

Antagonistas de CCR5 en la infección por virus de inmunodeficiencia humana (VIH): aspectos generales y tropismo viral

Pablo Ferrer C.⁽¹⁾, Consuelo Rodríguez M.⁽²⁾, Rocío Tordecilla F.⁽²⁾, María A. Guzmán M.⁽³⁾, Alejandro Afani S.⁽³⁾

⁽¹⁾Laboratorio Medicina Molecular, Sección Inmunología, VIH y Alergología, Departamento de Medicina, HCUCH.

⁽²⁾Residente Inmunología Clínica, Escuela de Postgrado, Universidad de Chile.

⁽³⁾Sección Inmunología, VIH y Alergología, Departamento de Medicina, HCUCH.

SUMMARY

The human immunodeficiency virus (HIV) is highly mutagenic and generates resistance to the available anti-HIV drug therapies. Because of this a new family of anti-HIV drugs therapies has been created. These new drugs have different mechanisms of action. The HIV entry inhibitors act through specific coreceptors CCR5/CXCR4 localized on CD4⁺ cells. The HIV tropism determination (phenotypic and genotypic assays) arises to guide therapeutic decisions and define to which patients this treatment will be successful. Genotypic assays are technically advantageous and represent a more feasible alternative to phenotypic assays. The genotypic tropism assay from proviral DNA would have a greater impact, because of its ability to detect tropism in those patients with low or undetectable viral load.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad, la estrategia de manejo de la infección por VIH es la terapia antirretroviral activa (TARV), basada en la asociación de tres fármacos antirretrovirales de familias diferentes, capaces de actuar en distintos niveles del ciclo viral del VIH. Debido a la aparición de resistencia viral se hace necesario crear nuevas TARV efectivas y más seguras. En este contexto nace una nueva familia de fármacos antirretrovirales, los inhibidores de entrada^(1,2).

Realidad de epidemia VIH en Chile

Según el último informe del Ministerio de Salud de Chile existen 24.014 casos notificados de VIH y se estima una notificación de 30 casos semanales. Hacia finales de 2012 se espera un total de 1.620 casos nuevos. Ante esta inquietante realidad y frente a la falta de una vacuna eficaz, la mejor estrategia de manejo planteada es la cobertura universal de TARV para los pacientes infectados por VIH que cumplan ciertos requisitos^(2,3).

En nuestro país, la TARV constituye una Garantía Explícita de Salud (GES). Sin embargo, la efectividad de la TARV no es absoluta, estimándose que un 17.4% de los que la inician fracasarán en su primera TARV; de estos, a un 50% se les realiza un análisis genotípico, encontrándose que un 91% tiene al menos resistencia a una clase de fármacos; la mayoría, a dos. Esto se debe a factores del huésped (efectos adversos, mala adherencia) y/o factores propios del virus (alta replicación viral y mutagenicidad). El desarrollo de resistencia tiene como consecuencias el aumento de la carga viral y una baja en los linfocitos T CD4, que lleva a la progresión de la enfermedad. En este contexto surge la importancia de generar nuevos fármacos con mecanismos de acción distintos a los tradicionales inhibidores de polimerasa (análogos y no análogos de nucleósidos) e inhibidores de proteasa viral. De esta manera, surgen los inhibidores de entrada, fármacos dirigidos contra los correceptores (CCR5 o CXCR4) de las células CD4+, impidiendo la entrada del VIH a las células^(2,3).

CCR5 y CXCR4: Receptores de quimioquinas relevantes en la infección por VIH

Se sabe que *in vitro* el VIH es capaz de unirse a una serie de receptores de quimioquinas (QQ); sin embargo, la evidencia clínica y experimental avala sólo su unión a CCR5 y CXCR4 *in vivo*. Ambos receptores se expresan en combinación con CD4 en la superficie de todas las células blancas de la infección por VIH, incluyendo linfocitos T CD4, macrófagos y células dendríticas. Los receptores de QQ corresponden a proteínas transmembrana, pertenecientes a la superfamilia de receptores ligados a proteína G. Frente a la unión de QQ con sus receptores se produce fosforilación de los receptores a nivel de residuos de serina o treonina, dispuestos entre el extremo C-terminal y el tercer dominio intracelular. Así se gatillan diversas respuestas celulares como el desarrollo y quimiotaxis de leucocitos, angiogénesis y la respuesta inmune en general.

Además, participan en múltiples respuestas inflamatorias agudas y crónicas, trastornos neurológicos, cáncer, y como se comentó previamente, en la patogénesis de la infección por VIH-1^(4,5,6).

Biología de CCR5

Distintas QQ pueden unirse al receptor CCR5 con variadas afinidades y eficiencia en su activación. Las QQ CCL3 (MIP-1 α), CCL4 (MIP-1 β) y CCL5, también conocido como RANTES, son agonistas de CCR5 e identificadas como las mayores supresoras de infección por VIH en los ensayos.

En humanos, la mutación homocigota de CCR5, causada por delección natural de 32 pares de bases del gen CCR5 (denominada mutación CCR5 Δ 32), está presente en 2-3% de la población blanca. Los individuos portadores de esta mutación son altamente resistentes a la infección por VIH-1, pero la protección no es absoluta. Es así como se ha reportado infección por VIH-1 en personas hemofílicas y homosexuales homocigotos para CCR5 Δ 32. Lo anterior puede ser explicado por presencia de secuencias típicas en el gen *env* del virus con tropismo CXCR4 o tropismo dual (CCR5-CXCR4), por lo que utilizan como vía de entrada e infección el correceptor CXCR4.

Otros estudios sugieren que la resistencia a la infección por VIH en homocigotos para CCR5 Δ 32 sería por ausencia de CCR5 en la superficie celular, así como regulación hacia abajo llevada a cabo por la proteína mutante CCR5 Δ 32 sobre CXCR4. Incluso se ha demostrado que la presencia de proteína mutada CCR5 Δ 32 actúa como factor supresor clave de la infección por VIH. Lo anterior podría explicarse por alteración estequiométrica de moléculas involucradas en la entrada del virus a la célula. De esta forma surge un enorme campo de estudio de nuevas drogas que imiten las interacciones de la proteína CCR5 Δ 32^(4,5).

Biología de CXCR4

CXCR4 es un receptor de QQ que se expresa en la superficie celular y tiene como ligando principal a la QQ CXCL12/SDF-1, altamente conservada y con 6 isoformas identificadas. Siendo su isoforma CXCL12 γ un agonista muy débil, pero el más potente en bloquear la infección por VIH, ya que determina la internalización de CXCR4^(5,6).

Rol de CCR5 y CXCR4 en la entrada del VIH-1

Los determinantes claves de la fusión y posterior entrada del virus a la célula corresponden a segmentos específicos a nivel de la glicoproteína de envoltura viral, el receptor CD4 y correceptores CCR5/CXCR4 a nivel celular. La glicoproteína viral es procesada a dos subunidades: gp120 y gp41. La gp120 externa es responsable de la unión específica a las células blanco, debido a su unión al receptor CD4. Y la subunidad gp41 de transmembrana cataliza la reacción de fusión y anclaje a la membrana de la célula blanco.

La glicoproteína de envoltura del VIH se organiza como un heterotrímero de tres gp120-gp41.

Primero, ocurre la reacción de fusión mediante la unión de gp120 a su receptor CD4 de alta afinidad. Esto gatilla cambios conformacionales en CD4 y en gp120, determinando exposición o creación del sitio de unión del correceptor, ya sea CCR5 o CXCR4, permitiendo la consiguiente unión de gp120 a uno de éstos correceptores. Es conocido que la unión gp120-CD4 no es suficiente para la fusión del virus, por lo que la unión al correceptor y formación del complejo heterotrimérico gp120-CD4-CCR5/CXCR4 es clave. Por lo tanto, la interacción de gp120 con un correceptor permite que gp41 inserte su extremo N-terminal, conocido como péptido de fusión, dentro de la membrana de la célula blanco, seguido del repliegue de péptidos intermediarios aledaños, generándose el acercamiento de ambas membranas y permitiendo la fusión (Figura 1).

Se ha demostrado que el *loop* V3 de la gp 120 del virus VIH-1 es la región que determinaría el tropismo viral. El tropismo viral se determina según la habilidad de cada virus en forma individual, de utilizar los correceptores CCR5 (R5), CXCR4 (X4) o ambos (R5X4). La capacidad de unión a ambos correceptores se denomina tropismo dual

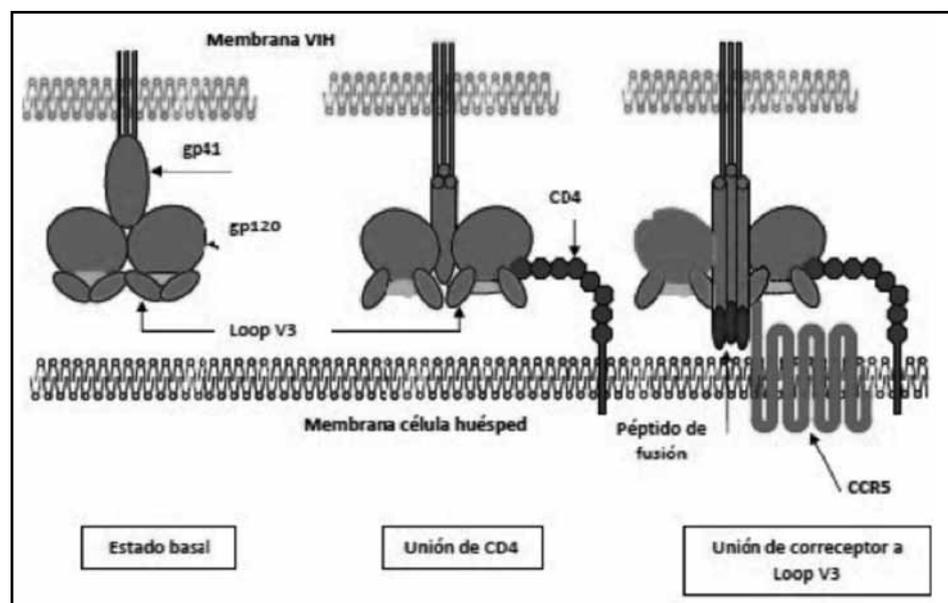


Figura 1.
Unión y fusión de
VIH a célula CD4⁺.

(R5X4), subclasificándose en dual-R, en caso de uso más eficiente de R5 y dual-X, en uso más eficiente de X4^(1,4).

Rol de CCR5 y CXCR4 en la transmisión e infección del VIH-1

Las cepas de virus R5 aparecen tempranamente en la infección y son responsables de la transmisión viral. En cambio, las cepas X4 aparecen más tardíamente y se asocian con el descenso de LTCD4+. En el 40-50% de los infectados, el cambio de R5 a X4 determina la rápida caída de LTCD4+ y la progresión a etapa de síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA).

A pesar de que el paciente VIH (+) donante posea tropismo viral dual (R5/X4), habitualmente en el receptor se detectan sólo cepas R5 en etapa aguda. No existe explicación clara para el predominio franco de R5 en pacientes con infección aguda, pero podría explicarse por amplificación de cepas R5 posterior a la transmisión viral. Lo anterior, basado en reclutamiento intenso de linfocitos TCD4+CCR5+ en sangre periférica, favoreciendo la replicación de variantes R5 en desmedro de las X4. Por otra parte, existe un elevado número de linfocitos T CD4+CCR5+ de memoria y/o activados a nivel del tejido linfoide asociado a mucosas, considerados el sitio principal de replicación del VIH durante la infección primaria. A pesar de lo comentado, la transmisión mediante cepas de tropismo R5/X4 ha sido documentada en casos aislados (4-6%).

Durante la fase asintomática de la infección es común la existencia de una población homogénea de virus R5, con habilidad de replicación en células T y macrófagos. Existe evidencia suficiente para sugerir que la respuesta inmune efectiva del huésped ejerce una presión selectiva que impide la emergencia de cepas X4. De esta manera, cuando el sistema inmune del huésped empieza a declinar debido

a progresión de la infección por VIH, ocurre la emergencia de cepas X4. Sin embargo, la mayoría de los pacientes que progresan a SIDA presentan cepas virales con tropismo R5 y en el caso de pacientes carentes de CCR5, éstos progresan a SIDA a expensas de X4 o X4R5.

Estudios epidemiológicos de corte transversal demuestran que el 80-85% de los pacientes VIH vírgenes a TARV presentan tropismo R5 al inicio de TARV y el 15-20% restante presenta tropismo mixto o dual. Por otra parte, hay evidencia que sugiere que cepas R5 de emergencia tardía poseen sensibilidad reducida para los inhibidores de entrada y elevada capacidad para provocar caída de LTCD4+.

Actualmente no se acepta el concepto de un cambio aislado e irreversible de correceptores R5 a X4 acorde avanza la infección. Se sugiere que es un proceso dinámico, en constante evolución, de manera que tras la aparición de cepas X4, permanecen cepas con tropismo R5^(4,5,6,7).

Antagonistas de receptores CCR5

Los antagonistas de CCR5 representan la segunda clase de inhibidores de entrada del VIH aprobados para el tratamiento de la infección por VIH-1. Éstos inhiben exclusivamente la replicación de las variantes de VIH con tropismo por CCR5^(8,9).

El único antagonista de CCR5, aprobado por la FDA (*Food and Drug Administration, EEUU*) en el año 2007 y comercializado en Chile es Maraviroc (MRV). MRV fue inicialmente aprobado para tratamiento de pacientes en falla virológica secundaria a resistencia a otras familias de anti-retrovirales. Posteriormente, se aprobó su uso en pacientes vírgenes a TARV. Actualmente otro antagonista de CCR5 (Vicriviroc) se encuentra en estudio fase clínica III. Además están en desarrollo dos anticuerpos monoclonales contra CCR5 con

rol potencial en prevenir la transmisión del VIH e intensificar la TARV⁽⁶⁾.

MRV es un inhibidor alostérico del receptor transmembrana de la QQ CCR5. Posee biodisponibilidad oral y se une específicamente a la concavidad entre las hélices 2, 3, 6 y 7 de CCR5. Luego de la unión de MRV, CCR5 cambia de conformación, especialmente a nivel del *loop* extracelular (ECL2), lo cual inhibe finalmente la interacción con gp120 del VIH, impidiendo la entrada del virus. Debido a este mecanismo de acción es que la actividad de MRV es exclusiva sobre las variantes CCR5 del VIH, asociándose así la presencia detectable de virus X4 o con tropismo dual, a falla terapéutica a MRV. Es por esto que previo a la indicación y uso de MRV es necesario determinar el correceptor utilizado por el virus infectante, certificando su tropismo CCR5. Para la determinación del tropismo viral se han diseñado estudios fenotípicos y genotípicos aplicables a la práctica clínica⁽⁹⁾.

Determinación del tropismo viral: necesidad de nuevos ensayos.

Históricamente el test de referencia para determinar el tropismo viral ha sido el ensayo fenotípico TrofileTM (Monogram Biosciences, USA), basado en tecnología viral recombinante. TrofileTM ha sido utilizado en estudios clínicos, demostrando buena correlación con resultados virológicos. Sin embargo, tiene limitaciones logísticas y técnicas importantes que lo hacen poco eficiente en la práctica clínica.

Por otro lado, los ensayos genotípicos se basan en el análisis de la secuencia de aminoácidos de la región (*loop*) V3 de la glicoproteína gp120 del VIH, la cual se relaciona estrechamente con el tropismo viral, representando una alternativa más cercana a la realidad clínica, ya que son test rápidos, más económicos y con mayor disponibilidad en laboratorios especializados en VIH⁽⁹⁾.

Actualmente guías de manejo de la infección por VIH tales como la española (www.gesida.seimc.org), británica (www.bhiva.org/tropism.aspx) y europea (www.europehivresistance.org), específicamente incluyen dentro de sus recomendaciones el uso de genotipificación para guiar el uso clínico de antagonistas de CCR5. En este contexto las técnicas genotípicas se han esparcido rápidamente en los dos últimos años a nivel europeo, reemplazando el ensayo fenotípico inicial. En Estados Unidos la experiencia con técnicas de genotipificación es limitada, debido al fácil acceso al laboratorio de referencia para el ensayo fenotípico⁽⁹⁾.

El uso de programas computacionales que apoyan los estudios basados en la genotipificación de V3, como geno2pheno o PSSM, ha demostrado mediante análisis retrospectivos (MOTIVATE/A4001029 y MERIT) así como en estudios de cohortes, que la genotipificación es una alternativa capaz de predecir las respuestas virológicas a la terapia con antagonistas de CCR5, a pesar de que la sensibilidad para detectar variantes X4 es menor en comparación con el TrofileTM. De esta forma se demostró que las herramientas de genotipificación son comparables al TrofileTM en la determinación del tropismo viral para la predicción de respuestas virológicas a MRV, identificando a respondedores de no respondedores a pesar de que la sensibilidad para detectar variantes X4 fue de 63% para geno2pheno (FPR5%) y 59% para PSSM en comparación con TrofileTM. Lo mismo ocurrió posteriormente con los análisis con geno2pheno-5,75% y geno2pheno-10%⁽¹⁰⁾ (*18th Conference on retroviruses and opportunistic infection, Boston, 2011. Brumme C, Wilkin T, Su Z, Schapiro J, Kagan R, Chapman D et al. Relative performance of ESTA, Trofile, 454 Deep sequencing, and "reflex" testing for HIV tropism in the MOTIVATE screening population of therapy-experienced patients*).

Reportes recientes han mostrado resultados de estudios clínicos en cohortes europeas, en las cuales

la respuesta virológica a MRV fue evaluada en base al tropismo viral genotípico. Los resultados obtenidos muestran tasas de respuesta a MRV sobre el 82% en pacientes con tropismo CCR5⁽⁹⁾.

Actualmente la técnica de genotipificación validada y ampliamente utilizada a nivel mundial se denomina RNA V3 *loop*. En este ensayo se utiliza plasma del paciente que contiene partículas virales, las cuales son lisadas con el fin de extraer el ARN. Se continúa con la síntesis de cADN y una primera amplificación del *loop* V3. Luego, una segunda reacción de la polimerasa en cadena (PCR). Posteriormente se visualizan los productos de PCR y finalmente se secuencian. El ensamble y análisis de calidad de las secuencias obtenidas se realiza utilizando *software* bioinformático y la predicción del tropismo viral se realiza con programas computacionales que asocian la secuencia obtenida con el correceptor que puede ser CCR5 o CXCR4. El *software* más utilizado es geno2pheno [correceptor] basado en un método estadístico llamado *support vector machine* (SVM). El fundamento teórico del test genotípico del tropismo viral, por ARN o por ADN proviral, se basa en que la secuencia de aminoácidos del asa V3 de la gp120 está altamente correlacionada con el tipo de correceptor que utiliza el virus VIH, ya sea CCR5 o CXCR4.

Sin embargo, un 20% de los pacientes que podría beneficiarse de un antagonista del CCR5 (MRV) poseen carga viral (CV) de VIH en plasma muy baja o indetectable, lo que hace imposible el uso de RNAV3Loop dado que éste requiere una CV mayor a 1000 copias/ml.

El ensayo por ADN proviral tiene la ventaja de que no requiere CV detectable, ya que el DNA inserto en las células infectadas por VIH es más estable y por lo general, más abundante, aún cuando los pacientes estén en TARV exitosa (CV indetectable). De esta forma, el uso de ADN pro-

viral podría resolver el 20% de los test por ARN que quedan invalidados, debido a la baja CV de las muestras.

Por lo anterior, en la actualidad se propone la utilización de ADN proviral para determinar el tropismo viral, ensayo que denominamos DNAV-3Loop.

Distintos estudios han demostrado relativa buena correlación entre los métodos genotípicos que utilizan ARN y ADN proviral en la determinación del tropismo del VIH con una concordancia aproximada de 82%⁽⁹⁾.

RECOMENDACIONES CLÍNICAS PARA LA DETERMINACIÓN DEL TROPISMO VIH

Pacientes vírgenes a TARV

Actualmente no existe una recomendación extendida de realizar tropismo viral a todos los pacientes que iniciarán TARV. Sin embargo, el Departamento de Salud y Servicios Humanos de Estados Unidos (DHHS) y las Guías de TARV de la Sociedad Clínica Europea de SIDA (EACS) consideran a MRV como un régimen aceptable o alternativo para pacientes vírgenes a TARV, considerándolo como terapia de inicio en situaciones clínicas especiales como en casos de resistencia primaria, toxicidad/intolerancia a drogas de primera línea o riesgo de interacciones farmacológicas. Debido a que el viraje a X4 puede ocurrir antes del inicio de la TARV, se debe determinar el tropismo viral, previo al inicio de MRV, no más allá de 1 a 3 meses (evidencia BIII)⁽⁹⁾.

Pacientes en TARV

La determinación del tropismo viral se recomienda en todos los pacientes con falla virológica para facilitar el diseño de la terapia de rescate óptima (evidencia AIII).

En aquellos pacientes en supresión viral, pero con necesidad de uso de MRV por cualquier motivo (intolerancia/toxicidad, interacciones farmacológicas, simplificación o intensificación de la estrategia terapéutica), el tropismo viral se puede realizar a partir ADN proviral (evidencia CIII). A pesar de que la evidencia que valida esta técnica aún es escasa, los resultados clínicos avalan su uso.

La tasa de cambio de tropismo de R5 a X4 durante TARV supresiva varía entre 6,1 y 14,9% según el momento y tipo de estudio (ARN viral/ADN proviral)⁽⁹⁾.

CONCLUSIÓN

En el escenario actual, la resistencia del VIH es un hecho cada vez más frecuente, por lo que se ha hecho necesaria la producción de nuevas drogas antiretrovirales con distintos mecanismos de

acción. Debido a lo anterior, los inhibidores de entrada han logrado consolidarse como drogas de rescate frente a la aparición de resistencia, así como también, últimamente como drogas de inicio de TARV. Siempre es necesario determinar el tropismo viral de cada cepa, previo al uso de estas drogas, ya que esto determinará el éxito de la terapia. En este ámbito, los estudios fenotípicos son reconocidamente los métodos de referencia. Sin embargo, los estudios genotípicos han surgido como una alternativa más accesible y además ventajosa en el campo de la detección del tropismo en aquellos pacientes con cargas virales bajas o indetectables. En la actualidad los investigadores en esta área tienen como objetivo validar la técnica de ADN proviral frente a la de ARN viral y con ello poder beneficiar a un mayor número de pacientes con necesidad de utilizar estas nuevas drogas antiretrovirales.

REFERENCIAS

1. Sepúlveda C, Afani A. SIDA. Eds. Editorial Mediterráneo, cuarta edición, 2009.
2. MINSAL. Evolución del VIH-SIDA Chile, 1984-2010. Ministerio de Salud, Chile, 2010.
3. MINSAL. Guía Clínica: Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida VIH/SIDA. Serie Guías Clínicas. MINSAL, 2010.
4. Schuitemaker H, Van't Wout AB, Lusso P. Clinical significance of HIV-1 coreceptor usage. *J Transl Med* 2011;27:9 Suppl 1:S5.
5. Alkhatib G. The biology of CCR5 and CXCR4. *Curr Opin HIV AIDS* 2009;4:96-103.
6. Choi WT, An J. Biology and clinical relevance of chemokines and chemokine receptors CXCR4 and CCR5 in human diseases. *Exp Biol Med (Maywood)* 2011;236:637-47.
7. Irlbeck DM, Amrine-Madsen H, Kitrinós KM, Labranche CC, Demarest JF. Chemokine (C-C motif) receptor 5-using envelopes predominate in dual/mixed-tropic HIV from the plasma of drug-naive individuals. *AIDS* 2008;22:1425-31.
8. Gilliam BL, Riedel DJ, Redfield RR. Clinical use of CCR5 inhibitors in HIV and beyond. *J Transl Med* 2011;9 Suppl 1:S9.
9. Poveda E, Poveda E, Alcamí J, Paredes R, Córdoba J, Gutiérrez F, Llibre JM *et al.* Update on clinical and methodological recommendations for genotypic determination of HIV tropism to guide the usage of CCR5 antagonists. *AIDS Rev* 2012;14:208-17.
10. McGovern RA, Thielen A, Mo T, Dong W, Woods CK, Chapman D *et al.* Population-based V3 genotypic tropism assay: a retrospective analysis using screening samples from the A4001029 and MOTIVATE studies. *AIDS* 2010;24:2517-25.

CORRESPONDENCIA



BQ. Pablo Ferrer Campos
Laboratorio Medicina Molecular,
Sección Inmunología, VIH y Alergología,
Departamento de Medicina,
Hospital Clínico Universidad de Chile
Santos Dumont 999, Independencia, Santiago
Fono: 2978 8592
E-mail: pferrer@redclinicauchile.cl.