremos los avances más recientes logrados en el conocimiento de la biología molecular del SIDA.

Las tres clases de retrovirus humanos: oncornavirus, lentivirus y espumavirus, están integrados por virus RNA cubiertos con una envoltura de composición muy similar a la membrana celular. Los virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 y 2 (VIH-1 y VIH-2, respectivamente) se clasifican como lentivirus por tener una organización genómica y por producir patologías similares a otros miembros de esta subfamilia, como el virus caprino Visna/Maevi.

El genoma de los retrovirus, un RNA de simple hebra, se replica a través de un proceso único. La enzima transcriptasa reversa, un producto viral, cataliza el ciclo de replicación tan peculiar de estos virus al convertir el RNA genómico en un DNA de doble hebra denominado provirus. Otro producto viral, la enzima integrasa, incorpora el provirus al genoma celular, integración que constituye un evento esencial para la expresión de los genes virales, ya que además de permitir a los retrovirus persistir en las células de por vida, también contribuye a la extensa latencia que caracteriza las enfermedades producidas por los retrovirus humanos.

El VIH-1 (figura 1) es una partícula icosaédrica de 110 nm de diámetro, con un core central de forma cilíndrica rodeada por una bicapa de lípidos y proteínas (envoltura) que contiene el RNA viral. El genoma del VIH contiene los genes *gag*, *pol* y *env* flanqueados por terminaciones largas repetidas (LTR) donde se ubican los elementos regulatorios que dirigen la expresión viral. El gen *gag* (antígenos grupo específico) codifica para productos que forman el esqueleto del virión; el gen *pol* (polimerasa) para las enzimas esenciales de la replicación: transcriptasa reversa, integrasa y una proteasa que procesa los precursores *gag-pol*; el gen *env* (envoltura) codifica para las glicoproteínas de superficie SU y de transmembrana TM.

Estas glicoproteínas son los productos virales más superficiales y más antigénicos de la partícula viral, los cuales participan en la unión a los receptores celulares y en la penetración del virus a la célula.

El producto primario del gen *gag* es una poliproteína que es procesada por la proteasa viral en los siguientes componentes estructurales del virus: la proteína matrix (MA/p17) que se asocia en un icosaedro inmediatamente por debajo de la envoltura viral; la proteína cápsula (CA/p24), que forma el core central, y la proteína nucleocápsula (NC/p9-6) que se asocia con dos copias del genoma viral en el interior del core. El producto primario del gen *pol* es una poliproteína que contiene además de las secuencias del gen *gag*, las siguientes enzimas: una proteasa (Pro), una DNA polimerasa RNA-dependiente (RT, por retrotranscripción del RNA genómico en DNA), una endonucleasa (actividad de tipo ribonucleasa H) y la enzima integrasa (IN, por integración del provirus). El producto primario del gen *env* es una glicoproteína precursora, gp160, la cual es procesada por enzimas celulares en las subunidades SU/gp120 y TM/gp41. Ambos productos son componentes de las espículas presentes en la envoltura viral y participan en la adsorción y penetración viral.

A través de un proceso de edición (*splicing* diferencial) de los mRNAs del VIH codificantes para *gag*, *pol* y *env*, se obtienen una serie de proteínas regulatorias, algunas de ellas esenciales para la replicación del virus. Estas proteínas se dividen en productos tempranos y tardíos. Las proteínas regulatorias tempranas son los productos de los genes *tat*, *rev* y *nef*, siendo solo las dos primeras esenciales para el virus. Las proteínas regulatorias tardías son productos de los genes *vif* y *vpu*, esta última exclusiva de VIH-1. Completan las proteínas accesorias los productos de los genes *vpr* y *vpx*, la que solo está presente en VIH-2. En conjunto estas proteínas modulan la eficiencia de la replicación viral; la proteína Tat incrementa la transcripción de los genes virales en varios órdenes de magnitud y tiene un rol modulador sobre ciertos genes celulares, como los del complejo mayor de histocompatibilidad; el producto Rev modula el procesamiento y transporte de los RNA mensajeros que codifican para los componentes del virión, Nef modula la expresión del receptor CD4 y facilita la replicación viral y patogéne-

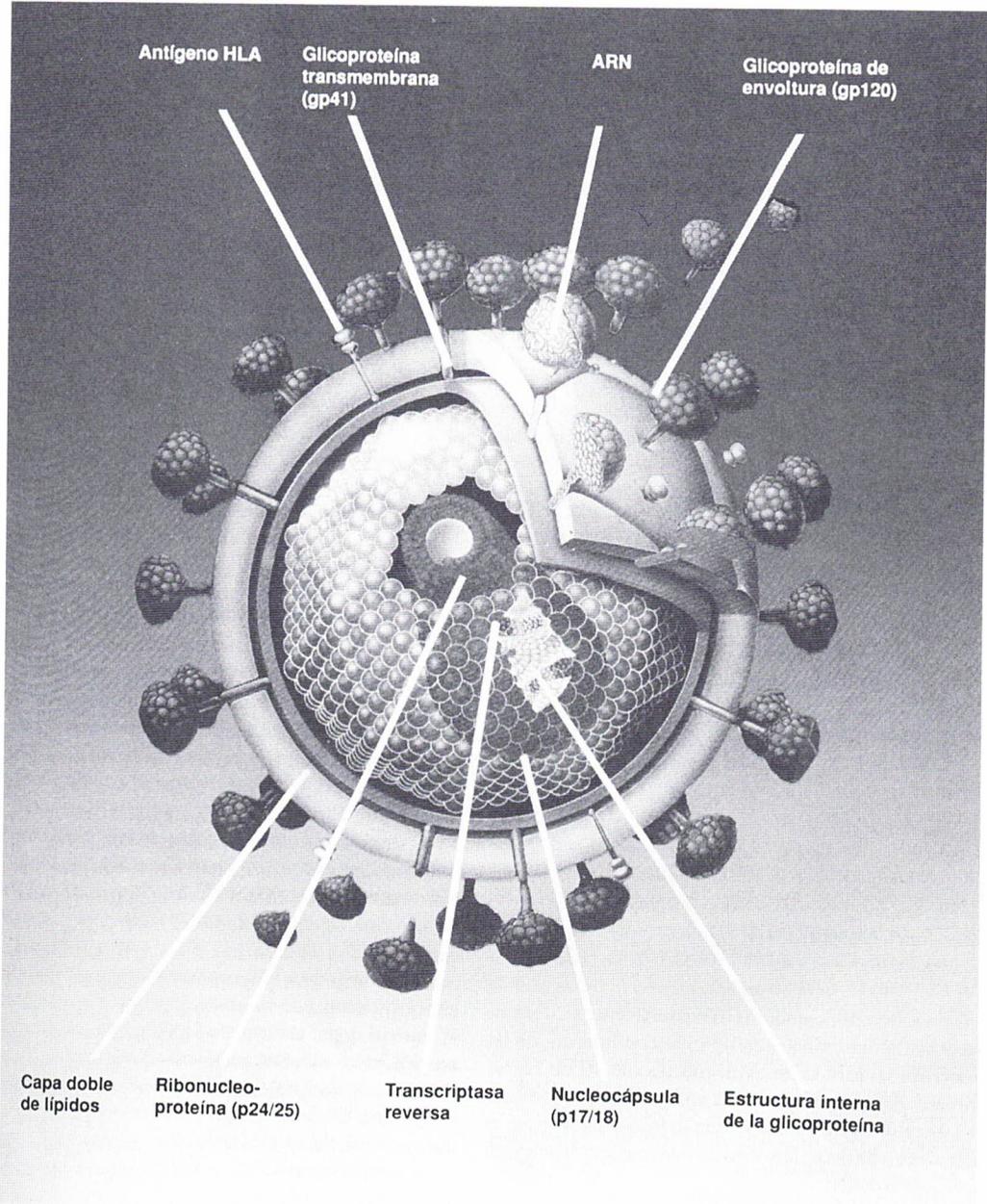


Figura 1. Estructura del VIH.

sis *in vivo*; Vif modula la infectividad; Vpu en VIH-1 y su equivalente Vpx en VIH-2, aumentan la maduración y liberación de los viriones y finalmente, Vpr facilita la replicación viral en ciertos tipos de células.

Se han logrado progresos considerables en los aspectos moleculares de la replicación del VIH y también en aspectos críticos de la patogénesis del SIDA, avances que se

han obtenido gracias a la implementación de métodos rápidos, sensibles y altamente precisos que miden directamente los niveles de virus circulante en la sangre. Una versión cuantitativa de la reacción de transcriptasa reversa y polimerasa en cadena, en la cual unas pocas moléculas de RNA se convierten en DNA y estas se amplifican por una polimerasa termoestable (RT-PCR), permite de-

tectar en sangre y otros fluidos el número de copias de genoma viral libre, con una sensibilidad de hasta 50 moléculas de RNA (25 partículas virales) por mililitro de muestra. Debido a que la tasa de eliminación de virus libre de la sangre es totalmente independiente del estado de la enfermedad y que la vida media de las partículas es de pocas horas, el nivel de RNA viral en el plasma o carga viral, refleja la tasa de producción de nuevos virus. Como resultado, médicos e investigadores en este campo tienen la capacidad de medir, en forma precisa, la velocidad de replicación del VIH en el huésped, una posibilidad disponible para muy pocas enfermedades infecciosas. El análisis de la dinámica del virus en plasma en distintos estados de la enfermedad y en respuesta a terapias antirretrovirales, ha permitido avanzar considerablemente en el entendimiento del mecanismo de depleción de las células CD4, la eficacia de las terapias antivirales, la naturaleza de los reservorios virales y la factibilidad de que terapias prolongadas puedan conducir a la erradicación del virus.

La necesidad de un tratamiento efectivo para individuos infectados con VIH ha motivado la búsqueda exhaustiva de blancos moleculares potencialmente útiles para una intervención farmacológica. Entre los procesos virales que no afectan la funcionalidad celular se encuentran: la interacción virus-receptor celular, la transcripción reversa del RNA viral, la integración del provirus, el procesamiento proteolítico del precursor gag-pol y la regulación transcripcional virus específica por los productos Tat y Rev. Debido al conocimiento incompleto de la patogenia del VIH, ha sido difícil predecir, a partir de la información preclínica limitada, la efectividad relativa de inhibidores dirigidos a algunos de estos blancos, sin embargo, se ha comprobado la predicción inicial, referida a que la inhibición de la replicación viral *in vivo* resultaría en una disminución de la carga viral en el paciente. La replicación viral continua y la rápida eliminación de las partículas virales que caracteriza la infección por VIH, determinan que incluso una modesta inhibición de la replicación viral, reduzca la carga viral y aumente las células CD4<sup>+</sup>, lo que se refleja en un beneficio clínico. La alta tasa de replicación de VIH (10<sup>12</sup> partículas por día) y la gran frecuencia de error de la transcriptasa reversa, resultan en la rápida emergencia de variantes resistentes a los anti-

virales. Este problema se ha observado con todos los compuestos probados clínicamente hasta la fecha y se ha reducido significativamente gracias a una combinación de inhibidores de transcriptasa reversa y de proteasa viral. Esta estrategia terapéutica reduce considerablemente la carga viral por más de un año en la mayoría de los pacientes.

Existen dos clases de fármacos inhibidores de la transcriptasa reversa: los análogos de nucleósidos y los no análogos de nucleósidos. Los primeros son activados metabólicamente en las células por fosforilación; una vez activados, estos análogos funcionan como terminadores de la polimerización. A este grupo pertenecen la 3'-ácido-3'-deoxitimidina (AZT) y el 2', 3'-didehidro-3'-deoxitimidina (d4T), derivados de nucleósido desoxitimidina; el 2', 3'-dideoxicitidina (ddC) y (-)-2'-deoxi-3'-thiacitidina (3TC) que derivan del nucleósido desoxicitidina, y la dideoxiinosina (ddI) que deriva de la desoxiguanosina. Aun cuando todos estos compuestos están licenciados para el tratamiento de la infección por HIV-1 en humanos, los mejores resultados se han obtenido con las terapias que combinan AZT y 3TC. Esta combinación reduce eficientemente la carga viral y aumenta las células CD4<sup>+</sup> con una menor toxicidad para el paciente, debido en parte, a la dificultad de selección de virus resistentes a ambas drogas. Quizás el resultado más promisorio del uso del análogo AZT ha sido la reducción de la transmisión materno-infantil, pues la administración de esta droga a las madres HIV-positivas en los últimos meses de embarazo y durante las 6 primeras semanas de vida al recién nacido, ha reducido la frecuencia de transmisión viral en casi un 70%. Hasta la fecha esta es la intervención clínica más exitosa de una terapia antirretroviral. Los resultados alentadores obtenidos con una combinación de drogas más efectiva, sugieren que en el futuro se podría prevenir por completo la transmisión materno-infantil.

Los inhibidores no análogos de nucleósidos son estructuralmente diversos pero todos inhiben la transcriptasa viral en forma no competitiva y específica. A diferencia de los análogos de nucleósidos no necesitan ser activados por fosforilación y son bien tolerados. Entre los compuestos aprobados para su uso en humanos se encuentran: nevirapina, 9-cloro tibo, las pyridonas; L697 y L661, delaverdina, y a-APA R89439. Aun-

que la emergencia de resistencia a estas drogas se produce rápidamente, en combinación son muy efectivos y constituyen una alternativa en pacientes en quienes la terapia exclusiva con análogos de nucleósidos ha perdido efectividad.

Estudios que alteraban el sitio activo de la proteasa viral de VIH-1, demostraron que estas modificaciones de la enzima resultaban en la producción de viriones inmaduros no infecciosos. Estos hallazgos inspiraron la generación de modelos computacionales basados en la estructura cristalográfica de la enzima, lo que ha permitido la producción de potentes inhibidores de la proteasa viral. Entre los autorizados para su uso en humanos destacan: ritonavir, indinavir, saquinavir, y delfinavir. Estudios clínicos con estos compuestos han demostrado que son capaces de suprimir profundamente la carga viral, pero que invariablemente generan resistencia, al igual que los inhibidores de la RT, más aún, la selección de virus resistentes a un inhibidor de la proteasa puede producir variantes con resistencia cruzada a otro inhibidor.

La disponibilidad de una variedad de drogas que afecten drásticamente la replicación de VIH-1 y la aparición de resistencia a estas drogas son factores importantes en la decisión de un régimen terapéutico eficaz. Hasta el momento todos los antivirales efectivos utilizados en monoterapia desarrollan resistencia, por lo tanto para una supresión efectiva de la replicación viral se requiere del uso combinado de drogas. Las terapias más exitosas son aquellas que utilizan tres drogas: dos inhibidores de la RT más un inhibidor de la proteasa. La aplicación de una triterapia ha tenido un efecto significativo en la morbimortalidad asociada a la infección por VIH-1, por lo que se considera universalmente el tratamiento estándar. Sin embargo, aún no hay una terapia realmente efectiva para la infección por VIH-1, puesto que a los problemas de toxicidad, alto costo y adherencia a la triterapia, se suma la emergencia de cepas multiresistentes, las que ya se han comenzado a transmitir en la población. Debido a ello, continúa la búsqueda incesante de procesos virales que puedan ser utilizados como blanco de nuevas drogas.

Las funciones de las proteínas reguladoras Tat y Rev constituyen candidatos atractivos para la acción de nuevos fármacos.

Para actuar sobre ellas se han utilizado los denominados oligonucleótidos antisense que forman híbridos inactivos y la ribozimas que degradan específicamente los RNA virales. Los principales problemas son cómo hacer llegar estas moléculas a las células infectadas y cómo obtener una absorción y distribución intracelular eficiente. Las ribozimas requieren ser introducidas en las células con terapia génica, un proceso que aún tiene muchas limitantes.

La integración del provirus es otro proceso atractivo para intervención terapéutica. Mutaciones han demostrado que los virus que poseen una integrasa inactiva son incapaces de establecer una infección productiva en linfocitos T. Actualmente se están evaluando varias drogas que inhiben la integrasa del HIV-1. Los problemas que estos inhibidores enfrentan son: la estabilidad del complejo de integración y el número limitado de reacciones que median el evento de integración. Un inhibidor efectivo debe poseer una extraordinaria afinidad por la enzima o tener la capacidad de disociar el complejo de preintegración irreversiblemente.

Entre los nuevos productos destacan los inhibidores de un proceso clave, la entrada viral. El proceso de infección comienza con la unión de la glicoproteína SU/gp120 a los receptores celulares CD4 y de quimioquinas CXCR4 o CCR5. Esta unión produce la activación del amino terminal de la subunidad TM/gp41 que promueve la fusión de las membranas viral y celular. Los nuevos antivirales bloquean este proceso de fusión que permite el ingreso del contenido de la partícula viral a la célula. Un péptido de 36 aminoácidos (T20), es el primer antiviral de este tipo que está a punto de ser licenciado para su uso en clínica. En los estudios de fase tres, ha reducido la carga viral hasta por 36 semanas, sin grandes efectos secundarios pues no penetra a las células. Existen varios compuestos en estudio que bloquean la unión de la glicoproteína SU/gp120 a los receptores CXCR4, CCR5; sin embargo, la utilización alternativa, por el virus, de otros receptores como CCR3 ha impedido el avance en este campo.

El manejo efectivo de la infección por VIH no ha sido el único fin en la lucha contra el SIDA. Desde los comienzos de la epidemia, una intensa investigación ha buscado una vacuna contra VIH-1. Se han estudiado varios tipos de vacunas, incluyendo virus

completo inactivado, subunidades, virus recombinantes vaccinia, canary pox, virus vivo atenuado, DNA desnudo. Los hasta ahora desalentadores resultados se deben, principalmente, a la variabilidad genética del VIH, el largo período de latencia del virus (10 años o más) que extiende los estudios de eficacia y seguridad de los candidatos. También preocupa el alto riesgo de reversión a patogenicidad de los virus vivos atenuados, y la producción de anticuerpos facilitantes de la infección por vacunas de subunidades. Finalmente, dado que el diagnóstico clínico rutinario para la infección por VIH-1 es la presencia de anticuerpos, será necesario crear métodos que distingan un individuo que ha sido vacunado de uno actualmente infectado. A diferencia del gran avance obtenido en el tratamiento de la infección por VIH, el desarrollo de vacunas efectivas contra este virus ha progresado lentamente, sin existir hasta el momento un producto que

prevenga la infección. Este desafío para la ciencia nos acompañará, al menos, por la primera década de este nuevo siglo.

#### REFERENCIAS

1. *Vogt V*: Retroviral virions and genomes en: Coffin J, Hughes S, Varmus H. eds. *Retroviruses*, Cold Spring Harbor Laboratory press, USA 1997: 27-70.
2. *Coffin J*: HIV population dynamics in vivo: implications for genetic variation, pathogenesis, and therapy. *Science* 1995; 267: 483-9.
3. *Perelson A, Neuman A, Markowitz M, Leonard J, Ho D*: HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span, viral generation time. *Science* 1996; 271: 1582-6.
4. *Finzi D, Siciliano R*: Viral Dynamics in HIV-1 infection. *Cell* 1998; 93: 665-71.
5. *Wong J, Gunthard H, Havlir D, et al*: Reduction of HIV-1 in blood and lymph nodes following potent antiretroviral therapy and the virological correlates of treatment failure. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 12574-9.
6. *Wong J, Hezareh M, Gunthard H, et al*: Recovery of replication competent HIV despite prolonged suppression of plasma viremia. *Science* 1997; 278: 1291-5.
7. *Chan D, Kim P*: HIV entry and its inhibition. *Cell* 1998; 93: 681-4.