



Albert Garcia i Miñambres

Doctor en virologia molecular (Deakin University), al CSIRO's Australian Animal Health Laboratories and Deakin University, bàtxelor en biotecnologia (UAB)



Albert Garcia i Miñambres

Examinant els mecanismes de supressió del VIH amb: antiretrovirals actuals, resposta innata del sistema immunològic i noves estratègies antivirals

El virus de la immunodeficiència humana tipus 1 (VIH) (figura 1) és un retrovirus responsable de la síndrome de la immunodeficiència adquirida (sida).^{1, 2} L'any 2016 es van reportar més de 36,7 milions de persones infectades per aquest virus (*UNAIDS 2016 Global AIDS update report*). El tractament estàndard del VIH, també conegut com a *combination antiretroviral therapy* (CART), consisteix en la combinació d'almenys tres fàrmacs antiretrovirals que són capaços de pràcticament suprimir aquest virus de l'organisme, impedit d'aquesta manera la progressió de la malaltia i, per tant, reduir els casos de sida. Tot i això, degut a la gran diversitat gènica del VIH, hi ha virus resistents al fàrmacs antiretrovirals que poden emergir i provocar que el tractament falli.^{3,4} A més, la gran diversitat gènica del VIH dificulta el desenvolupament de vacunes efectives, no solament contra totes les variants del VIH, sinó també contra totes les variants víriques trobades en un pacient VIH positiu.⁵ Aquesta característica del VIH és causada majoritàriament per les altes taxes de replicació vírica⁶ i les altes taxes de mutacions i recombinacions gèniques induïdes per l'enzim viral transcriptasa reversa.⁷

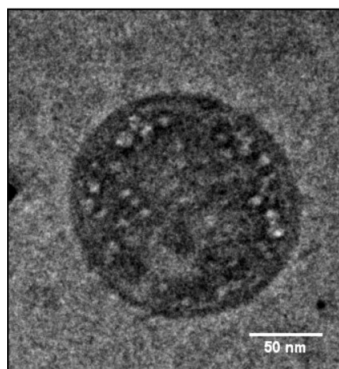


Figura 1. Imatge d'un VIH immadur (utilitzant la tècnica de cryo-electron microscopy imaging)

Un dels meus projectes està relacionat amb l'estudi de la diversitat gènica del VIH induïda per esdeveniments de recombinació gènica. En aquest sentit, un dels meus projectes és investigar i examinar els efectes de la recombinació gènica del VIH en presència de concentracions subòptimes de fàrmacs antiretrovirals contra el VIH, coneguts com a nevirapine i efavirenz. Els resultats d'aquest estudi ajudaran a esclarir el mecanisme utilitzat per aquests fàrmacs a l'hora de controlar la infecció viral del VIH. A més a més, els fàrmacs que indueixen a nivells baixos de recombinació gènica són teòricament més atractius ja que seran menys propensos a generar nous virus resistents als fàrmacs utilitzats. Per aquest motiu, els resultats d'aquest estudi poden també ajudar a dissenyar tractaments contra el VIH més adequats.

Una de les conseqüències de l'alta diversitat gènica del VIH és la ràpida adaptació del virus als nous medis. Actualment la resistència dels virus a més d'un grup de fàrmacs antiretrovirals és un problema crític, especialment en països en desenvolupament.⁸ Per aquest motiu, les noves estratègies per combatre el VIH estan a l'avantguarda.⁹

En el meu doctorat, a més d'investigar tractaments actuals del VIH, també investigo noves estratègies per inhibir la infecció vírica induïda pel VIH. Una d'aquestes estratègies està centrada en el desenvolupament de noves teràpies basades en la utilització de microbicides. L'objectiu dels microbicides és actuar com a barreres que ajuden a prevenir l'hoste d'infeccions de transmissió sexual.¹⁰ En les últimes dècades, hi ha hagut una gran quantitat de treballs que investiguen el desenvolupament de microbicides segurs, efectius i assequibles.^{10,11} No obstant això, cap dels nous microbicides proposats no ha avançat per a l'ús clínic. Un dels problemes més grans a l'hora d'utilitzar microbicides per a la prevenció del VIH és l'emergència de nous virus resistents als fàrmacs.¹²

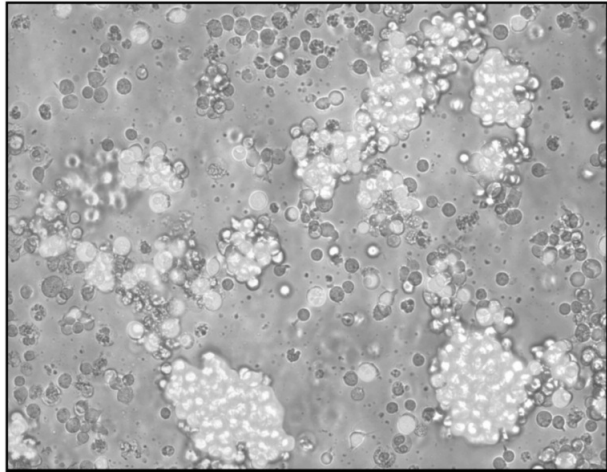
Aquest problema és particularment preocupant en el cas dels microbicides basats en fàrmacs utilitzats actualment per al tractament del VIH, com són els casos dels microbicides basats en Tenofovir, Dapivirine o Maraviroc, entre d'altres.^{13, 14}

Tot i això, la utilització de microbicides té molts avantatges. Per començar, teòricament, la millor estratègia per aturar la propagació del VIH és la via del desenvolupament de noves teràpies profilàctiques als portals d'entrada d'aquest virus. De fet, la transmissió del VIH a través de les relacions sexuals

Notes

- 1- GALLO RC, SALAHUDDIN SZ, POPOVIC M, SHEARER GM, KAPLAN M, HAYNES BF, ET AL. "Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS". *Science* (New York, NY). 1984; 224(4648):500-3. Epub 1984/05/04.
- 2- BARRE-SINOSSI F, CHERMANN JC, REY F, NUGEYRE MT, CHAMARET S, GRUEST J, ET AL. "Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS)". *Science* (New York, NY). 1983; 220(4599):868-71. Epub 1983/05/20.
- 3- ANADOL E, KAISER R, VERHEYEN J, SCHULTER E, EMMELKAMP J, SCHWARZ-ZANDER C, ET AL. "Transmission of human immunodeficiency virus 1 drug resistance - a case report. What are the clinical implications?". *European journal of medical research*. 2010; 15(5):225-30. Epub 2010/06/22.
- 4- BROOKS K, DIERO L, DELONG A, BALAMAN M, REITSMA M, KEMBOI E, ET AL. "Treatment failure and drug resistance in HIV-positive patients on tenofovir-based first-line antiretroviral therapy in western Kenya". *Journal of the International AIDS Society*. 2016; 19(1):20798. Epub 2016/05/28.
- 5- STEAIN MC, WANG B, DWYER DE, SAKSENA NK. "HIV-1 co-infection, superinfection and recombination". *Sexual health*. 2004;1(4):239-50. Epub 2005/12/13.
- 6- RODRIGO AG, SHPAER EG, DELWART EL, IVERSEN AK, GALLO MV, BROJATSCH J, ET AL. "Coalescent estimates of HIV-1 generation time in vivo". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999; 96(5):2187-91. Epub 1999/03/03.
- 7- SMYTH RP, DAVENPORT MP, MAK J. "The origin of genetic diversity in HIV-1". *Virus research*. 2012; 169(2):415-29. Epub 2012/06/26.

Figura 2. Imatge de microscòpia de limfòcits CD4 + T infectats (en verd) pel virus del VIH que contenen en el seu genoma la proteïna verda fluorescent (green fluorescent protein) (GFP)



8- "WHO. Global report on early warning indicators of HIV drug resistance". July 2016 [citat el 24.04.2017]. Disponible a: <http://www.who.int/hiv/pub/drugresistance/ewi-hivdr-2016/en/>.

9- LOONEY D, MA A, JOHNS S. "HIV therapy-the state of art". *Current topics in microbiology and immunology*. 2015; 389:1-29. Epub 2015/03/31.

10- EID SG, MANGAN NE, HERTZOG PJ, MAK J. "Blocking HIV-1 transmission in the female reproductive tract: from microbicide development to exploring local antiviral responses". *Clinical & translational immunology*. 2015; 4(10):e43. Epub 2015/12/19.

11- MCGOWAN I. "Microbicides: a new frontier in HIV prevention". *Biologicals : journal of the International Association of Biological Standardization*. 2006; 34(4):241-55. Epub 2006/11/14.

12- FRENTZ D, BOUCHER CA, VAN DE VLIJVER DA. "Temporal changes in the epidemiology of transmission of drug-resistant HIV-1 across the world". *AIDS reviews*. 2012; 14(1):17-27. Epub 2012/02/03.

13- ABDOOL KARIM Q, ABDOOL KARIM SS, FROHLICH JA, GROBLER AC, BAXTER C, MANSOOR LE, ET AL. "Effectiveness and safety of tenofovir gel, an antiretroviral microbicide, for the prevention of HIV infection in women". *Science (New York, NY)*. 2010; 329(5996):1168-74. Epub 2010/07/21.

és ineficaç comparada amb la transmissió del VIH per la via parenteral. Dels milions de virus transmesos durant les activitats sexuals, la infecció del VIH s'estableix per un grup reduït de virus coneguts com els virus fundadors.¹⁵ En estudis efectuats en macacos utilitzant un virus similar al VIH, el VIS (virus de la immunodeficiència en simis), van trobar que aquest grup reduït de virus fundadors es disseminaven ràpidament a llocs llunyans de l'organisme 24 hores després de la infecció.¹⁶ Aquests estudis, i d'altres, fan entendre que les noves teràpies que cerquen la prevenció de la infecció del VIH poden estar basades a potenciar la protecció induïda pel nostre sistema immunològic, el qual és capaç d'eliminar la major part de la infecció. A més, aquestes teràpies han de ser capaces d'actuar en les primeres 24 hores després de la infecció, abans que el virus es propagui dins del cos.^{10, 11} (figura 2)

Un dels candidats a nou microbicides que he estudiat durant el meu doctorat és una proteïna produïda a l'aparell reproductor femení, l'interferó èpsilon.¹⁷ La proteïna interferó èpsilon és produïda per les cèl·lules epitelials de l'aparell reproductor femení de manera constitutiva i la seva producció està regulada de manera hormonal.¹⁷ A més, estudis anteriors van trobar que aquesta proteïna és capaç de protegir altres infeccions de transmissió sexual, provocades per exemple per l'herpes simplex virus 2 i la *Chlamydia muridarum*.^{10, 17} Degut al

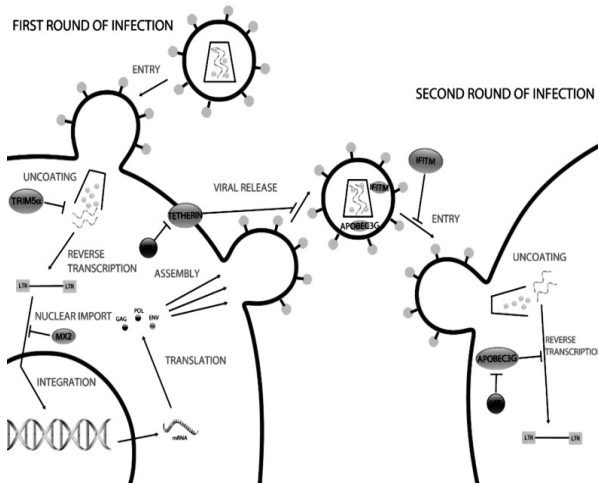


Figura 3. Representació esquemàtica del cicle viral del VIH en presència de diverses proteïnes conegudes pel seu efecte anti-VIH

fet que aquesta proteïna es troba ja en l'aparell reproductor femení, potenciar-ne l'expressió per prevenir infeccions de transmissió sexual no hauria de causar grans problemes de citotoxicitat i hauria de ser efectiva en la protecció de l'hoste. Els resultats de la meua investigació publicats el gener del 2017, han demostrat que l'interferó èpsilon és capaç d'inhibir la infecció mesurada pel VIH en diversos cultius cel·lulars, i amb gran potència. El mecanisme utilitzat per aquesta proteïna per restringir la infecció vírica del VIH és l'increment de l'expressió de proteïnes conegudes per la seva activitat anti-VIH. Especialment, hem trobat que l'interferó èpsilon incrementa l'expressió de la proteïna IFITM3, la qual és capaç d'inhibir les primeres etapes de la infecció del VIH durant el cicle de replicació viral.¹⁸ (figura 3)

A part de la investigació relacionada amb l'interferó èpsilon, s'han examinat altres compostos pel seu potencial en inhibir el VIH. En aquest cas, en lloc de potenciar la resposta immune cel·lular (ex. interferó èpsilon), els compostos utilitzats tenen com a objectiu impedir o bloquejar la unió del virus amb la membrana cel·lular. En altres paraules, busquen inhibir l'entrada del VIH a les cèl·lules hoste (figura 4). Els compostos estudiats són diversos tipus de carbohidrats. Els carbohidrats estan presents de manera ubiqüa i abundant en gairebé tots els organismes vius.¹⁹ Els avenços recents en tècniques d'alt rendiment (*high throughput techniques*), han donat

14- ROMANO J, VARIANO B, COPLAN P, VAN ROEY J, DOUVILLE K, ROSENBERG Z, ET AL. "Safety and availability of dapivirine (TMC120) delivered from an intravaginal ring". *AIDS research and human retroviruses*. 2009; 25(5):483-8. Epub 2009/04/25.

15- SALAZAR-GONZALEZ JF, SALAZAR MG, KEELE BF, LEARN GH, GIORGI EE, LI H, ET AL. "Genetic identity, biological phenotype, and evolutionary pathways of transmitted/founder viruses in acute and early HIV-1 infection". *The Journal of experimental medicine*. 2009; 206(6):1273-89. Epub 2009/06/03.

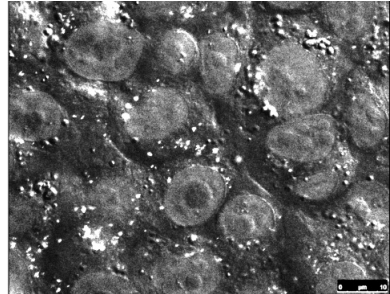
16- MILLER CJ, LI Q, ABEL K, KIM EY, MA ZM, WIETGREFE S, ET AL. "Propagation and dissemination of infection after vaginal transmission of simian immunodeficiency virus. *Journal of virology*". 2005; 79(14):9217-27. Epub 2005/07/05.

17- FUNG KY, MANGAN NE, CUMMING H, HORVAT JC, MAYALL JR, STIFTER SA, ET AL. "Interferon-epsilon protects the female reproductive tract from viral and bacterial infection". *Science* (New York, NY). 2013; 339(6123):1088-92. Epub 2013/03/02.

18- GARCIA-MINAMBRES A, EID SG, MANGAN NE, PADE C, LIM SS, MATTHEWS AY, ET AL. "Interferon epsilon promotes HIV restriction at multiple steps of viral replication". *Immunol Cell Biol*. 2017. Epub 2017/01/04.

- 19- BEHRENS AJ, VASILJEVIC S, PRITCHARD LK, HARVEY DJ, ANDEV RS, KRUMM SA, ET AL. "Composition and antigenic effects of individual glycan sites of a trimeric HIV-1 envelope glycoprotein". *Cell reports*. 2016; 14(11):2695-706. Epub 2016/03/15.
- 20- SONG X, HEIMBURG-MOLINARO J, CUMMINGS RD, SMITH DF. "Chemistry of natural glycan microarrays". *Current opinion in chemical biology*. 2014;18:70-7. Epub 2014/02/04.
- 21- SMITH DF, SONG X, CUMMINGS RD. "Use of glycan microarrays to explore specificity of glycan-binding proteins". *Methods in enzymology*. 2010; 480:417-44. Epub 2010/09/08.
- 22- MORAN AP, GUPTA A, JOSHI L. "Sweet-talk: role of host glycosylation in bacterial pathogenesis of the gastrointestinal tract". *Gut*. 2011; 60(10):1412-25. Epub 2011/01/14.
- 23- LEHMANN F, TIRALONGO E, TIRALONGO J. "Sialic acid-specific lectins: occurrence, specificity and function". *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2006; 63(12):1331-54. Epub 2006/04/06.
- 24- DAY CJ, TRAN EN, SEMCHENKO EA, TRAM G, HARTLEY-TASSELL LE, NG PS, ET AL. "Glycan:glycan interactions: High affinity biomolecular interactions that can mediate binding of pathogenic bacteria to host cells". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2015; 112(52):E7266-75. Epub 2015/12/18.
- 25- HO YS, ABECAIS AB, THEYS K, DEFORCHE K, DWYER DE, CHARLESTON M, ET AL. "HIV-1 gp120 N-linked glycosylation differs between plasma and leukocyte compartments". *Virology journal*. 2008; 5:14. Epub 2008/01/25.
- 26- DOORES KJ. "The HIV glycan shield as a target for broadly neutralizing antibodies". *The FEBS journal*. 2015; 282(24):4679-91. Epub 2015/09/29.

Figura 4. Imatge de microscòpia confocal de cèl·lules infectades per virus del VIH (en verd i en vermell), i del nucli cel·lular, tenyit en blau utilitzant DAPI



l'oportunitat d'investigar amb més profunditat la importància biològica d'aquestes estructures basades en hidrats de carboni i, en particular, en el seu paper en una àmplia gamma d'interaccions entre les cèl·lules i els patògens.^{20, 21}

En el meu doctorat estudié les interaccions entre els hidrats de carboni presents en l'embolcall del virus del VIH i els hidrats de carboni presents en la membrana cel·lular. Aquestes interaccions han estat descrites com a interaccions de baixa afinitat²² que normalment precedeixen interaccions d'alta afinitat, com és el cas de la interacció entre hidrats de carboni i proteïnes o entre proteïnes i proteïnes.²³ Tot i la seva baixa afinitat d'interacció, els estudis recents en bacteres han demostrat que aquestes interaccions poden potenciar l'adhesió de bacteres a l'hoste i, per tant, tenen un paper crucial durant la infecció bacteriana.²⁴ En el cas del VIH, l'estudi d'hidrats de carboni capaços de bloquejar la infecció viral és especialment interessant ja que l'embolcall del VIH està altament cobert per hidrats de carboni units a proteïnes.²⁵ La gran abundància d'hidrats de carboni en l'embolcall del VIH ha estat descrita prèviament per la seva funció protectora durant la infecció amagant epitops altament antigènics del sistema immune (també coneguda com a escut de glicà, *glycan shield*).²⁶

A part d'aquests projectes centrats en l'anàlisi de tractaments nous i actuals contra el VIH, també he tingut l'oportunitat d'investigar noves maneres de quantificar el reservori del VIH. El reservori del VIH és la infecció viral que no s'elimina utilitzant antiretrovirals durant el tractament del VIH. Si es milloren les tècniques per quantificar aquest reservori es pot eliminar i eradicar del tot la infecció del VIH.