

Cómo se integra el ADN proviral en el ADN de la célula del huésped y cómo se puede inhibir el proceso

Gilles Mirambeau

Unitat de Recerca de la Sida. Fundació Clínic-IDIBAPS. Parc Científic de Barcelona. Universitat de Barcelona. Barcelona. España.
UFR des Sciences de la Vie. Université Pierre et Marie Curie. Paris. Francia.

El ciclo de replicación del virus de la inmunodeficiencia humana pasa por una etapa de integración de su ADN proviral dentro del ADN de la célula. Este proceso implica que la integrasa (IN), la enzima viral, se asocia a los extremos del ADN proviral para actuar en dos etapas. La primera fase que parece citoplásmica incumbe al «procesado 3'», donde la IN corta 2 nucleótidos en cada extremo 3' de la doble hélice viral. La segunda fase que ocurre en el núcleo corresponde a la transferencia de hebra que la IN cataliza, combinando 2 roturas monocatenarias del ADN celular con la unión de cada extremo 3' del ADN viral al extremo 5' del ADN celular. A pesar de que esta actividad todavía no se entiende perfectamente y que la estructura de la integrasa no está resuelta en su forma activa, que supone un estado de tetrámero, se ha encontrado fármacos de la familia del ácido diacetónico como inhibidores muy potentes de la segunda etapa, la transferencia de hebra, que han llegado por medio de una serie de optimización al encuentro de una molécula muy eficaz clínicamente: el raltegravir. Una síntesis del conocimiento básico sobre la integrasa, su actuación y los modos de inhibición de esta enzima se presenta en este capítulo con la perspectiva actual del encuentro de la segunda generación de inhibidores de integrasa, teniendo en cuenta la aparición reducida pero real de resistencia al raltegravir.

Palabras clave: integrasa, ADN, integración acoplada, procesado 3', transferencia de hebra, ácido diacetónico

How proviral DNA is integrated into the host cell DNA and how this process can be inhibited

The HIV replication cycle passes through a stage of integrating proviral DNA into the cell's DNA. In this process, the viral enzyme, integrase, catalyses two reactions. The first reaction, which seems to occur in the cytoplasm, involves 3'-end processing, in which two nucleotides are removed from the 3' ends of the viral DNA

by integrase. The second reaction, which occurs in the nucleus, involves the strand transfer reaction, catalyzed by integrase, in which the recessed 3' ends of the viral DNA are joined to the protruding 5' ends in the target DNA. Although this activity has not yet been completely defined and the structure of the active form of integrase, probably a tetramer, has not been resolved, drugs of the diketoacid (DKA) family have been found. These drugs are highly potent inhibitors of the second phase, the strand transfer reaction. Through a series of optimizations, a highly effective molecule for clinical use, raltegravir, has been achieved. The present article provides a summary of basic knowledge on integrase, as well as the activity and the modes of inhibition of this enzyme. Also discussed is the reduced, but nevertheless real, development of resistance to raltegravir, requiring second-generation integrase inhibitors to be designed.

Key words:

La ruta de la preintegración

Para llevar a cabo la integración como ADN proviral en el genoma celular, el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) ha desarrollado una estrategia de movilidad de su genoma que le permite llegar desde el citoplasma de la célula infectada, acompañado por la integrasa (IN), hasta la cromatina de la célula diana. Una de sus características es poder dirigir ingeniosamente el ADN y la IN hacia el compartimento nuclear de células que no se dividen, agrupados en un complejo transitorio denominado complejo de preintegración (CPI). Estas etapas preintegrativas están detalladas en publicaciones recientes¹⁻⁵.

Los procesos de maduración por la proteasa (PR) dentro de la partícula viral (que produce alrededor de 200 unidades monoméricas de IN), seguido de la transcripción inversa por la retrotranscriptasa (RT, que produce dentro del citoplasma del huésped una doble cadena del ADN viral de cerca de 10.000 pb), van a permitir condicionar este CPI y favorecer la puesta en marcha de la IN. Se tiene que considerar también el desmantelamiento de la cápsida viral durante el camino intracelular, y los factores celulares implicados en el desarrollo de esta movilidad, bien para potenciar u obstaculizar su progresión o bien con efectos todavía desconocidos. La IN posicionada sobre el ADN proviral tiene propiedades que benefician el transporte del

Correspondencia: Dr. G. Mirambeau.
Unitat de Recerca de la Sida. Fundació Clínic-IDIBAPS.
Parc Científic de Barcelona. Universitat de Barcelona.
Baldiri Reixach, 15-21. 08028 Barcelona. España.
Correo electrónico: gilles.mirambeau@free.fr

CPI al núcleo, tiempo antes de plantear su acción catalítica. Otros factores virales de la IN que favorecen ese transporte es en el tráfico intracelular para abrir el camino al núcleo o con el sistema defensivo para anular su acción.

Así, pues, hay numerosas posibilidades de impedir la reacción de integración antes de llegar a su fin, además del bloqueo de PR y de RT. Sin embargo, teniendo en cuenta la facilidad de buscar los inhibidores de enzimas, y a pesar de la dificultad de controlar la actividad de la IN del VIH *in vitro*, los ensayos realizados sobre la IN desde principios de los años noventa han permitido identificar inhibidores de su actividad enzimática, en particular la familia del ácido diacetónico (DKA)⁶. En 2007 con la aprobación del raltegravir se consigue un nuevo medicamento contra el sida, y se obtienen otras moléculas capaces de superar los ensayos clínicos, como el elvitegravir. Finalmente, la aparición de resistencias de los virus a estos 2 componentes sale ahorra con la necesidad de entender como va.

Alternativas a la integración

Una fracción no despreciable del ADN viral lineal que ha entrado en el núcleo no se integra y se encuentra en forma circular. La maquinaria celular de mantenimiento del ADN reconoce el ADN viral lineal como un ADN roto y su circularidad se efectúa por medio de la maquinaria de recombinación homóloga o no homóloga⁷. El ADN proviral circulante que se obtiene de estas maneras no es replicativo, pero persiste dentro del núcleo por un tiempo que puede ser bastante largo. En presencia de inhibidores de la familia del raltegravir, la ausencia de formas integradas está compensada con una acumulación de estos círculos⁸. Éstos no parecen capaces de llevar a cabo la replicación viral, pero en cambio permiten la expresión de las proteínas Nef y Tat del VIH en ciertas líneas celulares *ex vivo*⁹. Por otro lado, ciertos virus mutantes que tienen la IN inactiva, son capaces de replicar débilmente en ciertas líneas celulares permisivas, como por ejemplo MT4¹⁰. Por tanto, una integración del genoma viral puede suceder en ciertos casos por un proceso de recombinación independiente de la actividad catalizada de la IN.

El proceso de integración

El ADN bicatenario producido por la RT dentro del citoplasma de la célula infectada se introduce en el núcleo, en forma de CPI, acompañado por la IN y también por la proteína Vpr^{11,12}. Una vez cerca de la cromatina diana, la IN del VIH-1 cataliza la integración del ADN viral de doble cadena en el ADN celular. Descubrimientos recientes indican que esta actividad está ligada al estado de cromatina del ADN celular¹³.

El esquema clásico de la integración del VIH se desarrolla globalmente en dos etapas que implican la fijación estable de la IN a los extremos U3 y U5 de las secuencias LTR virales¹⁴. En un primer paso, propuesto como citoplásmico y que implica un dímero de enzima en cada extremo del ADN, la IN realiza la rotura química de un dinucleótido GT en 3' de las regiones U3 y U5 (procesado 3'). A continuación, el ensamblaje tetramérico de IN, uniendo los 2 extremos del ADN viral, se prepara a un ataque de los

enlaces fosfodiéster del ADN diana por los 2 extremos 3'-hidroxil. Desde entonces, el contacto con el ADN celular provoca la «transferencia de hebra», con los extremos 3' del ADN viral que se unen de forma covalente a los extremos 5' del ADN de la célula. Los dos sitios de inserción se encuentran a 5 pares de bases de distancia y esta media vuelta de doble hélice supone un ataque acoplado de las 2 extremidades del ADN viral de cada lado del ADN diana.

Durante esta doble transferencia, los extremos 5' del ADN viral y 3' del ADN celular quedan libres en el seno de un intermedio de reacción. Estas reacciones de procesado 3' seguidas de la transferencia de hebra implican un ajuste sutil de la estructura de la IN y de los 10-20 pares de bases de cada extremo U3 y U5 de los LTR, para favorecer el cambio conformacional y la dinámica asociativa. Un elemento importante aquí es la ausencia de especificidad de secuencia diana en el sitio de integración dentro del ADN celular: es más importante la accesibilidad en el contexto de la cromatina nuclear, con la aportación de un guía como LEDGF, que orienta el proceso¹³. Esta proteína favorece la puesta en contacto de la IN, unida a los extremos del ADN viral, con el ADN de la cromatina.

Siguiendo la ramificación 3' de los 2 extremos del ADN viral en el ADN celular, las proteínas celulares son reclutadas para realizar sobre cada unión las últimas etapas del proceso de integración que corresponden típicamente a una reparación del ADN⁷. Para establecer la unión covalente entre los extremos 5' del ADN viral y el ADN celular, se necesita la escisión del dinucleótido AC en 5' del ADN viral no complementario del ADN celular, el relleno del *gap* con los nucleótidos que hacen falta y la ligación con los extremos 3' hidroxil del ADN celular.

Para favorecer esta reparación y permitir una integración productiva del ADN del VIH en su huésped, parece también indispensable eliminar la IN presente en el sitio de integración mediante la acción de una ubiquitina ligasa (la proteína VHL) y del proteasoma¹⁵. Un punto remarcable aquí es que el sitio de interacción de esta proteína con la IN coincide con el de la proteína LEDGF.

Los ensayos enzimáticos *in vitro*

Contrariamente a la RT y a la PR, la IN ha tardado mucho tiempo en poder ser estudiada *in vitro*. La razón es la mala solubilidad de esta enzima, la flexibilidad de su estructura, la complejidad de su forma de actuar y la dificultad de medir directamente la actividad de integración mediante un test enzimático *in vitro*.

Integración acoplada, procesado 3' y transferencia de hebra

Las actividades enzimáticas de la IN pueden ser reproducidas *in vitro* con la enzima purificada después de su expresión en *Escherichia Coli*. A grandes rasgos se distinguen 2 vías para el estudio *in vitro*^{6,14}: una vía microscópica que va a detallar las reacciones elementales, el procesado 3' y la transferencia de hebra, mientras que una vía microscópica intenta reproducir el conjunto de la reacción de integración, la integración acoplada, por lo menos en su parte dependiente de la IN^{16,17}. Los fragmentos de ADN utilizados más frecuentemente como sustrato enzimático viral son pequeños ADN correspondientes a los extremos U3 y

U5 o al LTR entero del ADN viral y como sustrato diana, el mismo ADN o un plásmido ADN superhelicoidal. Los sustratos de tipo viral están madurados en sus extremos 3' por el procesado 3' y después integrados en el ADN diana por la transferencia de hebra.

Los ensayos *in vitro* todavía no reproducen la integración acoplada tal y como se produce *in vivo*, sino más bien una semirreacción en cuyo proceso sólo un extremo del ADN viral se integra, o bien una reacción que inserta 2 moléculas de ADN viral en el ADN diana: es difícil para la IN unir los 2 extremos de un mismo ADN. Estas reacciones se caracterizan generalmente por una eficacia mediocre, particularmente a causa de la ausencia del reciclaje de la enzima y por una falta de especificidad de inserción. Sin embargo, es posible medir las actividades de procesado 3' y de transferencia de hebra a partir de electroforesis en condiciones desnaturalizantes. El procesado 3' implica una disminución de 2 nucleótidos de la cadena reactiva, aunque la transferencia de hebra genera una mezcla de productos donde la cadena procesada y unida a la cadena diana migra más lentamente.

Lo opuesto a la integración, la reacción de desintegración, también puede detectarse *in vitro*¹⁸. Durante esta reacción, un ADN ramificado que imita al producto de la reacción de transferencia de hebra se usa como sustrato y se convierte en 2 fragmentos de ADN. La reacción de desintegración no tiene significado biológico, si no es la posibilidad accidental de revertir la integración.

La importancia del magnesio

Las 2 reacciones, el procesado 3' y la transferencia de hebra, requieren un cofactor metálico que puede ser el magnesio o el manganeso¹⁴. Como en el caso de numerosas enzimas, la IN reproduce más escrupulosamente *in vitro* las reacciones observadas *in vivo* en presencia de magnesio. En presencia de manganeso, la reacción de la IN es más homogénea frente a las variaciones de secuencia de los extremos del ADN viral, así como a las mutaciones de la IN. Además, el cinc necesario para la estructuración del dedo de cinc del dominio N-terminal sólo activa la IN en presencia de magnesio¹⁹.

Ciertos fármacos inhibidores de la actividad IN no tienen la misma eficacia en los ensayos con magnesio o manganeso y los efectos de mutaciones que crean una resistencia a los fármacos son perceptibles generalmente en presencia de magnesio¹⁴. Estas consideraciones han conducido a utilizar grupos químicos que fijan el magnesio para la concepción racional de inhibidores de la IN. Dichos grupos están presentes en los inhibidores actualmente desarrollados, como es el caso del raltegravir y el elvitegravir.

Requisitos en el ADN viral

Un dúplex del ADN que reproduzca el extremo del ADN viral debe tener como mínimo una quincena de pares de bases para permitir el procesado 3' *in vitro*. Los 4 pares de bases terminales son los más importantes para el reconocimiento específico por la IN, en particular aquellas en posición 3 y 4 (C:G, A:T) incluidas en los 2 extremos U3 y U5 en todos los ADN retrovirales y los numerosos elementos transponibles²⁰.

De hecho, el análisis de la secuencia U5 propone que, además de las posiciones 3 y 4, la integridad de los últimos 6 residuos debe ser respetada para optimizar la interacción con el centro catalítico. La repetición de A-T un poco

más alejada favorece también el procesado 3'. Los residuos en posición 4 (C y G) establecen los contactos, a través de sus bases, con la IN²⁰.

La estructura de la integrasa y sus interacciones con el ADN

La IN del VIH-1 se obtiene dentro del virus a partir de la poliproteína Gag-Pol y su procesado por la proteasa viral. En su forma madura, se trata de una proteína de 288 aminoácidos (32 kDa) constituida por 3 dominios estructurales y funcionales: un dominio N-terminal (residuos 1-50), un dominio central o centro catalítico (residuos 50-212) y un dominio C-terminal (residuos 212-288). Las estructuras de los dominios están resumidas aquí (para más detalles, se puede consultar Chiu et al¹⁹).

El centro catalítico

El centro catalítico de la IN del VIH se parece mucho al centro de las otras integrasas retrovirales, todas contienen el motivo llamado tríada catalítica DDE. Su estructura forma un dímero esférico, en el que cada monómero aparece como una semiesfera que contiene 5 hojas beta rodeadas de 6 hélices alfa que incluye la hélice $\alpha 4$ implicada en el reconocimiento del ADN y en la resistencia al raltegravir. Dentro del dímero, el sitio activo de un monómero está opuesto al sitio activo del otro monómero. Los 3 aminoácidos, muy conservados, de la tríada catalítica (D64, D116 y E152) coordinan el magnesio con el residuo E152 y se acercan a los 2 residuos D gracias a un bucle flexible (posición 140-149) crítico para la reacción y para la resistencia al raltegravir. Este bucle flexible también es importante en la estabilización del complejo IN-ADN por medio del contacto con los extremos del ADN viral, e induce un cambio conformacional de la enzima que fortalecerá esta fijación necesaria para la reacción de transferencia de hebra.

La hélice $\alpha 4$ (residuos 149-166) del centro catalítico es la región que asegura la mayor parte de los contactos específicos con el ADN viral. Esta hélice anfipática expuesta en la superficie de la proteína está bien situada para reconocer el ADN viral y celular. Los residuos importantes para el reconocimiento del ADN (K156, K159 y Q148) y la catálisis (E152) están configurados para insertarse en uno de los surcos de la doble hélice del ADN viral o celular. La lisina en posición 159, muy conservada en el seno de las integrasas retrovirales, está directamente implicada en la fijación de la enzima con el ADN viral. Este residuo contacta el átomo N7 de la adenina del sitio de corte (CA↓GT). El grupo NH₂ de la adenina parece implicado en esta interacción. K159 también puede contactar el fosfato rompible. Estos contactos están implicados en el posicionamiento del enlace rompible dentro del sitio catalítico de la enzima. Por otra parte, la lisina K156 es esencial para el reconocimiento específico del ADN y el residuo E152 de la tríada catalítica interacciona con la adenina conservada. La citosina vecina (CA↓GT) y el dinucleótido en 5' de la cadena no rompible (AC, complementario de GT) igualmente están implicados en los contactos con el centro catalítico, dentro o cerca del bucle flexible adyacente a la hélice $\alpha 4$. La tirosina Y143 interacciona con las bases AC en 5' de la

cadena no rompible, convertidas en flotantes por el procesado 3', aunque el contacto de la glutamina Q148 con la citosina flotante parece muy importante para favorecer una transición conformacional necesaria para la transferencia de hebra²¹.

Los dominios N y C-terminal

El dominio N-terminal tiene pocas similitudes entre las distintas IN, a no ser por un motivo HHCC, que fija un átomo de cinc, presente en todas las IN. Esta fijación es necesaria para el repliegue del dominio aislado. El dominio N-terminal parece contribuir a la fijación del ADN y también en la tetramerización de la enzima. Estudiado aislado, forma un dímero en el que cada monómero está constituido por 4 hélices. Cada monómero está estabilizado por un centro hidrófugo en su parte inferior y por la coordinación del átomo de cinc a través del motivo HHCC (H12 H16 C40 C43) en su parte superior.

El dominio C-terminal es menos conservado. Éste se fija inespecíficamente al ADN con la misma eficacia que la IN entera, lo que indica una implicación en la fijación no específica del ADN diana durante la transferencia de hebra. En diversos modelos, el dominio C-terminal también está implicado en la fijación del ADN viral más arriba del punto de rotura. Su estructura por separado aparece de tipo dimerico con cada monómero constituido de 5 hojas beta, parecido a un motivo SH3. La interfase de dimerización está formada por el apilamiento de las hojas betas 2, 3 y 4, en configuración antiparalela con los contactos hidrófugos entre varios residuos que describen una estructura en barril.

Oligomerización

Se han realizado pruebas de complementación con mezclas de IN desprovistas de su dominio N-terminal o C-terminal y de IN con una mutación en uno de los residuos ácidos conservados de la tríada DDE del centro catalítico²². Aisladamente, ninguna de estas proteínas posee actividad de maduración o de transferencia de hebra. Por otra parte, si una IN sin dominio N-terminal se pone en presencia de una IN sin dominio C-terminal, las actividades de maduración y de transferencia de hebra se restauran en un grado próximo al nativo, mostrando que la IN está activa bajo forma de oligómero.

Un esquema ordenado de la colocación de la IN para asegurar su actividad esta surgiendo progresivamente¹⁷. En solución, la IN puede asociarse en dímeros, tetrámeros y octámeros. Se necesita un dímero de IN para asegurar el procesado 3'. El dímero de IN puede catalizar el procesado 3' y la inserción de un solo extremo LTR, mientras que el tetrámero cataliza el procesado 3' de dos LTR. Se necesita el tetrámero de IN para poder insertar los 2 extremos del ADN viral a la distancia de 5 pares de bases en el ADN celular.

En ausencia de estructura tridimensional cristalográfica completa, se han propuesto varios modelos para representar un tetrámero de IN con el ADN viral y el ADN celular²³. Estos modelos son muy diferentes unos de los otros y no cuadran con el conjunto de las experiencias realizadas. Un modelo de tetrámero de IN también se ha podido visualizar por microscopia electrónica²⁴. La resolución obtenida no permite distinguir el ADN, y la forma global del complejo no se corresponde con ninguno de los modelos propuestos. Se espera con impaciencia que la estructura del tetrámero de la IN sea desenmascarado en plena reacción de integración.

Sobre el plan secuencial de actuación de la IN in vivo

La puesta en marcha tras la transcripción inversa de la IN dentro del contexto de la infección viral comienza a esclarecerse y se pueden hacer varias observaciones al respecto, prefigurando lo que se debe esperar de determinadas moléculas antivirales de la IN.

La formación del complejo entre la IN y los extremos del ADN viral induce un cambio de conformación de la IN que da lugar a un complejo muy estable y con una catálisis muy lenta²⁵, que no se disocia después del procesado 3'. Esta propiedad debe permitir colocar establemente in vivo la IN en los extremos del ADN viral del CPI para alcanzar la cromatina, pero el paso de dímero a tetrámero y la formación del puente proteínico que une los 2 extremos del ADN viral son todavía oscuros. De igual modo, queda oscuro el impacto del depósito no específico de IN y Vpr en el ADN viral, como también permanecen ignorados la arquitectura compacta del CPI, la capacidad del ADN viral con sus 10.000 pb de reclutar las proteínas celulares, los mecanismos de movilidad intracelular y la relación espacio-temporal entre el desmantelamiento de la cápsida, el posicionamiento de la IN en los extremos del ADN viral y la movilidad del CPI hacia el núcleo²⁶.

Este CPI debe hacer frente a una cierta hostilidad de la célula huésped y puede perderse en el camino, especialmente por la dificultad de realizar la importación nuclear, a pesar del papel activo mantenido por IN y Vpr a este efecto. Luego, el ADN viral puede ser recogido dentro del núcleo por el sistema de mantenimiento de ADN tanto antes como después de la integración. Si ocurre antes, el ADN viral parece incapaz de iniciar la segunda fase del ciclo replicativo.

La integración del ADN viral en el ADN diana se tiene que realizar a través de un tetrámero en un contexto de cromatina con el aporte de alguna guía nuclear, como la proteína LEDGF, capaz de interactuar a la vez con la IN en forma tetramérica y con el ADN diana en forma de nucleosoma²⁷.

La IN que queda en posición después de la integración es una diana del proteasoma, vía su reconocimiento por una ubiquitina ligasa (la proteína VHL), lo que parece favorable a la puesta en marcha de la transcripción sobre el promotor LTR. Asimismo, si VHL reconociera la IN antes de la integración, podría resultar muy problemático para el VIH¹⁵.

El desarrollo de los inhibidores de la integrasa

A continuación se detalla un resumen selectivo de los inhibidores específicos de la IN (para mas detalles, consultar Pommier et al⁶ y Semenova et al²⁸).

DKA y raltegravir: inhibidores de la transferencia de hebra

Las propiedades como inhibidores de la IN de los beta DKA y sus derivados fueron descubiertas independientemente por los laboratorios Merck²⁹ y Shionogi & Co. Ltd.³⁰. El raltegravir se inscribe en este grupo después de una búsqueda profundizada por los laboratorios Merck que llegó a la caracterización de los beta DKA L-708 906 y L-731988³¹.

Las modificaciones realizadas en la estructura de estas moléculas, incluido un grupo naftiridina, han conducido a unas moléculas más activas, como los compuestos naftiridina carboxamida L-870810 o L-870812³². Más recientemente, otra naftiridina carboxamida se ha puesto a punto con una actividad de inhibición de la IN más eficaz, en particular el compuesto N-(4-fluorobenzil)-8-hidroxi[1,6]naftiridina-7-carboxamida 1, a partir de la cual una nueva optimización ha permitido identificar el compuesto L-900612³³. Este compuesto, también conocido como MK-0518, finalmente ha sido registrado como raltegravir. El compuesto elvitegravir o GS-9137 (originalmente, JTK-303, descubierto por Japan Tobacco Inc. y desarrollado por Gilead desde 2005) es otro compuesto derivado del DKA, con forma de ácido dihidroquinolina-3-carboxílico³⁴.

El DKA tiene la propiedad única de inhibir selectivamente la transferencia de hebra, con una concentración de orden nanomolar para los compuestos optimizados^{6,28}. El DKA inhibe el procesado 3' a unas concentraciones mucho más elevadas. Los grupos ácidos, sobre todo el ciclo aromático, son cruciales para la selección y la eficacia de la inhibición de la transferencia de hebra. La captura de los iones metálicos divalentes dentro del sitio activo de la enzima se considera una posible explicación para la inhibición.

El modo de fijación de los DKA a la IN es el punto de mira de numerosas investigaciones. La cocristalización de uno de sus compuestos, identificado por Shionogi, el 5-CITEP, en el centro catalítico de la IN ha permitido enseñar que este inhibidor interactúa con los residuos 148, 152, 156 y 159 entre el bucle flexible y la hélice $\alpha 4$ del sitio activo³⁵. Un modelo que explica la selección de los DKA para la transferencia de hebra pone en juego dos sitios catalíticos, un donante y un aceptador, en un dímero de IN fijado a un extremo de ADN viral. En este modelo, el procesado 3' del ADN viral en el sitio donante induce un cambio conformacional de la IN para la transferencia de hebra, que permite la fijación del ADN celular en el segundo sitio aceptador³¹. Los DKA serían capaces de fijarse al nivel del sitio aceptador en una conformación intermedia del complejo ternario ADN viral-IN-magnesio inducido por el procesado 3'. Está claro que, en la célula infectada, la duración de ese complejo es suficientemente grande para que el DKA se fije. La consecuencia es una fuerte inhibición de la integración del ADN viral y un aumento significativo de la producción de círculos 2-LTR no replicativos por la maquinaria de mantenimiento celular⁸.

Los residuos de la IN afectados por las mutaciones que provocan una resistencia a los DKA son reagrupados alrededor del sitio catalítico definido por la tríada DDE, y varían ligeramente de un compuesto a otro⁶. Se encuentra a menudo el residuo Q148 implicado en el posicionamiento del ADN viral en el sitio donante de la IN antes de la transferencia de hebra o el residuo N155 necesario para la fijación del magnesio.

Los derivados DKA bifuncionales

Los derivados DKA bifuncionales se caracterizan por una fijación simultánea en el sitio donador y en el sitio receptor, provocando una inhibición eficaz tanto del procesado 3' como de la transferencia de hebra, lo que da paso a una nueva generación de inhibidores de la IN con una eficacia prometedora y una posible barrera genética más elevada³⁶. Estudios preclínicos revelan la eficacia de estos compuestos como inhibidores de la replicación viral.

Los inhibidores de la interacción integrasa-ADN

Las esterilquinolinas (SQL) se caracterizan por la presencia de un grupo quinolina unido a un grupo aromático. Las amidas de estos compuestos son las más prometedoras como inhibidoras de la IN. FZ41 es el compuesto más activo, con una concentración inhibitoria media (CI_{50}) de 1 a 4 μmol . Se comporta como un competidor del ADN viral para la fijación en la IN, y inhibe el procesado 3' en presencia de Mg^{2+} o de Mn^{2+} . No se produce integración viral en las células infectadas ni acumulación de formas circulares³⁷. Ello indica que la inhibición de la infección se produce antes de la traslocación nuclear del CPI. Además, el FZ41 inhibe la importación nuclear del IN *in vitro*³⁸. Los virus resistentes a las SQL contienen las mutaciones C280Y, V165I y V249I de la IN, lo que indica que la IN es una diana para estas moléculas en la célula³⁷.

Las fenilpirimidinas (PDP), cuyo compuesto más activo se denomina V-165, inhiben la formación del complejo IN-ADN, y con ello la reacción de procesado 3'. El V-165 inhibe la replicación viral después de la transcripción inversa³⁹. Además de las mutaciones en la IN, principalmente V165I, T206S y S230N, recientemente se han descubierto otras mutaciones en los genes de RT y ENV que apuntan a un mecanismo de acción múltiple y la necesidad de optimizar estos compuestos como inhibidores específicos de la IN⁴⁰.

Las estrategias actuales de inhibición de la integrasa

Hasta el momento se conocen dos tipos de inhibición, gracias a la identificación de inhibidores del procesado 3' e inhibidores de transferencia de hebra. Los primeros bloquean generalmente la fijación de la enzima libre en el ADN viral (FZ-41 y V-165), mientras que los segundos (como los derivados de los DKA) están dirigidos contra los complejos entre la IN y los extremos del ADN viral. La gran estabilidad de estos últimos y su persistencia dentro de la célula los convierten en una opción muy favorable en la medida en que, además, actúan selectivamente hacia las enzimas activas. Esta hipótesis se ha demostrado sobradamente por la remarcable actividad antiviral de inhibidores de transferencia de hebra, familia a la que pertenecen el raltegravir y el elvitegravir, mientras que los inhibidores de doble acción (procesado 3' y transferencia de hebra) dejan entrever una mayor eficacia.

La aparición de resistencias a raltegravir⁴¹ y a elvitegravir⁴² exhorta a encontrar otras sustancias activas con un perfil de resistencia diferente, como los derivados de las esterilquinolonas. Hoy en día, las posibilidades de inhibir la IN al nivel del CPI se buscan en los sitios que dirigen la dimerización y la tetramerización de la IN, y sobre las interacciones de la IN con LEDGF. Existen otros niveles, muy arriba en la partícula viral, para interferir en el punto de corte entre la IN y la RT, impidiendo la maduración de la IN, o bien al nivel del inicio de la transcripción inversa, en la que la IN está implicada, así como en las interacciones con los actores celulares implicados en el desplazamiento intracelular, como los microtúbulos y los poros nucleares.

La multiplicación de datos de modelos moleculares ofrece también nuevas posibilidades para optimizar el diseño de moléculas a partir de fármacos ya caracterizados, con la expectativa de un conocimiento estructural más completo

del tetramero activo⁴³. Por otra parte, un nuevo concepto de fármacos esta emergiendo con la conjugación química de un inhibidor de RT y un inhibidor de IN, por ejemplo derivado de los DKA⁴⁴. Este tipo de inhibidor dual tiene una eficacia antiviral muy prometedora.

Con estas perspectivas, después del tiempo que se ha necesitado para proponer el primer tratamiento clínico que usa un inhibidor de integrasa, se espera otros fármacos de esta familia en un futuro no muy lejano.

Agradecimientos

Le agradezco mucho a Amparo Brey, Pedro Molina, Narcís Saubi y Sonsoles Sánchez por ayudarme a escribir en castellano.

Declaración de conflicto de intereses

El autor ha declarado no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

1. Nisole S, Saib A. Early steps of retrovirus replicative cycle. *Retrovirology*. 2004;1:9.
2. Suzuki Y, Craigie R. The road to chromatin – nuclear entry of retroviruses. *Nat Rev Microbiol*. 2007;5:187-96.
3. Towers G J. The control of viral infection by tripartite motif proteins and cyclophilin A. *Retrovirology*. 2007;4:40.
4. Ciuffi A, Bushman FD. Retroviral DNA integration: HIV and the role of LEDGF/p75. *Trends Genet*. 2006;22:388-95.
5. Holmes RK, Malim MH, Bishop KN. APOBEC-mediated viral restriction: not simply editing? *Trends Biochem Sci*. 2007;32:118-28.
6. Pommier Y, Johnson AA, Marchand C. Integrase inhibitors to treat HIV/AIDS. *Nat Rev Drug Discov*. 2005;4:236-48.
7. Skalka AM, Katz RA. Retroviral DNA integration and the DNA damage response. *Cell Death Differ*. 2005;12 Suppl 1:971-8.
8. Svarovskaia ES, Barr R, Zhang X, Pais GC, Marchand C, Pommier Y, et al. Azido-containing diketo acid derivatives inhibit human immunodeficiency virus type 1 integrase in vivo and influence the frequency of deletions at two-long-terminal-repeat-circle junctions. *J Virol*. 2004;78:3210-22.
9. Wu Y, Marsh JW. Selective transcription and modulation of resting T cell activity by preintegrated HIV DNA. *Science*. 2001;293:1503-6.
10. Nakajima N, Lu R, Engelman A. Human immunodeficiency virus type 1 replication in the absence of integrase-mediated dna recombination: definition of permissive and nonpermissive T-cell lines. *J Virol*. 2001;75:7944-55.
11. Zamborlini A, Lehmann-Che J, Clave E, Giron ML, Tobaly-Tapiero J, Roingeard P, et al. Centrosomal pre-integration latency of HIV-1 in quiescent cells. *Retrovirology*. 2007;4:63.
12. Fouchier RA, Malim MH. Nuclear import of human immunodeficiency virus type-1 preintegration complexes. *Adv Virus Res*. 1999;52:275-99.
13. Engelman A, Cherepanov P. The lentiviral integrase binding protein LEDGF/p75 and HIV-1 replication. *PLoS Pathog*. 2008;4:e1000046.
14. Vandegraaff N, Engelman A. Molecular mechanisms of HIV integration and therapeutic intervention. *Expert Rev Mol Med*. 2007;9:1-19.
15. Mousnier A, Kubat N, Massias-Simon A, Segeral E, Rain JC, Benarous R, et al. Von Hippel Lindau binding protein 1-mediated degradation of integrase affects HIV-1 gene expression at a postintegration step. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104:13615-20.
16. Sinha S, Grandgenett DP. Recombinant human immunodeficiency virus type 1 integrase exhibits a capacity for full-site integration in vitro that is comparable to that of purified preintegration complexes from virus-infected cells. *J Virol*. 2005;79:8208-16.
17. Li M, Mizuuchi M, Burke TR Jr, Craigie R. Retroviral DNA integration: reaction pathway and critical intermediates. *Embo J*. 2006;25:1295-304.
18. Chow SA, Vincent KA, Ellison V, Brown PO. Reversal of integration and DNA splicing mediated by integrase of human immunodeficiency virus. *Science*. 1992;255:723-6.
19. Chiu TK, Davies DR. Structure and function of HIV-1 integrase. *Curr Top Med Chem*. 2004;4:965-77.
20. Dicker IB, Samanta HK, Li Z, Hong Y, Tian Y, Banville J, et al. Changes to the HIV long terminal repeat and to HIV integrase differentially impact HIV integrase assembly, activity, and the binding of strand transfer inhibitors. *J Biol Chem*. 2007;282:31186-96.

21. Johnson AA, Santos W, Pais GC, Marchand C, Amin R, Burke TR Jr, et al. Integration requires a specific interaction of the donor DNA terminal 5'-cytosine with glutamine 148 of the HIV-1 integrase flexible loop. *J Biol Chem*. 2006;281:461-7.
22. Lewinski MK, Yamashita M, Emerman M, Ciuffi A, Marshall H, Crawford G, et al. Retroviral DNA integration: viral and cellular determinants of target-site selection. *PLoS Pathog*. 2006;2:e60.
23. Wielens J, Crosby IT, Chalmers DK. A three-dimensional model of the human immunodeficiency virus type 1 integration complex. *J Comput Aided Mol Des*. 2005;19:301-17.
24. Ren G, Gao K, Bushman FD, Yeager M. Single-particle image reconstruction of a tetramer of HIV integrase bound to DNA. *J Mol Biol*. 2007;366: 286-94.
25. Pandey KK, Bera S, Zahm J, Vora A, Stillmock K, Hazuda D, et al. Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 concerted integration by strand transfer inhibitors which recognize a transient structural intermediate. *J Virol*. 2007;81:12189-99.
26. Nermut MV, Fassati A. Structural analyses of purified human immunodeficiency virus type 1 intracellular reverse transcription complexes. *J Virol*. 2003;77:8196-206.
27. Cherepanov P, Ambrosio AL, Rahman S, Ellenberger T, Engelman A. Structural basis for the recognition between HIV-1 integrase and transcriptional coactivator p75. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102:17308-13.
28. Semenova EA, Marchand C, Pommier Y. HIV-1 integrase inhibitors: update and perspectives. *Adv Pharmacol*. 2008;56:199-228.
29. Hazuda DJ, Felock P, Witmer M, Wolfe A, Stillmock K, Grobler JA, et al. Inhibitors of strand transfer that prevent integration and inhibit HIV-1 replication in cells. *Science*. 2000;287:646-50.
30. Billich A. S-1360 Shionogi-GlaxoSmithKline. *Curr Opin Investig Drugs*. 2003;4:206-9.
31. Espeseth AS, Felock P, Wolfe A, Witmer M, Grobler J, Anthony N, et al. HIV-1 integrase inhibitors that compete with the target DNA substrate define a unique strand transfer conformation for integrase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97:11244-9.
32. Hazuda DJ, Anthony NJ, Gomez RP, Jolly SM, Wai JS, Zhuang L, et al. A naphthyridine carboxamide provides evidence for discordant resistance between mechanistically identical inhibitors of HIV-1 integrase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101:11233-8.
33. Embrey MW, Wai JS, Funk TW, Homnick CF, Perlow DS, Young SD, et al. A series of 5-(5,6)-dihydrouracil substituted 8-hydroxy-[1,6]naphthyridine-7-carboxylic acid 4-fluorobenzylamide inhibitors of HIV-1 integrase and viral replication in cells. *Bioorg Med Chem Lett*. 2005;15:4550-4.
34. Sato M, Motomura T, Aramaki H, Matsuda T, Yamashita M, Ito Y, et al. Novel HIV-1 integrase inhibitors derived from quinolone antibiotics. *J Med Chem*. 2006;49:1506-8.
35. Goldgur Y, Craigie R, Cohen GH, Fujiwara T, Yoshinaga T, Fujishita T, et al. Structure of the HIV-1 integrase catalytic domain complexed with an inhibitor: a platform for antiviral drug design. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96:13040-3.
36. Di Santo R, Costi R, Roux A, Artico M, Lavecchia A, Marinelli L, et al. Novel bifunctional quinolonyl diketo acid derivatives as HIV-1 integrase inhibitors: design, synthesis, biological activities, and mechanism of action. *J Med Chem*. 2006;49:1939-45.
37. Bonnenfant S, Thomas CM, Vita C, Subra F, Deprez E, Zouhiri F, et al. Styrylquinolines, integrase inhibitors acting prior to integration: a new mechanism of action for anti-integrase agents. *J Virol*. 2004;78:5728-36.
38. Mousnier A, Leh H, Mouscadet JF, Dargemont C. Nuclear import of HIV-1 integrase is inhibited in vitro by styrylquinoline derivatives. *Mol Pharmacol*. 2004;66:783-8.
39. Pannecouque C, Pluymers W, Van Maele B, Tetz V, Cherepanov P, De Clercq E, et al. New class of HIV integrase inhibitors that block viral replication in cell culture. *Curr Biol*. 2002;12:1169-77.
40. Hombrouck A, Hantson A, Van Remoortel B, Michiels M, Vercammen J, Rhodes D, et al. Selection of human immunodeficiency virus type 1 resistance against the pyranodipyrimidine V-165 points to a multimodal mechanism of action. *J Antimicrob Chemother*. 2007;59:1084-95.
41. Malet I, Delelis O, Valantin MA, Montes B, Soulie C, Wirden M, et al. Mutations associated with failure of raltegravir treatment affect integrase sensitivity to the inhibitor in vitro. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52:1351-8.
42. Shimura K, Kodama E, Sakagami Y, Matsuzaki Y, Watanabe W, Yamataka K, et al. Broad antiretroviral activity and resistance profile of the novel human immunodeficiency virus integrase inhibitor elvitegravir (JTK-303/GS-9137). *J Virol*. 2008;82:764-74.
43. Severino A. In-Silico docking of HIV-1 integrase inhibitors reveals a novel drug. Type acting on a enzyme/DNA reaction intermediate. *Retrovirology*. 2007;4:21.
44. Wang Z, Bennett EM, Wilson DJ, Salomon C, Vince R. Rationally designed dual inhibitors of HIV reverse transcriptase and integrase. *J Med Chem*. 2007;50:3416-9.