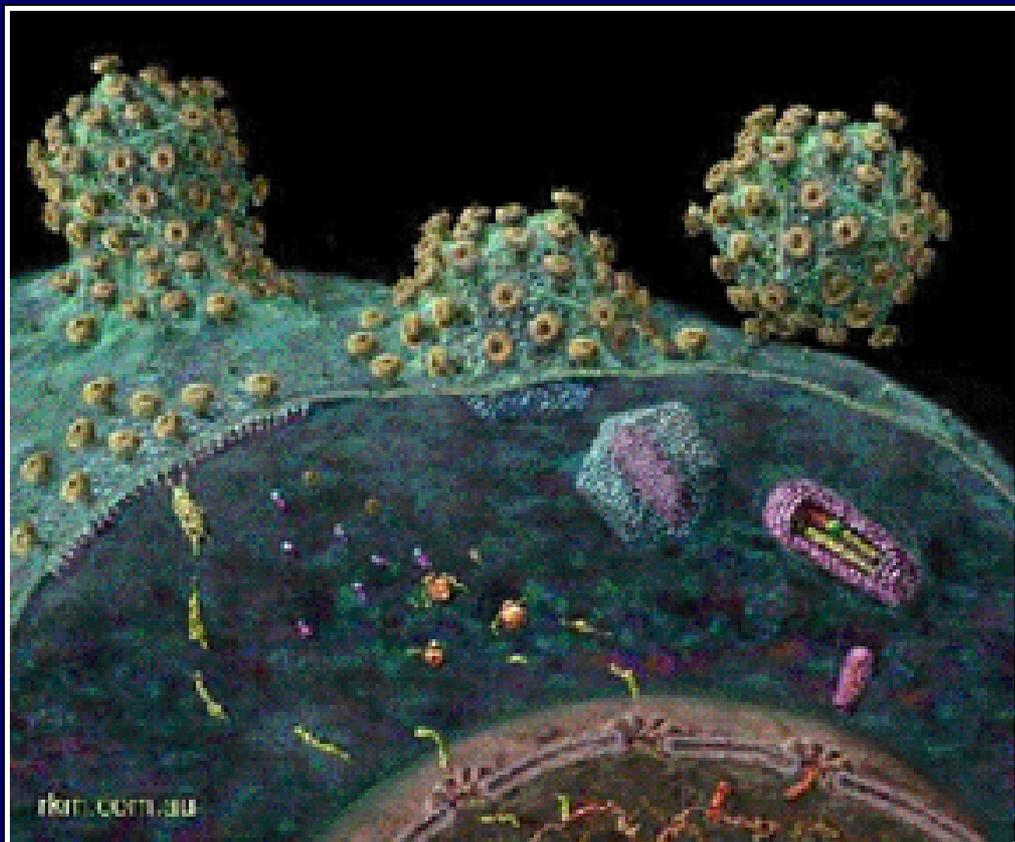


INHIBICIÓN DE LAS ETAPAS TEMPRANAS DEL CICLO
REPLICATIVO DEL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA
HUMANA TIPO 1 (VIH-1); MECANISMO DE ACCIÓN Y
POSIBLE ESTRATEGIA TERAPÉUTICA



Cecilia Cabrera Navarro

2001

INHIBICIÓN DE LAS ETAPAS TEMPRANAS DEL CICLO REPLICATIVO DEL
VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA TIPO 1 (VIH-1); MECANISMO DE
ACCIÓN Y POSIBLE ESTRATEGIA TERAPÉUTICA

Memoria de la tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas por
la Universidad Autónoma de Barcelona.
Bellaterra, Marzo 2001

Cecilia Cabrera Navarro

El Dr. José A. Esté, Investigador Senior en el Laboratorio de Retrovirología de la Fundació irsi-Caixa,

Certifica: que la tesis titulada “Inhibición de las etapas tempranas del ciclo replicativo del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1); mecanismo de acción y posible estrategia terapéutica” ha sido realizada por Cecilia Cabrera Navarro bajo su dirección y considera que es apta para ser presentada y optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas por la Universidad Autónoma de Barcelona.

Y por tal que quede constancia firma la siguiente certificación en Badalona, el 2 de Marzo de 2001.

Dr. José A. Esté.

El Dr. Josep Antoni Biosca, profesor del Departamento de Bioquímica de la Universidad Autónoma de Barcelona,

Certifica: que la tesis titulada “Inhibición de las etapas tempranas del ciclo replicativo del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1); mecanismo de acción y posible estrategia terapéutica” ha sido realizada por Cecilia Cabrera Navarro bajo su tutoría y considera que es apta para ser presentada y optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas por la Universidad Autónoma de Barcelona.

Y por tal que quede constancia firma la siguiente certificación en Bellaterra, el 2 de Marzo de 2001.

Dr. Josep Antoni Biosca.

A mis padres
y a todos aquellos que siempre han estado a mi lado

TABLA DE CONTENIDOS

1. Introducción

1.1.- COMPOSICIÓN Y ESTRUCTURA DEL VIH-1.....	2
1.2.- ORGANIZACIÓN DEL GENOMA VIRAL.....	3
1.3.- CICLO DE REPLICACIÓN DEL VIH-1.....	5
1.3.1.- Etapas del ciclo de replicación viral	
1.4.- LA GLUCOPROTEÍNA DE LA ENVUELTA DEL VIH.....	8
1.4.1.- Biosíntesis de la glucoproteína de la envuelta	
1.4.2.- Secuencia primaria y variación en el gen <i>env</i>	
1.4.3.- El dominio V3 de la glucoproteína Env	
1.5.- RECEPTORES DEL VIH.....	13
1.5.1.- Estructura y función biológica de la molécula CD4	
1.5.2.- Interacción de CD4 con la glucoproteína de la envuelta	
1.5.3.- Receptores alternativos	
1.6.- LOS CORRECEPTORES DEL VIH-1: IDENTIFICACIÓN, FUNCIÓN BIOLÓGICA Y ESTRUCTURA.....	15
1.6.1.- El descubrimiento de CXCR4 como un correceptor para el VIH	
1.6.2.- Inhibición de la entrada del VIH por quimiocinas	
1.6.3.- CCR5: El correceptor para las cepas del VIH-1 trópicas a macrófagos	
1.6.4.- Otros correceptores usados por el VIH	
1.6.5.- Estructura de los correceptores de VIH e interacciones con Env	
1.6.6.- Un nuevo sistema de nomenclatura para el VIH	
1.6.7.- Receptores de quimiocinas: Transmisión del VIH, progresión de la enfermedad y patogénesis.	
1.7.- INTERVENCIÓN TERAPÉUTICA EN EL CICLO DE VIDA VIRAL.....	24
1.7.1.- Inhibición de la entrada viral	
1.7.2.- Transcripción reversa: RT	
1.7.3.- Proceso de integración: Integrasa	
1.7.4.- Procesamiento de las proteínas virales: La proteasa viral	
1.7.5.- Genes accesorios y reguladores del VIH	
1.8.- BIBLIOGRAFÍA.....	34
2. Objetivos.....	61

3. Inhibición de la unión del virus a células CD4⁺: Interacción con gp120/CD4	
3.1.- RESISTANCE OF HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS TO THE INHIBITORY ACTION OF NEGATIVELY CHARGED ALBUMINS ON VIRUS BINDING TO CD4.....	65
3.2.- HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS GLYCOPROTEIN GP120 AS THE PRYMARY TARGET FOR THE ANTIVIRAL ACTION OF AR177 (ZINTEVIR).....	84
4. Inhibición de la fusión del VIH con las células diana: Interacción con el receptor de quimiocinas CXCR4	
4.1.- ACTIVITY OF DIFFERENT BICYCLAM DERIVATIVES AGAINST HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS DEPENDS ON THEIR INTERACTION WITH THE CXCR4 CHEMOKINE RECEPTOR.....	103
4.2.- ANTI-HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS ACTIVITY OF NOVEL AMINOGLYCOSIDE-ARGININE CONJUGATES AT EARLY STAGES OF INFECTION.....	123
5. Efecto del bloqueo del receptor de quimiocinas CXCR4	
5.1.- T-CELL-LINE-TROPIC HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS TYPE 1 THAT IS MADE RESISTANT TO STROMAL CELL-DERIVED FACTOR 1 α CONTAINS MUTATIONS IN THE ENVELOPE gp120 BUT DOES NOT SHOW A SWITCH IN CORECEPTOR USE.....	141
5.2.- SHIFT OF CLINICAL HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS TYPE 1 ISOLATES FROM X4 TO R5 AND PREVENTION OF EMERGENCE OF SYNCYTIUM-INDUCING PHENOTYPE BY BLOCKADE OF CXCR4.....	160
6. Discusión General y Perspectivas.....	185
7. Conclusiones.....	203
Agradecimientos.....	205

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

El síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) se describió como una nueva enfermedad en los Estados Unidos en el año 1981. Los primeros casos fueron advertidos por la aparición de una serie de inusuales infecciones oportunistas, indicativas de una severa disfunción del sistema inmune, en un grupo de jóvenes homosexuales (1-5). Estudios epidemiológicos sugirieron que el agente etiológico del SIDA era probablemente un patógeno viral transmitido mediante relaciones sexuales, uso de drogas intravenosas, transfusiones de sangre o productos sanguíneos, así como mediante la transmisión vertical de madres a hijos. Varias hipótesis sobre la naturaleza del agente infeccioso se propusieron inicialmente, incluyendo citomegalovirus o parvovirus. Sin embargo, en 1983 se aisló un retrovirus en una biopsia de nódulo linfático de un paciente con SIDA (6-8). El Comité Internacional de Taxonomía Viral, en 1986, designó a este nuevo retrovirus: VIH - virus de la inmunodeficiencia humana - (9). Este retrovirus, ahora conocido como virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1), es el prototipo de una extensa familia de lentivirus en la que también se incluyen un segundo virus humano denominado VIH-2 (10, 11), y el virus causante del síndrome de inmunodeficiencia en simio, virus de la inmunodeficiencia de simio (VIS) (12, 13) y el virus de la inmunodeficiencia de felino (VIF) (14).

Recientemente se ha demostrado que el origen de la infección por el VIH-1 procede de una transmisión zoonótica entre una subespecie de chimpancé, el *Pan troglodytes troglodytes*, y la raza humana (15), confirmando los primeros datos que

indicaban que varias cepas del VIH-2 en el Oeste de Africa derivaban del SIV de monos del tipo *sooty mangabey* (16).

1.1.- COMPOSICIÓN Y ESTRUCTURA DEL VIH-1.

El VIH-1 es un miembro de la familia Retroviridae, la cual se caracteriza por un enzima único: la retrotranscriptasa o transcriptasa reversa (RT). Este enzima le permite al virus copiar su RNA en una doble cadena de DNA y poder así replicarse (17, 18) . Dentro de la familia Retroviridae, el VIH está clasificado como un lentivirus. Los lentivirus son retrovirus exógenos no oncogénicos, generalmente causantes de infecciones crónicas del sistema inmune y del sistema nervioso central. Todos los lentivirus exhiben una morfología y morfogénesis común: los viriones presentan una forma esférica, de aproximadamente 110 nm de diámetro, y constan de una bicapa lipídica externa que recubre un core nucleoproteico que contiene el material genético viral (Figura 1).

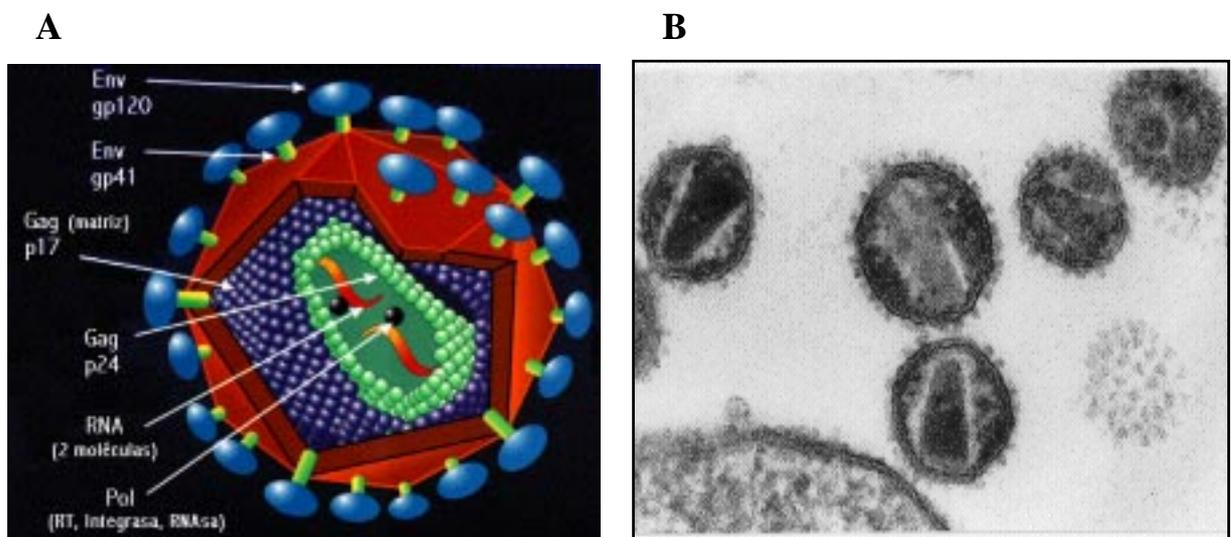


Figura 1. Estructura del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1). (A) Representación esquemática de un virión maduro. (B) Micrografía electrónica de partículas de VIH-1.

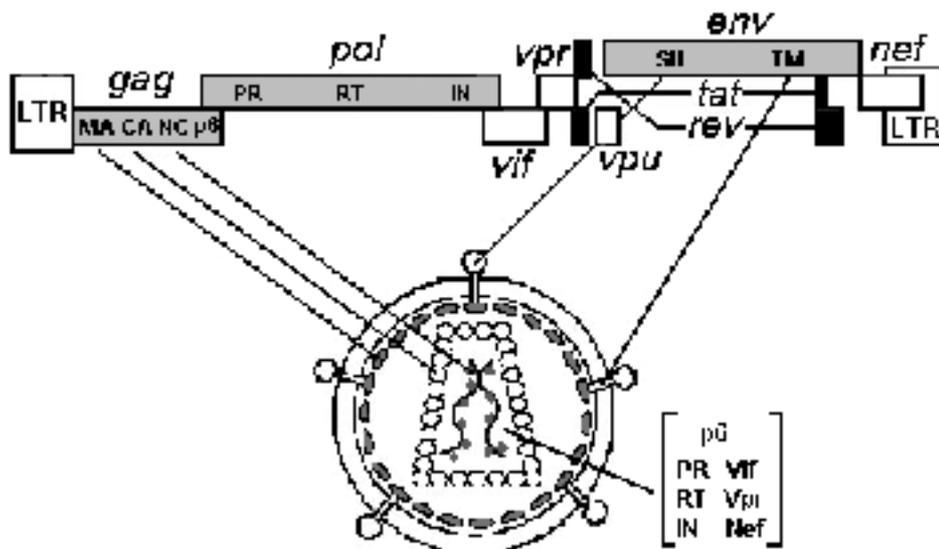
La bicapa lipídica o envoltura viral está derivada de la membrana plasmática de la célula hospedadora y en ella se insertan las proteínas de la envuelta viral (Env): la

glucoproteína de superficie viral gp120 (SU) y la glucoproteína de transmembrana gp41 (TM) en el caso del VIH. Estas glucoproteínas son las responsables del proceso de unión y fusión de la partícula viral con las células diana.

El core troncocónico de la partícula viral está formado por la proteína de la cápside p24 (CA) que recubre la nucleocápside viral. Esta nucleocápside, dentro de cada virión maduro, está formada por las proteínas p9 y p6 (NC) que están estrechamente asociadas al dímero monocatenario de RNA viral, además de contener los enzimas necesarios para la retrotranscripción: p66 y p51 (RT), y la integración del DNA retroviral, p32 (IN). Entre la cápside y la nucleocápside se encuentra la matriz viral que constituye una capa densa formada mayoritariamente por la proteína p17 (MA) que proporcionará integridad al virión (19) (Figuras 1 y 2).

1.2.- ORGANIZACIÓN DEL GENOMA VIRAL.

El VIH, al igual que otros retrovirus, posee dos formas genómicas: RNA de cadena sencilla en la fase extracelular del ciclo de vida viral (es decir en los viriones) y una doble cadena de DNA (denominado provirus) dentro de la célula.



La forma integrada del VIH-1 es de aproximadamente 9.8 Kilobases (Kb) de longitud (21). Ambos extremos del provirus están flanqueados por unas secuencias repetidas conocidas como *Long Terminal Repeats* (LTRs), las cuales contienen las señales para la integración, así como para la iniciación y regulación de la transcripción. Los genes del VIH están localizados en la región central del DNA proviral y codifican al menos para 9 proteínas (22). Estas 9 pautas de lectura codifican 3 proteínas relativamente grandes: el precursor para Gag que formará el core del virión, el precursor Pol y el precursor para la glucoproteína de la envuelta, además de codificar para seis proteínas mas pequeñas – Vpu, Vpr, Vif, Nef, Tat y Rev - (Figura 2 y Tabla 1). Estas proteínas se pueden dividir en tres clases:

- 1.- Proteínas estructurales: Gag, Pol y Env.
- 2.- Proteínas reguladoras: Tat y Rev.
- 3.- Proteínas accesorias: Vpu, Vpr, Vif y Nef.

Tabla 1. Genes y proteínas del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (23).

GEN	PROTEÍNA	TAMAÑO	FUNCIÓN	LOCALIZACIÓN
<i>gag</i>	Gag (MA)	p17	Estabilización de la partícula viral. Interacción con Env. Transporte nuclear del core viral (proteína miristoilada)	Virión
	Gag (CA)	p24	Core de la cápside viral	Virión
	Gag (NC)	p7	Nucleocápside, recubrimiento del RNA	Virión
<i>pol</i>		p6	Unión a Vpr	Virión
	Proteasa	p15	Corte del precursor Gag-Pol y maduración viral	Virión
	Transcriptasa Reversa	p66/p51	Transcripción reversa. Actividad RNAsa H	Virión
	Integrasa	p32	Integración del DNA proviral	Virión
<i>env</i>	Env	gp120/gp41	Glucoproteínas virales externas, unión a CD4 y a los correceptores	Membrana plasmática, envuelta del virión
<i>tat</i>	Tat	p16/p14	Transactivador transcripcional viral	Principalmente en el núcleo celular
<i>rev</i>	Rev	p19	Transporte del RNA del núcleo al citoplasma	Núcleo y citoplasma celular
<i>nef</i>	Nef	p27/p25	Dowregulación de CD4, influencia la activación celular, aumento de la infectividad de los viriones	Membrana plasmática, citoplasma celular, virión
<i>vpr</i>	Vpr	p10-p15	Transporte del complejo de preintegración, dowregula CD4, para el ciclo celular de las células infectadas en G2/M, implicada en apoptosis	Virión, núcleo celular
<i>vpu</i>	Vpu	p16	Aumenta la liberación de los viriones, degradación de CD4	Proteína integral de membrana
<i>vif</i>	Vif	p23	Promueve la maduración viral y la infectividad	Citoplasma, virión

Las proteínas más pequeñas no son procesadas mientras que los precursores Gag, Pol y Env serán procesados durante la maduración viral. Durante esta maduración viral, la proteasa viral corta el polipéptido Pol obteniendo las actividades proteasa [PR (p10)], retrotranscriptasa [RT (p51)], RNAsa H (p15) y integrasa [IN(p31)]. El precursor Gag es escindido por la proteasa viral durante este proceso de maduración viral en cuatro pequeñas proteínas importantes para la estructura del virión y designadas: proteína de la matriz [MA (p17)], proteína de la cápside [CA (p24)], proteína de la nucleocápside [NC (p9)] y la proteína p6 (24). El precursor Env es procesado por proteasas celulares para producir la glucoproteína de superficie gp120 (SU) y la glucoproteína de transmembrana gp41 (TM).

1.3.- CICLO DE REPLICACIÓN DEL VIH-1.

El ciclo de replicación del VIH-1 puede dividirse en una fase temprana y una fase tardía (25). La fase temprana comienza con la unión de un virión a la superficie celular y continúa hasta la integración del DNA proviral dentro del genoma del huésped. Estos pasos están mediados por proteínas encontradas dentro del virión y ocurren en la ausencia de la expresión de genes virales. Esta fase constituye un período de latencia que se mantiene hasta que un estímulo externo activa la expresión y replicación viral. La fase tardía del ciclo de replicación comienza con la transcripción y procesamiento del RNA viral a partir del DNA proviral integrado y acaba con la liberación de los viriones progenie de la célula infectada (Figura 3).

1.3.1.- ETAPAS DEL CICLO DE REPLICACIÓN VIRAL.

Las 2 fases del ciclo de replicación viral pueden ser subdivididas en varias etapas:

1.3.1.1.- Entrada viral.

El primer paso en el ciclo de replicación retroviral es la interacción específica de la glucoproteína de la envuelta del virión (Env) con las moléculas receptor de la superficie celular. Frecuentemente, estas moléculas receptor se encuentran sólo sobre células de una especie o un tejido determinado, y la población de células diana, o tropismo celular de un retrovirus particular, viene definida por lo tanto, en primer lugar por la prevalencia de este receptor.

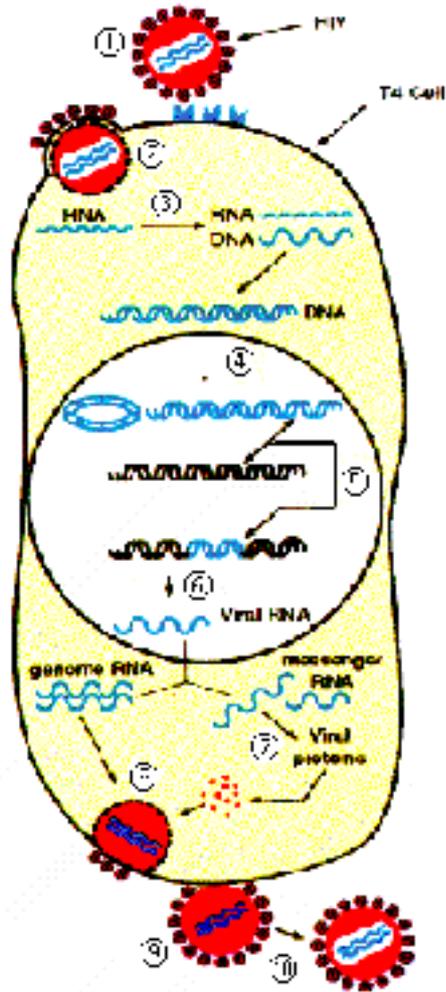


Figura 3. Representación esquemática del ciclo vital del VIH. Los pasos indicados en la figura son: (1) unión al receptor (2) fusión y liberación de la nucleocápside viral en el interior celular (3) transcripción reversa (4) transporte del DNA viral al núcleo celular (5) integración en el genoma del huésped (6) transcripción viral (7) síntesis de las proteínas virales (8) ensamblaje de la partícula viral (9) liberación al medio de la nueva partícula viral y (10) maduración viral y generación de partículas virales infecciosas.

La unión de Env a los receptores celulares induce cambios conformacionales en el complejo Env-receptor, lo que conduce a la fusión de las membranas viral y celular. Después de la fusión de las dos membranas, la nucleocápside viral es liberada en el interior del citoplasma de la célula infectada. Este proceso de entrada se describirá detalladamente más adelante.

1.3.1.2.- Transcripción reversa: síntesis del provirus de DNA.

La transcripción reversa genera una copia de DNA lineal a partir del genoma de RNA vírico. Este paso tiene lugar dentro de un complejo nucleoproteico y requiere la actividad de la retrotranscriptasa viral. El proceso de transcripción reversa es el punto, en el ciclo de replicación viral, que genera la rápida variabilidad genómica característica del VIH-1 (26). Esta variabilidad viene dada, en parte, por la ausencia de la actividad 3'-5' exonucleasa de la RT, actividad requerida para el reemplazo de las bases

colocadas erróneamente (27). La alta tasa de error en la replicación ha proporcionado al virus una capacidad intrínseca de alterar el tropismo celular, de eludir el sistema inmune, de desarrollar rápidamente resistencias a la terapia antiviral, así como de generar las diversas cepas de VIH-1 (quasiespecies) (28) que han impedido hasta el momento el desarrollo de una vacuna eficaz.

1.3.1.3.- Transporte del DNA viral al núcleo e integración.

La doble cadena de DNA proviral acompañada con proteínas (complejo de preintegración) es transportada hasta el núcleo de la célula infectada. El DNA proviral es integrado en un lugar al azar a través del genoma celular mediante la acción de la integrasa viral. A diferencia de otros retrovirus, el VIH puede entrar en el núcleo de células que no están en división tales como los macrófagos, lo cual indica la existencia de un mecanismo para la localización y transferencia del genoma viral a través de la membrana nuclear (29). Las dos proteínas virales importantes para el transporte nuclear son la proteína MA fosforilada y Vpr (30-35).

1.3.1.4.- Expresión de las proteínas virales.

La expresión de los genes virales requiere las actividades en colaboración de la maquinaria de transcripción de la célula huésped (RNA polimerasa y los factores de transcripción SpI y NFκB) y las proteínas reguladoras virales (Tat y Rev). El promotor del VIH-1 está altamente regulado por factores celulares y virales, variando enormemente su actividad dependiendo del estado de activación celular.

Los transcritos de longitud total de VIH tienen tres papeles (a) RNA genómico en los viriones progenie, ensamblados en la membrana plasmática, (b) mRNA para traducción de los precursores Gag y Gag-Pol, en el citoplasma, y (c) precursores para mRNA los cuales producirán Env así como proteínas accesorias (36).

1.3.1.5.- Ensamblaje, liberación y maduración de las partículas virales.

Cuando las principales proteínas precursoras estructurales (Gag, Gag-Pol y Env) empiezan a acumularse, los siguientes eventos ocurren de un modo coordinado: (a) asociación de los precursores Gag y Gag-Pol, tanto con la membrana plasmática de la célula infectada como con el RNA genómico viral, e inserción de oligómeros de Env en la membrana plasmática celular, (b) la membrana plasmática comienza a formar una bicapa lipídica alrededor del core viral y (c) ensamblaje final y liberación al medio extracelular de la partícula viral.

Durante, o muy poco tiempo después de su liberación, las partículas retrovirales maduran, produciéndose el procesamiento de los precursores Gag y Gag-Pol por la

proteasa viral. Este procesamiento es un paso esencial en la maduración de las partículas víricas y mutaciones en la proteasa viral conducen a la producción de partículas virales no infecciosas que contienen proteínas del core no digeridas (37-39). Los viriones maduros son entonces competentes para iniciar un nuevo ciclo de infección.

1.4.- LA GLUCOPROTEÍNA DE LA ENVUELTA DEL VIH.

La glucoproteína de la envuelta (Env) sobre la superficie de las partículas del VIH es la responsable del reconocimiento de los receptores celulares y por tanto de la unión de los viriones a las células diana. Posteriormente a la unión viral, Env media la entrada del virus a la célula por fusión de la membrana viral y celular (40). En un mecanismo análogo, la proteína de la envuelta puede también promover la fusión célula-célula entre células infectadas que expresan Env, con células vecinas no infectadas que expresan CD4 y el correceptor adecuado, resultando la formación de células gigantes multinucleadas (sincitios). La proteína Env es también la principal diana para la respuesta inmune humoral antiviral del huésped infectado (41).

Como en muchos otros virus con envuelta, la proteína Env del VIH, consta de dos subunidades, la glucoproteína de superficie (SU) que es responsable de la unión a las moléculas receptor, y la glucoproteína de transmembrana (TM) la cual es crítica para mediar la fusión de membranas.

1.4.1.- BIOSÍNTESIS DE LA GLUCOPROTEÍNA DE LA ENVUELTA.

La glucoproteína Env de 160 kD (gp160), se sintetiza en el retículo endoplasmático, y migra hacia el complejo de Golgi donde sufre un fuerte proceso de glicosilación, siendo esta glicosilación requerida para la infectividad de los viriones (42). Inicialmente sintetizada como un precursor polipeptídico, gp160 es cortada por una proteasa celular para generar las subunidades gp120 y gp41. La glucoproteína gp120 es una proteína hidrofílica, altamente glicosilada, localizada en la superficie externa de la membrana del virión, así como en la membrana plasmática de las células infectadas. La glucoproteína gp41 es una proteína relativamente hidrofóbica que atraviesa una vez la bicapa lipídica, tanto de los viriones como de las células; siendo clasificada como una proteína integral de membrana (43). En la forma madura, la glucoproteína Env, consta de subunidades de gp120 y subunidades de gp41, asociadas a través de enlaces no covalentes, mostrando varios puntos de contacto entre ambas

subunidades (44). También a través de interacciones no covalentes, el complejo gp120/gp41 se organiza en un complejo oligomérico, mostrándose sobre la superficie como un heterotrímero (45, 46). Esta multimerización de la glicoproteína Env esta mediada por el ectodominio de la glicoproteína gp41 (47).

1.4.2.- SECUENCIA PRIMARIA Y VARIACIÓN EN EL GEN *env*.

La comparación de las secuencias de gp120 derivadas del gen *env* de diferentes aislados del VIH-1 revela la existencia de cinco regiones conservadas (C1 a C5) y cinco regiones variables (V1 a V5) representadas en la Figura 4A.

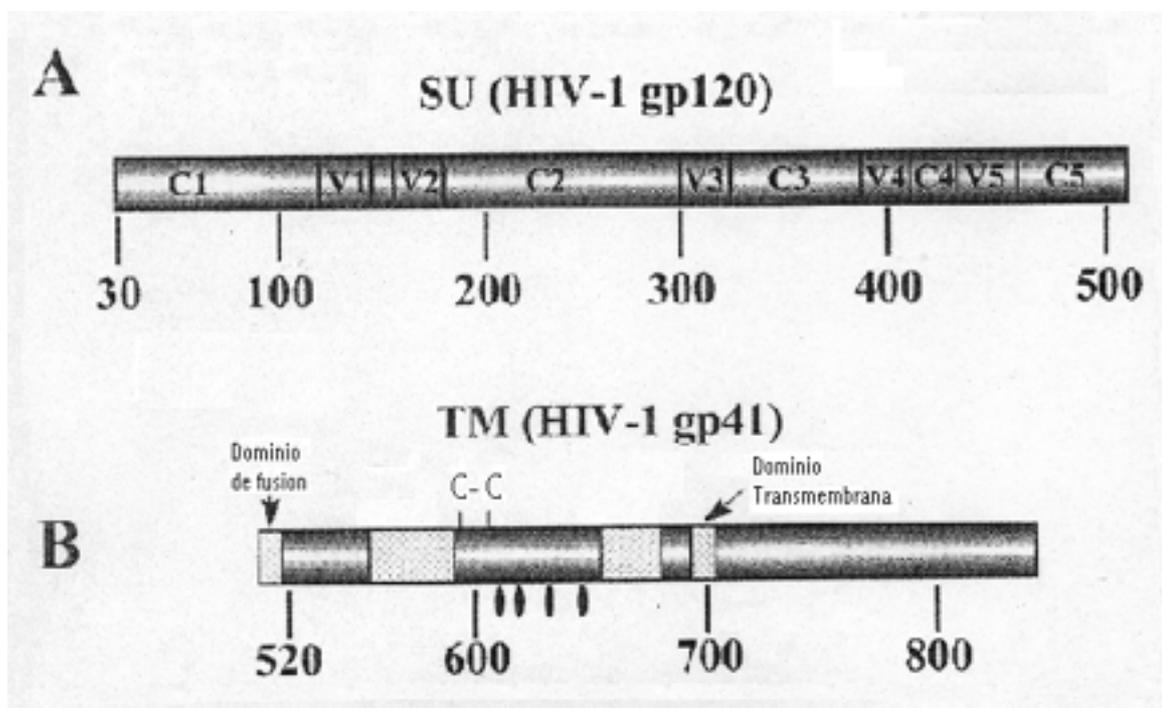


Figura 4. Mapas lineales de las 2 subunidades de Env. Las posiciones de los residuos aminoacídicos (secuencia de la cepas LAI) se muestran debajo de cada subunidad. (A) Glucoproteína SU (gp120) con las regiones constantes (C1-C5) y las regiones variables (V1-V5). (B) Glucoproteína TM (gp41) con su único puente disulfuro (C-C) y los potenciales lugares de glucosilación (puntos negros bajo la representación). También se indica el dominio de fusión además del dominio transmembrana (48).

La secuencia de gp120 muestra 18 residuos cisteína altamente conservados y que desempeñan un papel crítico en la estructura y función de esta proteína viral. Un modelo para la subunidad gp120, basado en análisis bioquímicos, muestra nueve puentes disulfuro intracatenarios (Figura 5) (49, 50). Este modelo de puentes disulfuro dibuja a

la molécula gp120 en varias regiones funcionales que incluyen: un dominio dependiente de conformación de reconocimiento del receptor CD4 formado por elementos discontinuos derivados de las regiones C3 y C4 (51, 52) y 4 bucles formados por las regiones variables (V1-V4).

La glucoproteína TM gp41, está mas conservada entre los diferentes aislados de VIH-1 que la glucoproteína SU. Una representación lineal de la glucoproteína TM indicando el dominio de fusión, puente disulfuro y lugares de glicosilación potenciales se muestra en la Figura 4B (53-56).

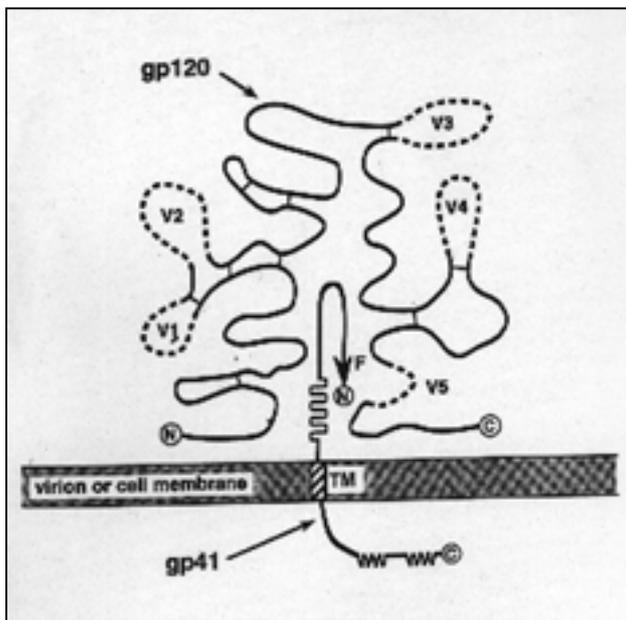


Figura 5. Modelo estructural del complejo proteico gp120/gp41 del virus de la inmunodeficiencia humana. Se muestra el patrón de plegamiento de la subunidad gp120 con los 9 enlaces disulfuro y las regiones variables (V1-V5) formando bucles. Se representa también el patrón de plegamiento y la asociación con la membrana celular de la subunidad gp41. F: Péptido de Fusión; TM: Dominio transmembrana. Las regiones carboxi-terminal y amino-terminal de ambas subunidades están indicadas como C y N, respectivamente (23).

Esta variación en la secuencia de *env* consiste en cambios de nucleótidos, los cuales producen sustituciones de aminoácidos, así como pequeñas deleciones e inserciones. Esta variación de secuencia tiene importantes implicaciones no sólo para la respuesta inmune antiviral, sino también para las funciones adicionales mediadas por Env, tales como la unión a CD4, el tropismo celular y la citopaticidad.

1.4.3.- EL DOMINIO V3 DE LA GLUCOPROTEÍNA ENV.

La secuencia del dominio variable V3 contiene 35 aminoácidos organizados en un bucle entre los extremos del puente disulfuro establecido por los residuos Cys³⁰¹ y Cys³³⁶ (Figura 6) (57, 58). Este dominio juega un papel importante en la determinación de varias propiedades biológicas del virus, como son: el tropismo celular, la capacidad

infecciosa y la capacidad citopatogénica (57, 59, 60). A pesar de la gran variabilidad exhibida por esta región, la comparación de las secuencias primarias de diferentes aislados de VIH-1, revela la existencia de ciertos subdominios conservados así como subdominios variables (61). Como regiones altamente conservadas encontramos el motivo GPGRAF, localizado en la corona de la región V3 (figura 6), así como las secuencias cercanas a las cisteínas que forman el puente disulfuro.

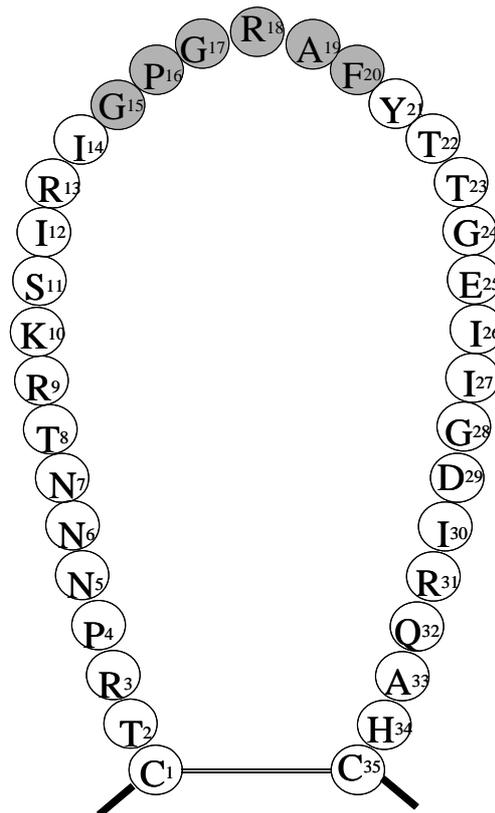


Figura 6. Bucle V3 de la glicoproteína Env. Se muestra la secuencia consenso del bucle V3 indicándose en sombreado los aminoácidos altamente conservados de la corona (23) .

Diversas mutaciones en la región V3 alteran el tropismo celular, la capacidad replicativa (62) y la capacidad de inducir la formación de sincitios (63, 64).

Los aislados del VIH-1 varían en su tropismo celular, es decir, en el rango de tipos celulares en los cuales son capaces de establecer una infección productiva. El tropismo es un fenómeno usado para describir la “especificidad” de los virus de VIH en su capacidad de infectar diferentes tipos celulares. Esta especificidad, y por lo tanto la capacidad del virus de infectar un tipo celular y no otro, reside en la glicoproteína de la

superficie viral gp120. La región de Env implicada en la determinación del tropismo celular incluye secuencias que codifican para el bucle V3, así como para las regiones V1, V2 y C4. La especificidad celular del VIH no reside exclusivamente en la proteína Env. El LTR es una diana de múltiples factores celulares que no están presentes en todas las células y que también influyen en la “especificidad” de la replicación viral, existiendo factores en la maduración o activación celular que contribuyen a la replicación del VIH (65). Por tanto, encontraremos casos en los cuales el virus del VIH puede entrar al interior celular pero no es capaz de inducir una infección productiva. Esto ocurre en la infección de macrófagos, en los cuales hay pasos después de la entrada viral que restringen la replicación de las cepas T-trópicas (66).

Los aislados primarios de VIH-1 fueron divididos en dos categorías dependiendo de su tropismo y capacidad de replicación (67, 68). El primer grupo de virus fue denominado SI (inductores de sincitios) o virus trópicos a líneas celulares T (T-trópicos), ya que podían infectar e inducir sincitios en líneas celulares T CD4⁺ (ensayos *in vitro* en la línea celular MT-2). El segundo grupo fue llamado NSI (no inductor de sincitios) o virus trópicos a macrófagos (M-trópicos) ya que no infectaban tales líneas celulares T CD4⁺ y por lo tanto no inducían sincitios. Aislados que replicaban eficientemente en líneas celulares T así como en macrófagos, eran designados virus dual-trópicos. Esta nomenclatura, sin embargo, es engañosa, ya que las cepas NSI inducen eficientemente sincitios en cultivos de macrófagos infectados. Las características de fenotipo de los diferentes aislados virales tienen profundas implicaciones en la transmisión y la patogénesis del VIH-1. Los aislados virales obtenidos de sangre periférica de individuos poco después de la infección y durante la fase asintomática son predominantemente M-trópicos; cuando la infección progresa a SIDA, virus T-trópicos pueden ser aislados de muchos, aunque no de todos los pacientes. Las cepas T-trópicas normalmente muestran efectos citopáticos mayores *in vitro*, sugiriendo que estas pueden tener un papel particularmente importante en la pérdida de células T CD4⁺ *in vivo*, lo cual es la característica principal del SIDA (67-69).

Análisis de variantes naturales de VIH-1 junto con estudios de mutaciones puntuales introducidas en el bucle V3, indicaron que los aminoácidos básicos en una o más de las posiciones 306, 321, 322 y 328 (posiciones 11, 24, 25 y 32 en la Figura 6) conferían un fenotipo inductor de sincitios (SI) mientras que aminoácidos hidrofóbicos en esas posiciones se correlacionaban con un fenotipo no inductor de sincitios (NSI)

(58, 70-72). El bucle V3 de las variantes SI y NSI generalmente tiene una carga neta de +5 y +3 respectivamente, sugiriendo que, tanto la posición de los aminoácidos cargados como la carga neta total influyen en el fenotipo.

El mecanismo por el cual el dominio V3 y otras regiones de Env controlan el tropismo celular podría deberse a esta distinta distribución de carga mostrada por los diferentes aislados virales y a la diferente distribución de carga presentada en la superficie de los correceptores necesarios para la entrada viral, como se detallará más adelante.

1.5.- RECEPTORES DE VIH.

El SIDA se caracteriza por la pérdida selectiva de los linfocitos T CD4⁺. En 1984 se mostró que era precisamente el antígeno de superficie celular CD4 el principal receptor para el VIH-1 (73, 74).

Más tarde se caracterizaron otras moléculas, la más notable de ellas la molécula galactosilceramida (GalC) (75, 76), que pueden también mediar la infección por VIH, aunque con una baja eficiencia.

1.5.1.- ESTRUCTURA Y FUNCIÓN BIOLÓGICA DE LA MOLÉCULA CD4.

La molécula CD4, miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas, es una glucoproteína de superficie celular de 55-60 kD (77). Este receptor está expresado sobre aproximadamente el 60 % de los linfocitos T de sangre periférica (78), y en células de la línea monocítico-macrófago incluyendo células de la microglía y en células dendríticas las cuales incluyen células de Langerhans de la piel y de las membranas mucosas (79).

La molécula CD4 tiene un importante papel fisiológico como un correceptor del TCR en las interacciones con las moléculas de MHC clase II e iniciando la activación de los linfocitos T helper.

1.5.2.- INTERACCIÓN DE CD4 CON LA GLUCOPROTEÍNA DE LA ENVUELTA.

La molécula CD4 interactúa con el componente gp120 de Env. El lugar de unión de Env sobre la proteína CD4 ha sido mapeado en los aminoácidos del 40 al 82 de CD4. Las interacciones de CD4 con el complejo gp120/gp41 conducen a dos principales efectos: (1) formación de complejos de alta afinidad entre CD4 y gp120 y (2) cambios conformacionales en el complejo CD4-gp120/gp41. La interacción de CD4 con Env es

de gran importancia puesto que afecta a la función de las células T y eventualmente conduce a la pérdida del subgrupo de células T CD4⁺ y como consecuencia a la inmunodeficiencia. La importancia de la interacción Env-CD4 para el VIH se pone de manifiesto por los múltiples mecanismos virales que conducen a la modulación de CD4: Env, Vpr, Vpr y Nef interactúan con CD4 afectándola de modos distintos.

1.5.3.- RECEPTORES ALTERNATIVOS.

Una gran variedad de células CD4 negativas de origen neuronal, epitelial, cervical y fibroblástico son infectables por VIH (80, 81) incluyendo aislados virales primarios (82-84). Una de las moléculas implicada en mediar la infección independiente de CD4, particularmente en células neuronales (75), células epiteliales del colon (76) y posiblemente en espermatozoides (85, 86), es la galactosilceramida (GalC) (75) y sus derivados. Estas moléculas de naturaleza glucolipídica se encuentran insertadas en las membranas plasmáticas celulares y presentan un residuo de galactosa que sobresale fuera de las membranas y es el aparente lugar de unión de gp120.

El último hallazgo en el campo de los receptores de VIH ha sido la descripción que la molécula CXCR4, el correceptor para los aislados de VIH-1 trópicos a células T, es el receptor para algunas cepas de VIH-2 (87). La utilización de un correceptor de VIH-1 como un receptor primario para aislados de VIH-2 indica que si una molécula es utilizada como receptor o correceptor, es dependiente de la estructura del virus, siendo esta otra demostración de la gran capacidad del virus de evolucionar y utilizar receptores con estructuras divergentes. El hallazgo de que CXCR4 puede servir también como receptor para el virus de la inmunodeficiencia de felino (FIV) (88) sugiere que CXCR4 y otros receptores de quimiocinas podrían haber sido usados inicialmente como receptores primarios por los lentivirus de primate, siendo la adaptación a CD4 un evento posterior.

Muy recientemente se han descrito cepas de VIH capaces de utilizar la molécula de CD8 como receptor para la infección de células CD8⁺, independientemente de CD4, CXCR4 o CCR5. Esto sugiere que VIH puede mutar para poder utilizar otras moléculas como receptor, posiblemente ante la presión selectiva de la pérdida de sus células diana, las células CD4⁺ (89).

1.6.- LOS CORRECEPTORES DEL VIH-1: IDENTIFICACIÓN, FUNCIÓN BIOLÓGICA Y ESTRUCTURA.

La idea de que se requería un correceptor para la fusión/entrada del VIH-1, provino de la observación de que la expresión de CD4 no era suficiente para explicar la entrada del virus en diferentes células diana en estudios *in vitro* (revisado en (90)). Dos fenómenos relacionados condujeron a la idea de la necesidad de un correceptor. La primera serie de hallazgos que indicaban que la infección por VIH requería un cofactor, era que células murinas transfectadas con la molécula CD4 humana eran resistentes a la entrada y fusión del VIH (91). El segundo fenómeno inexplicable observado era que no todas las células humanas transfectadas con CD4 eran permisivas a la infección (91-94).

1.6.1.- EL DESCUBRIMIENTO DE CXCR4 COMO UN CORRECEPTOR PARA VIH.

En Mayo de 1996, el primer correceptor del VIH fue descubierto gracias a una estrategia de clonación de cDNA funcional basada en la capacidad de una librería de cDNA de proporcionar permisibilidad a células murinas que expresaban CD4 de fusionarse con células que expresaban Env de una cepa trópica a linfocitos T. La proteína así identificada era un miembro de la superfamilia de receptores de siete dominios transmembrana acoplados a proteína G. Esta proteína había sido previamente descrita por varios grupos como un receptor huérfano y le fue dado el nuevo nombre de “fusina”, para denotar su actividad promotora de fusión (95). Este receptor, en un inicio huérfano, fue renombrado como CXCR4, al confirmarse que era el receptor para la quimiocina CXC Factor Derivado de Células Estromales-1 (Stromal Cell-Derived Factor 1 [SDF-1]) (96, 97). Sin embargo, CXCR4 funcionaba como correceptor para las cepas de VIH trópicas a células T, pero no para aquellas cepas trópicas a macrófagos.

1.6.2.- INHIBICIÓN DE LA ENTRADA DEL VIH POR QUIMIOCINAS.

Las quimiocinas (citocinas quimioatrayentes) son una superfamilia de proteínas séricas de entre 7 a 16 kD que fueron originalmente caracterizadas por su capacidad de inducir migración de leucocitos. Estas proteínas atraen selectivamente a leucocitos a los lugares de inflamación, induciendo tanto migración celular como activación (98). Son producidas y liberadas por una amplia variedad de tipos celulares durante la fase inicial de la respuesta del huésped a infecciones por microorganismos o lesiones en tejidos. Están divididas en dos subgrupos principales en base a propiedades estructurales y localización cromosómica. Una característica estructural de ambos grupos es la posición de 4 residuos cisteína: en la subfamilia α (CXC o α -quimiocinas), la primera y segunda

cisteínas están separadas por un único residuo, mientras que en la subfamilia β (CC o β -quimiocinas) los 2 primeros residuos cisteína son adyacentes.

A finales de 1995 Cocchi et al (99) identificaron unas pequeñas moléculas producidas por las células CD8⁺, que anteriormente se había visto que eran capaces de suprimir la infección por VIH (100). Estos factores liberados por las células CD8⁺ eran las CC quimiocinas *Regulated on Activation Normal T-cell Expressed and Secreted* (RANTES), *Macrophage Inflammatory Protein* (MIP)-1 α y MIP-1 β . Sorprendentemente, esas quimiocinas inhibieron sólo a cepas M-trópicas y no a cepas T-trópicas, sugiriendo que las quimiocinas podrían estar influenciando la infección por VIH y la progresión a SIDA.

1.6.3.- CCR5: EL CORRECEPTOR PARA LAS CEPAS DE VIH-1 TRÓPICAS A MACRÓFAGOS.

El descubrimiento de CXCR4, un receptor de quimiocinas, como el correceptor de cepas T-trópicas y el descubrimiento de las CC quimiocinas como inhibidoras de la replicación de las cepas trópicas a macrófagos, sirvió como base para la identificación del correceptor de los aislados M-trópicos. CCR5, el receptor común a las tres CC quimiocinas en cuestión, es esencial además de CD4 para la entrada de las cepas de VIH-1 M-trópicas y algunos aislados de VIH-2 y SIV (101-106).

1.6.4.- OTROS CORRECEPTORES USADOS POR VIH.

Además de los correceptores principales CCR5 y CXCR4, un gran número de otras moléculas han sido identificadas como correceptores de entrada para el VIH-1. En general, la eficiencia de entrada mediada por estas moléculas es menor que la soportada por los correceptores CCR5 o CXCR4. La Tabla 2 resume el repertorio de correceptores que pueden ser utilizados por algunas cepas de VIH. Estos correceptores incluyen:

1.- Los receptores de quimiocinas: CCR2b (104), CCR3 (102, 104), CCR8 (107-109), CCR9 (110, 111), y CX₃CR1 (V28) (107, 112-115). CCR5 y CCR3, ambos pueden ser importantes para la infección del sistema nervioso central y el desarrollo de la demencia asociada a SIDA (116, 117). Existen pocas evidencias de que el receptor CCR2b tenga un papel importante en la infección *in vivo* ya que prácticamente ningún aislado de VIH-1 primario ha sido capaz de utilizar este correceptor (118, 119).

2.- Los receptores huérfanos que tienen similitud a la familia de receptores de quimiocinas: STRL33/Bonzo (120, 121), GPR15/BOB (122, 123) y GPR1 (107, 121, 123-125). Los receptores de 7 dominios transmembrana Bonzo y BOB median la entrada de SIV así como de algunas cepas de VIH-2 (122, 123, 125-129). Sin embargo,

datos recientes muestran que aislados primarios VIH-1 R5/Bonzo y R5X4/Bonzo no pueden infectar células T primarias a través del uso de Bonzo (118). Esto cuestiona el papel fisiológico de Bonzo en la patogénesis de VIH-1.

Tabla 2. Receptores actualmente descritos como correceptores de VIH (130).

CORRECEPTOR	LIGANDO	PATRÓN DE EXPRESIÓN
<i>Receptores de quimioninas</i>		
CCR2b	MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-4	Monocitos, células NK, basófilos, células T activadas, células precursoras mieloides.
CCR3	Eotaxin, RANTES, MCP-3, MCP-4	Monocitos, células T, eosinófilos, células de la microglia.
CCR5	MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES	Monocitos activados, células T macrófagos, células dendríticas.
CCR8	I-309	Monocitos activados, linfocitos, neutrófilos y timocitos.
CCR9	CC quimiocinas	Linfocitos T memoria, timo, intestino delgado, bazo.
CXCR4	SDF-1 α , -1 β	Células T activadas y naive, células B, monocitos, macrófagos, granulocitos, células dendríticas, plaquetas, cerebro.
CX3CR1 (V28)	Fractalkina	Tejido linfoide y neural.
<i>Receptores huérfanos relacionados a los receptores de quimiocinas</i>		
STRL33/Bonzo	Desconocido	Tejido linfoide (células T resting), PBMC, placenta, timocitos.
GPR15/BOB	Desconocido	Células T, megacariocitos, timocitos, colon.
GPR1	Desconocido	Macrófagos, células mesangiales y del trofosblato.
<i>Receptores virales</i>		
US28	CC quimiocinas	
<i>Otros receptores</i>		
BLTR	Leucotrieno B4	Eosinófilos.
ChemR23	Desconocido	Células dendríticas, macrófagos, linfocitos, células del trofoblasto.
APJ	Apelin	Células gliales, astrocitos, subpoblaciones neuronales, PBMC activados, bazo, timo.