

**ESTRATÈGIES EN LA LLUITA
CONTRA LA SÍNDROME DE LA
IMMUNODEFICIÈNCIA ADQUIRIDA
(SIDA)**

Discurs llegit en l'acte d'ingrés
de l'Acadèmic Corresponent

Dr. Carles Maria Suñé i Negre

celebrat el dia 18 d'abril de 2005

Barcelona
2005

*L'Acadèmia no es fa solidària
de les opinions que s'exposen en les
publicacions de les que és responsable
l'autor.*

**PRESENTACIÓ DEL DR. CARLES MARIA SUÑÉ I NEGRE
AMB MOTIU DEL SEU DISCURS D'INGRÉS COM A
ACADÈMIC CORRESPONENT DE LA REIAL ACADÈMIA
DE FARMÀCIA DE CATALUNYA.**

*Excel·lentíssim Senyor President
Molt Il·lustres Senyores i Senyors Acadèmics
Senyores i Senyors*

No cal dir que per a mi és un grandíssim motiu de joia el fet que la Reial Acadèmia de Farmàcia de Catalunya hagi tingut a bé de confiar-me fer la presentació del Dr. Carles Maria Suñé i Negre amb motiu del seu discurs d'ingrés com a Acadèmic Corresponent d'aquesta docta Corporació. Si ja és motiu d'alegria rebre a qualsevol nou membre de l'Acadèmia, encara ho és més quan aquest no es tan sols un amic i un company, sinó que a més és el germà que s'ha fet mereixedor d'aquesta acollida pels seus reconeguts mèrits en l'estudi i la investigació de les ciències farmacèutiques concretades en els aspectes que hi desenvolupa la biologia molecular.

El Doctor Carles Maria Suñé i Negre nasqué a Granada, com tots els seus germans, en el sí d'una família catalana pels quatre cantons, desplaçada a aquella ciutat per motius de feina: l'assoliment, per part del pare, de la Càtedra de Farmàcia Galènica, Tècnica Professional i Legislació Comparada de la Facultat de Farmàcia d'aquella ciutat. Tal vegada el fet de viure

a casa la professionalitat docent i investigadora del pare, sempre de caire farmacèutic, va poder influir en que l'any 1985 el Dr. Carles Maria Suñé i Negre assolís de forma ben brillant la Llicenciatura en Farmàcia a la Universitat de Barcelona, tot presentant aquell mateix any la tesina de Llicenciatura titulada "Aspectes legals i ètics de la manipulació genètica" i assolint, consegüentment, el Grau de Llicenciat. Immediatament, mogut per un esperit investigador irrefrenable, assoleix la seva primera beca pre-doctoral mercès a un extraordinari currículum acadèmic (era estrany veure cap nota que no fos excel·lent o matrícula d'honor al seu expedient) i es trasllada al reconegut "Centro de Biología Molecular Severo Ochoa", un Centre d'investigació mixta entre el "Consejo Superior de Investigaciones Científicas" (CSIC) i la Universitat Autònoma de Madrid per a realitzar els seus estudis de Doctorat sobre Immunologia Viral dirigit pel Dr. Luís Enjuanes, obtenint el Grau de Doctor en Farmàcia per la Universitat de Barcelona l'any 1989 i assolint, a l'hora, quelcom més, fruit d'aquell intens període de recerca pre-doctoral: coneix a la que després seria la seva esposa Cristina, també estudiant de doctorat en aquell mateix Centre i també farmacèutica com ell.

Així les coses, tots dos marxaren ja casats cap al lloc a on es veu que els investigadors del nostre país estan obligats a anar moguts per les penoses circumstàncies que envolten la recerca a casa nostra. D'aquesta forma, el Doctor Carles Maria Suñé i Negre ingressa com a Research Associated al prestigiós Duke University Medical Center, als USA (Durham, NC) on passa la major part de la seva vida científica, des de l'any 1992 a l'any 1999. En aquest darrer any, entra a formar part del Institute of Medical Microbiology de la Universitat de Basilea (Suïssa) fins l'any 2001, en que assoleix per concurs oposició una plaça de Científic Titular de Genòmica i Proteòmica del CSIC, passant a dirigir un laboratori de recerca al "Centro Nacional de Biotecnología" (CNB) a Madrid, essent alhora el responsable científic del Servei de Seqüenciació de DNA de l'esmentat CNB.

A la seva etapa d'investigador a l'estranger, realitza importants contribucions vers la regulació de l'expressió genètica del VIH-1, agent causal de la SIDA, la qual es reflecteix en nombroses publicacions (27) d'altíssim nivell a revistes d'àmbit internacional com ara Molecular and Cellular Biology, Proceedings of National Academic Sciences, Journal of Virology i d'altres. Tanmateix, és co-autor de 7 capítols de llibres, té 3 patents i ha fet 49 presentacions a congressos tant nacionals com internacionals. També cal fer esment de la publicació d'un petit "letter" a la prestigiosa revista Nature, la qual cosa no deixa de ser un fet prou extraordinari per a un jove investigador català.

Potser la seva contribució més rellevant durant aquesta etapa va ser el descobriment d'una nova proteïna humana implicada en la formació dels trànscrips del VIH-1, la qual porta per nom CA150 i que va ser motiu de la seva tercera patent sol·licitada als USA. El descobriment d'aquest nou factor va ser la causa de la concessió d'un "grant" del NIH (National Institute of Health) de mes d'un milió de dòlars i és ara una de les línies prioritàries de la seva recerca a Madrid. La funció d'aquesta nova proteïna a la regulació de l'expressió gènica de les cèl·lules és motiu d'intensa investigació al món científic.

No puc donar per finalitzada aquesta sempre incompleta presentació sense tenir en compte a aquelles persones que han estat i són importants en la vida del Doctor Carles Maria Suñé i Negre. Es en aquestes ocasions en que es pot compartir de forma pública la felicitat i l'agraïment a aquelles persones que més ens estimen i a les que més estimem: el pare i la mare, que amb el seu exemple sempre abnegat i modèlic ens han transmès una forma d'entendre i compartir la vida, i els germans que sempre ens hem fet costat amb el nostre suport incondicional i constant. Però no fora just oblidar a na Cristina, l'esposa d'en Carles Maria, amb qui comparteix la vida familiar i l'àmbit professional doncs, com ell, és farmacèutica investigadora en el camp de la biotecnologia i en la que ha tingut sempre una paraula d'ànim en els moments

difficils i un ajut permanent. També estic convençut que la joia d'aquest moment la viuen pensant en els seus dos fills, en Adrià i na Carolina, amb la il·lusió que fa el viure construint un futur encoratjador.

Agraint l'atenció dispensada, no em resta més que felicitar al meu germà, el Doctor Carles Maria Suñé i Negre, pel seu ingrés com Acadèmic Corresponent, així com també a la seva família, amics i a la mateixa Reial Acadèmia de Farmàcia de Catalunya per la incorporació d'un membre més que l'ha de fer cada cop més gran i més nova, ja que la renovació en persones ha de generar, indubtablement, noves fites i perspectives de futur.

Moltes gràcies.

AGRAÏMENTS

Voldria expressar la meva felicitat i el meu agraïment davant l'oferiment de pertànyer a aquesta molt digna Acadèmia com a membre corresponent. He d'agrair sincerament als Il·lustres Acadèmics Drs. Jesús Guinea, Xavier Sorní i Josep M^a Suñé el fet d'haver pensat en mi i avalar la meva candidatura per a pertànyer a aquesta Il·lustríssima Acadèmia. Vull fer extensiu aquest agraïment als meus antics mestres de la Facultat de Farmàcia de Barcelona, que em van inculcar els coneixements que, en cada una de les seves àrees, han resultat fonamentals per al bon establiment de la meva carrera professional i científica. I a tots els presents, que dediqueu part del vostre temps a aquest entrançable acte.

L'agraïment a la meva família mereix un agraïment especial. Sens dubte, la formació i el caràcter d'un ésser humà estan condicionats per la gent que l'envolta. En el meu cas, he tingut la gran sort de poder comptar amb una família que m'ha donat un suport generós i constant durant tots els anys de la meva vida. Em sento privilegiat per poder compartir la meva vida amb la Cristina, la meva dona, de qui he après a estimar i respectar, i de qui elogi innombrables virtuts. La Cristina ha estat guia i companya en aquest viatge que vam emprendre junts ara fa més de tretze anys, que mai no m'he penedit d'haver començat i que espero i desitjo que duri tota la nostra vida. Em sento doblement privilegiat per tenir al meu costat als meus fills, Adrià i Carolina, que m'han fet entendre l'ordre de prioritats d'aquesta vida. Sóc immensament feliç amb cada un dels seus gestos, dels seus somriures i de la

seva incessant i diària evolució. I, com no, privilegiat per tenir als meus pares i germans, que han estat al meu costat malgrat distàncies de milers de quilòmetres, les ensenyances, valor i comportament dels quals han estat claus per a formar i enfortir aspectes de la meua persona que alhora han estat essencials per al meu desenvolupament humà i professional.

El tema que he decidit escollir per al discurs d'ingrés com a nou Acadèmic corresponent és, lògicament, el tema de treball en el que he basat la meua tasca científica durant els últims anys, que considero tremendament important no solament pel seu interès científic sinó també pels seus aspectes ètics, legals i humans.

INDEX

Introducció: la SIDA al món	15
Estructura del VIH-1 i del genoma viral	16
Cicle biològic del virus	18
Tractament antiretroviral enfront del VIH-1	22
Resistència del VIH-1 als fàrmacs antiretrovirals	24
Proteïnes cel·lulars com a dianes terapèutiques enfront del VIH-1	25
CA150, un cofactor de Tat que regula el promotor del VIH-1	27
Virogenòmica	30
Descobriments de nous antivirals mitjançant tècniques genòmiques	31
Aplicació de la genòmica a l'estudi de la infecció pel VIH-1: anàlisi global de l'expressió gènica cel·lular per SAGE	31
Farmacogenètica i farmacogenòmica en la infecció pel VIH-1	34
Comentaris finals	37
Bibliografia	38

*Excel·lentissim Sr. President,
Molt Il·lustres Senyores i Senyors Acadèmics,
Senyores i Senyors,
Estimats amics,*

Introducció: la SIDA al món

El virus de la Immunodeficiència Humana de tipus 1 (VIH-1) és l'agent causal de la Síndrome de la Immunodeficiència Adquirida o SIDA. Ja fa més de vint anys de l'inici de l'epidèmia en els anys vuitanta i les xifres de la situació actual segueixen recordant-nos la necessitat de seguir treballant junts per aconseguir, si no eradicar-la, almenys minimitzar les seves mortals conseqüències. L'any 2003, l'epidèmia causada pel VIH-1 va provocar la mort de més de tres milions de persones, i s'estima que cinc milions es van infectar pel VIH-1, fent pujar el nombre de persones infectades pel virus en tot el món a gairebé 40 milions, dels quals 37 milions són adults i 2,5 milions són menors de 15 anys (Taula I) [1]. Des de l'inici de la pandèmia, han mort més de 25 milions de persones a causa de la malaltia.

Taula I. Resum mundial de l'epidèmia de VIH/SIDA, desembre de 2003 [1]

Els marges de variació de les estimacions presentades en aquest quadre defineixen els límits dins dels quals es troben les xifres reals, i estan basats en la millor informació disponible.

Persones infectades pel VIH	Total	40 milions (34-46 milions)
	Adults	37 milions (31-43 milions)
	Menors de 15 anys	2,5 milions (2,1-2,9 milions)
Noves infeccions pel VIH-1 el 2003	Total	5 milions (4,2-5,8 milions)
	Adults	4,2 milions (3,6-4,8 milions)
	Menors de 15 anys	700.000 (590.000-810.000)
Defuncions causades per la SIDA el 2003	Total	3 milions (2,5-3,5 milions)
	Adults	2,5 milions (2,1-2,9 milions)
	Menors de 15 anys	500.000 (420.000-580.000)

L'epidèmia causada pel VIH-1 no està distribuïda de forma uniforme en el nostre planeta. L'Àfrica subsahariana segueix sent, de bon tros, la regió del planeta més afectada per la pandèmia. S'estima que uns 26.6 milions de persones estaven infectades pel VIH-1 a l'any 2003, inclosos els 3,2 milions de noves infeccions que es van produir durant l'any passat. La SIDA va acabar amb la vida d'aproximadament 2,3 milions de persones en aquesta regió geogràfica en l'any 2003 [1]. En aquest continent és on l'epidèmia causada pel VIH-1 podria tenir fatals conseqüències en un futur no molt llunyà, amb la destrucció dels sistemes econòmics, sanitaris i polítics de nombrosos països. En determinats països del continent africà, la prevalença del VIH-1 és del 40%, mentre en la majoria de països de l'Àfrica meridional una de cada cinc dones embarassades està infectada pel VIH-1. La zona d'Àsia meridional i sud-oriental està també fortament castigada per l'epidèmia, on aproximadament 6,4 milions de persones conviuen amb el VIH-1 a la fi de 2003. Aquestes xifres es comparen significativament amb les aproximadament 600.000 persones a Europa occidental o el gairebé milió de persones d'Amèrica del Nord infectades pel VIH-1 a la fi de 2003 [1] (Figura 1).

Estructura del VIH-1 i del genoma viral

El VIH-1 és una partícula esfèrica amb una grandària de 80 a 100 nm de diàmetre. La seva estructura consta d'una nucleocàpside interna o nucleoide (a l'interior de la qual es troben el material genètic i els enzims vírics: complex transcriptasa inversa, integrasa i proteasa), i d'un embolcall lipoproteic derivat de la cèl·lula hostatjada on s'insereixen les glicoproteïnes virals. Com tots els retrovirus, el genoma del VIH-1 és un ARN format per dos *brins* idèntics de polaritat positiva de 9,6 kilobases de longitud. En la seva forma de provirus (en forma d'ADN) el genoma viral es troba flanquejat per unes seqüències repetides o LTR que permeten la seva integració en el genoma cel·lular i on es localitzen els elements reguladors de la transcripció viral.

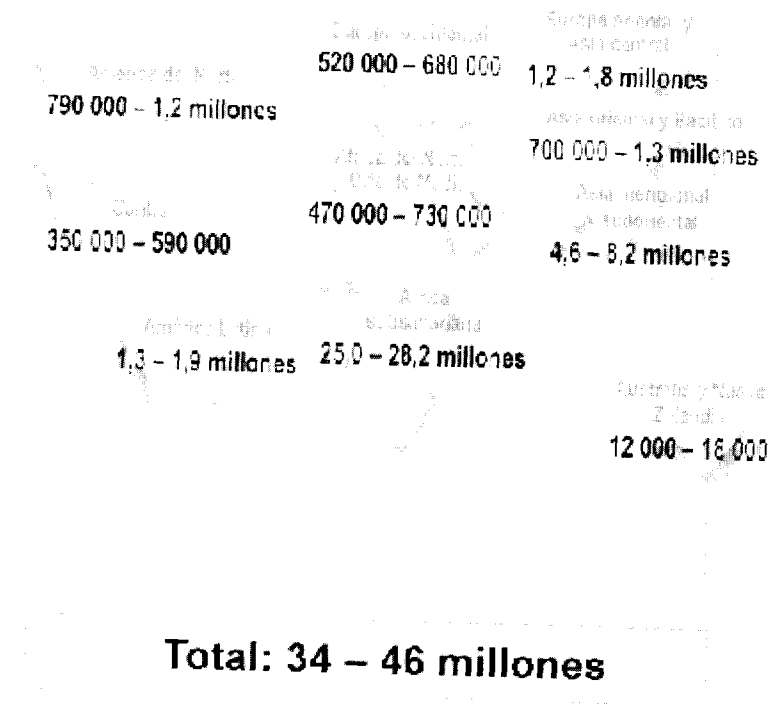


Figura 1. Nombre estimat de persones infectades pel VIH a la fi de 2003 [1].

El VIH-1 pertany a la família dels lentivirus, els quals es caracteritzen per tenir una estructura gènica més complexa que la dels altres retrovirus. El genoma del VIH-1 codifica per tres poliproteïnes anomenades Gag, Pol i Env, les quals sofreixen un procés de proteòlisi per a donar lloc a les nou proteïnes comuns a tots els retrovirus. Les quatre que es deriven de Gag (MA [matriu], CA [càpside], NC [nucleocàpside] i p6) i les dues que es deriven de Env (gp120 i gp41) són proteïnes estructurals que formen el nucli i la coberta viral. Les tres proteïnes que es generen de Pol (PR [proteasa], RT [transcriptasa inversa] i IN [integrasa]) tenen funcions enzimàtiques essencials i formen part també de la partícula viral. A més d'aquestes, el genoma del VIH-1 codifica per sis proteïnes addicionals reguladores. Tres d'elles (Vif, Vpr i

Nef) es localitzen en la partícula viral, dos (Tat i Rev) exerceixen funcions nuclears que són essencials per al virus, i una (Vpu) ajuda en l'acoblament de la partícula viral.

Cicle biològic del virus

El cicle d'infecció del VIH-1 es divideix en dues fases, primera i tardana, separades entre si per la integració en el genoma cel·lular. Durant la primera etapa té lloc l'entrada del virus a la cèl·lula, la desencapsidació i retrotranscripció del genoma viral, el transport al nucli i la integració en el genoma cel·lular. Durant l'etapa tardana té lloc l'expressió genètica del provirus, que inclou la transcripció del genoma viral, el transport al citosol, el processament de l'ARN missatger, la formació i maduració de nous virions i, finalment, la sortida per gemmació de la cèl·lula. A continuació s'examinen amb més detall les principals etapes del cicle biològic del virus.

Entrada del VIH-1 a la cèl·lula

L'entrada del VIH a la cèl·lula es produeix mitjançant la interacció de la proteïna de l'embolcall gp120 amb dos tipus de molècules de la membrana cel·lular: la molècula específica de limfòcits T CD4 (que actua com a "receptor"), i determinats receptors de quimiocines (que actuen com a "coreceptors"). Encara que "in vitro" s'ha descrit que molts receptors de quimiocines són capaços d'actuar com a coreceptors del VIH-1, "in vivo" probablement existeixen només dos receptors essencials que són les molècules CCR5 i CXCR4 [2]. La interacció de la gp120 amb CD4 en la membrana cel·lular induïx un canvi conformacional que possibilita la unió a un coreceptor, produint-se un procés de fusió entre la membrana viral i cel·lular en el qual participa la gp41 viral i que permet la internalització de la nucleocàpside viral i la desencapsidació del genoma víric en el citoplasma.

Transcripció inversa, transport i integració

Després de l'entrada de la nucleocàpside viral en la cèl·lula es produeix la formació d'un doble brau d'ADN a partir de l'ARN viral mitjançant l'enzim transcriptasa inversa. En aquest procés enzimàtic es dupliquen els LTR virals que se situen a ambdós extrems del genoma proviral. L'ADN de doble cadena és transportat al nucli per la matriu viral, encara que també intervien la integrasa, la transcriptasa inversa, la proteïna viral Vpr i la nucleocàpside. Posteriorment, l'ADN s'integra en el genoma cel·lular mitjançant l'acció de la integrasa viral constituint el que s'anomena un provirus integrat.

Control de la transcripció del VIH-1

Una vegada integrat, el VIH-1 pot seguir un comportament variable: romandre latent, replicar-se de forma controlada o experimentar una replicació massiva. La inducció de la reactivació a partir de l'estat de latència es produeix mitjançant l'acció de determinats factors de transcripció que són induïts únicament en el curs de l'activació limfocitària T: NFκB, que representa el principal factor cel·lular regulador de la transcripció del VIH-1 en limfòcits CD4 [3], i la proteïna Tat, que és el factor viral més important per a augmentar la taxa de transcripció del VIH i permetre l'elongació completa del genoma viral[4].

La proteïna Tat està codificada per 2 àxons del genoma del VIH-1, donant lloc a una proteïna de 86 o 101 aminoàcids dependent del processament post-transcripcional del ARN viral. La proteïna Tat incrementa en més de 500 vegades el nivell dels ARN missatgers del VIH-1, i la delació del gen que codifica Tat dona lloc a partícules virals incapaces de mantenir una infecció. La proteïna Tat és, per això, necessària i imprescindible per a l'activació dels gens virals i per a la infectivitat del VIH-1. Tat s'uneix a una seqüència d'ARN present en l'extrem 5' de tots els ARN missatgers virals (element TAR: de l'anglès, trans-activati-on response element) i per a la seva funció requereix factors cel·lulars.

lulars específics i determinades seqüències d'ADN del promotor del VIH-1 [5]. L'element TAR del VIH-1 es transcriu a partir de la regió +1 fins +59 del LTR, formant un ARN en forma de forca amb tres nucleòtids que formen l'estructura de la protuberància (lloc d'unió de Tat) i sis que formen l'estructura del llaç. La interacció entre Tat i TAR incrementa dramàticament els nivells de tots els ARN missatgers virals mitjançant l'activació del procés de l'elongació transcripcional intervinguda pels complexos formats per l'ARN polimerasa II (ARNPII) (Figura 2). L'activació transcripcional mitjançada per Tat requereix de la presència de la ciclina T1, que juntament amb CDK9 formen el factor d'elongació transcripcional positiu b (P-TEFb) [6]. A més del complex P-TEFb, l'activació per Tat requereix d'altres proteïnes cel·lulars [7,8]. L'enorme importància per al cicle biològic del VIH-1 que tenen Tat i el mecanisme d'activació dels gens del VIH-1 fa que siguin dianes molt atractives per a un futur ús terapèutic.

A més de la seva possible aplicació per a la generació de noves estratègies terapèutiques enfront de la infecció produïda pel VIH-1, l'estudi de l'elongació de la transcripció ha generat recentment un gran interès a causa de la seva importància en el control de l'expressió gènica general, i en el descobriment de la implicació de factors que participen en aquesta etapa en nombroses malalties humanes. A més de l'esmentat factor P-TEFb i la seva relació amb la infecció produïda pel VIH-1, distintes proteïnes que intervenen en el procés de l'elongació transcripcional han estat relacionades amb la leucèmia mieloide aguda, la síndrome de Cockayne i la malaltia familiar de predisposició al càncer de Von Hippel-Lindau [9].

Processament de l'ARN missatger

La replicació del VIH-1 requereix el transport específic dels ARN missatgers virals del nucli al citoplasma cel·lular per a la seva posterior traducció a proteïnes. La proteïna viral Rev té un paper essencial en el transport dels ARN missatgers processats o parcialment processats del nucli al citoplasma. Rev té 116 aminoàcids i es localitza en el nucli i nuclèol de la cèl·lula infectada.

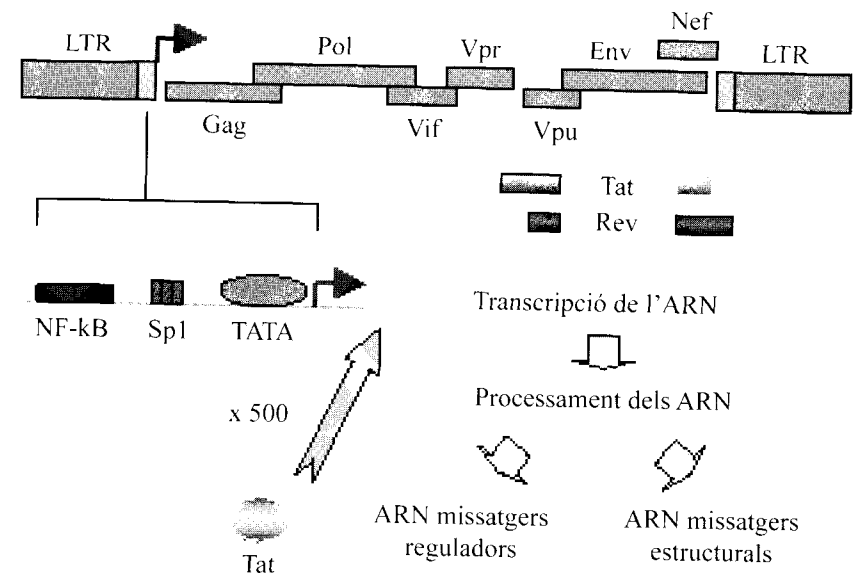


Figura 2. Control de la transcripció del VIH-1. En l'esquema es mostra l'organització gènica del VIH-1 amb els gens estructurals (Gag, Pol i Env) i reguladors (Vif, Vpr, Vpu, Nef, Tat i Rev). En l'extrem 5' de les seqüències repetitives llargues (LTR) es localitza el promotor del VIH-1, mostrant-se els llocs d'unió per als factors de transcripció NF-κB, Sp1 i la caixa TATA. Des d'aquest promotor s'inicia la transcripció dels ARN missatgers que són processats i donen lloc als ARN missatgers reguladors i estructurals. La proteïna Tat del VIH-1 trans-activa el promotor del VIH-1 augmentant en més de 500 vegades el nombre total d'ARN missatgers produïts.

Igual que passa amb Tat, la proteïna Rev s'uneix a una seqüència d'ARN de 210 nucleòtids altament estructurada present en el gen Env i anomenada RRE (de l'anglès, Rev response element). El transport de l'ARN del nucli al citoplasma utilitza les vies d'exportació de la cèl·lula hostatjada a través del receptor nuclear CRM1 o exportina 1 [10], el qual s'uneix al senyal d'exportació nuclear de Rev per a traslladar el complex format per l'ARN missatger viral i Rev del nucli al citoplasma. Una vegada en el citoplasma, els ARN missatgers virals són traduïts a proteïnes pels ribosomes cel·lulars.

En l'acoblament de la partícula viral participen les proteïnes virals Vif, Vpu i la proteasa. El material genètic del virus juntament amb les proteïnes Gag i Pol formen el nucleoide viral, el qual es desplaça a la membrana cel·lular on es recobreix de la membrana lipídica i de glicoproteïnes. En aquest procés, el virus incorpora en les seves partícules material cel·lular, com la β_2 -microglobulina i els antígens del Complex Principal de Histocompatibilitat (HLA), la funció futura del qual és permetre un millor reconeixement del virus a la membrana de la cèl·lula diana, o la ciclofil·lina que interacciona amb proteïnes de la càpside per a la formació de virions infecciosos. El cicle infectiu del VIH-1 finalitza amb la gemmació de les partícules virals infeccioses a través de la membrana cel·lular i la seva sortida a l'espai extracel·lular on iniciarà un nou procés d'infecció.

Tractament antiretroviral enfront del VIH-1

En l'actualitat, la bateria de fàrmacs disponibles per a detenir l'avanç de la SIDA és limitada i es basa majoritàriament en inhibir la funció de dos enzims virals: la transcriptasa inversa i la proteasa. Els inhibidors de la transcriptasa inversa poden dividir-se en dos tipus segons la seva estructura química en funció de la seva analogia o no amb els nucleòsids. Existeixen vuit inhibidors de la proteasa (amprenavir, atazanavir, fosamprenavir [GW433908], indinavir, kaletra, nelfinavir, ritonavir i saquinavir), deu inhibidors de la transcriptasa inversa anàlegs a nucleòsids (abacavir, combivir, didanosina [ddI], emtricitabina [FTC], lamivudina [3TC], estavudina [d4T], tenofovir, trizivir, zalcitabina [ddC] i zidovudina [AZT]) i tres no anàlegs a nucleòsids (delavirdina, efavirenz i nevirapina) aprovats per al seu ús hospitalari, i fins a dotze nous fàrmacs d'aquestes especificitats en fase d'experimentació. L'estratègia terapèutica actual es basa en la utilització de potents combinacions de gairebé sempre tres o més fàrmacs i amb la possibilitat de mo-

nitoritzar la resposta a aquest tractament mitjançant la mesura de la càrrega viral plasmàtica en el pacient. Aquest tractament (HAART, de l'anglès *highly active antiretroviral therapy*, traduït com "teràpia antiretroviral molt agressiva") ha conduït a un augment espectacular de la supervivència i a una millora de la qualitat de vida de les persones infectades pel VIH-1 [11]. No obstant això, el virus no és eliminat en la seva totalitat i apareix fins i tot després de deu anys d'un tractament aparentment eficaç [12]. Durant aquest interval, el VIH-1 és capaç d'amagar-se en cèl·lules reservori on es replicaria activament i es propagaria a pesar del tractament farmacològic [13]. Encara que la naturalesa dels reservoris cel·lulars no es coneix bé, pot tractar-se de cèl·lules de vida llarga productivament infectades o de cèl·lules latentment infectades. Aquests reservoris, de difícil eliminació per les teràpies farmacològiques agressives, constitueixen la principal dificultat per a una possible eradicació del VIH-1 dels pacients tractats [14].

Molt recentment s'ha introduït en el mercat hospitalari un fàrmac antiretroviral anomenat enfurvitida o comunament T-20 (també Fuzeon[®], pentafusida o DP178). El T-20 és un pèptid de 36 aminoàcids que inhibeix la unió del VIH-1 al receptor cel·lular CD4 present en els limfòcits T, i és el primer d'una sèrie de fàrmacs, encara en fase d'experimentació, basats en la inhibició de la unió o fusió del VIH-1 a la membrana cel·lular. Existeixen fins a sis nous fàrmacs inhibidors de la unió o fusió del VIH-1 a la membrana cel·lular en fase avançada d'experimentació que sens dubte s'uniran a la bateria de fàrmacs disponibles per a pal·liar el desenvolupament de la SIDA.

Una tercera línia de tractament farmacològic contra el VIH-1 es basa en la inhibició d'un tercer enzim viral anomenat integrasa que catalitza la integració del material genètic viral en l'ADN de la cèl·lula hostatjada. Existeix un únic compost de tipus carboximida anomenat L-870810 amb capacitat d'inhibir la integrasa i que està en fase de desenvolupament experimental. Finalment, s'està també investigant amb productes que tracten de disminuir la capacitat replicativa del virus i/o potenciar la resposta immune enfront del mateix, com moduladors del metabolisme cel·lular (hidroxiurea i micofenolat) i citoquines (interleukines 2 i 12).

En molts casos, serioses patologies derivades del tractament antiretroviral compliquen l'ús clínic d'aquests medicaments. Per exemple, la síndrome de la lipodistrofia, consistent en alteracions en la distribució del greix corporal que es tradueix en la presència de cúmuls i/o pèrdua de greix en àrees localitzades del cos, que ha estat descrit en un nombre significatiu de pacients amb teràpia antiretroviral dirigida contra la proteasa viral. Les causes que desencadenen aquesta síndrome són, ara per ara, desconegudes. Altres efectes secundaris de la teràpia antiretroviral són les nombroses alteracions detectades en el metabolisme, incloent hipertriglicèridèmia, hipercolesterolèmia, hiperglicèmia i l'aparició de diabetis mellitus.

Resistència del VIH-1 als fàrmacs antiretrovirals

Tots els fàrmacs antiretrovirals disponibles avui en dia desenvolupen fenòmens de resistències virals i és, per tant, un dels factors més importants que limiten l'eficàcia del tractament enfront el VIH-1. La resistència als fàrmacs es correlaciona amb canvis específics en la seqüència d'aminoàcids dels enzims transcriptasa inversa i proteasa que permeten al virus replicar en presència dels inhibidors respectius. Això és conseqüència, primer, de l'alta dinàmica de replicació del VIH-1 que ocorre durant tot el procés de la malaltia (s'estima que el nombre de nous virions que es produeixen diàriament oscil·la entre 10^8 i 10^9 [15,16]). I segon, la falta d'una activitat correctora de l'enzim transcriptasa inversa dels virus ARN com el VIH-1, a diferència de com succeeix en el cas de les ADN-polimerases que preserven la composició genètica dels organismes d'ADN de doble cadena. Això es tradueix en un promig de l'aparició d'una mutació en el genoma viral en cada ronda de replicació [17]. Aquestes dues propietats fan que es seleccionin una gran quantitat de variants virals o "quasiespècies", les quals poden acumular i seleccionar resistències a fàrmacs en presència del tractament antiretroviral. Aquesta alta taxa de replicació i baixa activitat correctora fa que apareguin variants virals resistents

als inhibidors de la transcriptasa inversa i la proteasa en pacients que mai han tingut un tractament antiretroviral [18-21]. El VIH-1 també és capaç de desenvolupar resistència al nou fàrmac T-20, de forma que és possible seleccionar virus resistents amb una marcada reducció en la susceptibilitat enfront d'aquest fàrmac.

Les mutacions s'han classificat en primàries i secundàries. Les mutacions primàries apareixen generalment en les etapes inicials del tractament antiretroviral i són les responsables de l'aparició de les resistències als fàrmacs. Les mutacions secundàries o compensatòries apareixen després de les primàries i, encara que no solen tenir un efecte en el nivell de resistència als fàrmacs, sí que milloren la capacitat replicativa del virus quan es presenten juntament amb les anteriors. L'aparició de les mutacions es correlaciona amb un major nivell de fracàs durant el tractament terapèutic [21,22]. Entre les substitucions secundàries més freqüents es troba un canvi de leucina a prolina en la posició 63 (L63P) en el gen de la proteasa del VIH-1, que pot ocórrer en més del 50% dels individus afectats en absència de tractament antiretroviral [19]. Estudis en diferents laboratoris han demostrat que el canvi L63P contribueix a millorar la capacitat replicativa del VIH-1 tant en presència [23], com en absència de fàrmacs antiretrovirals [24, 25].

Existeixen dos mètodes per a la detecció en el laboratori de resistències virals: i) els mètodes genotípics, que analitzen les mutacions que confereixen resistència mitjançant la seqüenciació del genoma viral i, ii) els mètodes fenotípics, que analitzen funcionalment la sensibilitat o resistència de les variants virals als fàrmacs antiretrovirals. La informació derivada d'ambdós mètodes té un gran benefici per al pacient al poder modular la resposta virològica sobre la base del tractament seleccionat [26].

Proteïnes cel·lulars com a dianes terapèutiques enfront del VIH-1

Els estudis realitzats sobre el cicle biològic del VIH-1 han permès la identificació i caracterització dels gens i proteïnes del

virus i amb això la possibilitat d'utilitzar-los com a dianes terapèutiques per a frenar l'avanç de la SIDA. Cada etapa del cicle biològic del virus pot ser potencialment utilitzada per al disseny de nous fàrmacs i teràpies (Figura 3), com així ha succeït amb la inhibició de les funcions dels enzims proteasa i transcriptasa inversa. Experiments de teràpia gènica per a inhibir la funció de diverses proteïnes virals han estat també utilitzats experimentalment, però els assajos a escala clínica es troben molt poc avançats [27].

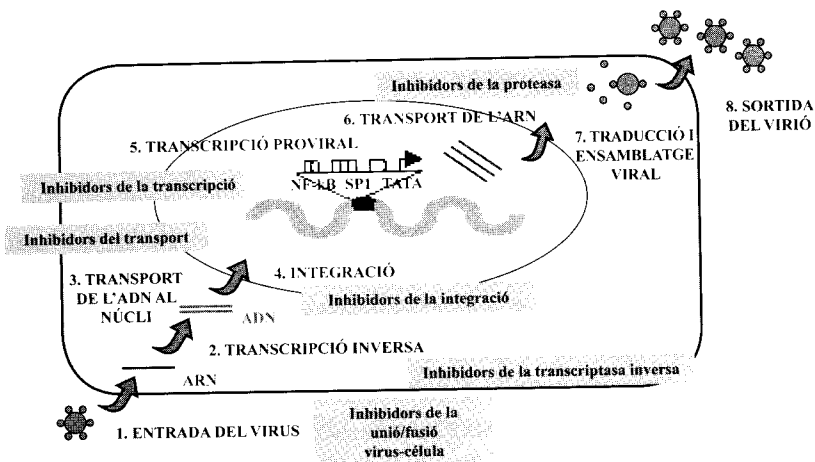


Figura 3. Etapes del cicle biològic del VIH-1 que són o poden ser bloquejades farmacològicament. Tres de les etapes del cicle replicatiu del virus són inhibides en l'actualitat amb fàrmacs antiretrovirals: la unió del virus a la cèl·lula i la inhibició dels enzims virals transcriptasa inversa i proteasa. Les altres etapes del cicle biològic del virus són potencials dianes d'intervenció terapèutica.

Una aproximació alternativa per al disseny de noves rutes terapèutiques és utilitzar la interacció virus-cèl·lula per a desenvolupar nous fàrmacs contra la SIDA. La presència de factors cel·lulars que són essencials en nombroses etapes del cicle biològic del virus justifica aquesta aproximació i les proteïnes cel·lulars, al ser la seva base genètica d'ADN, són menys variables que el virus i per tant menys capaces de desenvolupar resistències enfront del medicament utilitzat.

L'estudi de les proteïnes reguladores del VIH-1 ha permès conèixer en profunditat nous i complexos mecanismes de regulació de l'expressió gènica. Però encara queda molt per conèixer. El descobriment de la interacció de la proteïna viral Tat amb l'ARN TAR va obrir el camí per a dilucidar el seu mecanisme d'acció i va confirmar el paper essencial i determinant de factors cel·lulars en l'activació de la transcripció del VIH-1. Per això, i donada la gran importància d'aquesta interacció en l'activació de la transcripció del VIH-1, diversos intents de teràpia gènica per a interferir la unió Tat/TAR han estat desenvolupats. Entre ells, l'expressió de ribozimes, l'ús d'oligonucleòtids anti-sentit, la immunització intracel·lular i altres aproximacions, han estat objecte d'investigació per a bloquejar l'acció de Tat [27].

Quanta més informació anem acumulant, més properes i possibles es fan les possibilitats d'interferir les interaccions entre Tat i factors cel·lulars i interrompre així l'activació gènica del VIH-1 i la replicació viral. El treball en el nostre laboratori persegueix conèixer en profunditat les bases moleculars de l'activació dels gens del VIH-1 per Tat i conèixer els factors cel·lulars que es troben implicats. El coneixement que es generi durant el transcurs d'aquestes investigacions podrà permetre el desenvolupament de noves estratègies terapèutiques que tendeixin a bloquejar aquesta etapa crítica en el cicle replicatiu del VIH-1.

CA150, un cofactor de Tat que regula el promotor del VIH-1

Com s'ha esmentat anteriorment, l'activació dels gens del VIH-1 per la proteïna viral Tat requereix de la presència de factors cel·lulars que no són els de tipus basal involucrats en la transcripció general, sinó específics de transcripció de determinats gens. Un d'ells, el factor de transcripció CA150, va ser aïllat pel nostre grup d'investigació mitjançant cromatografia d'afinitat amb Tat [8]. La seqüència d'aminoàcids de CA150 conté interessants dominis i motius que es troben en altres proteïnes que regulen processos transcripcionals (Figura 4). Primer, la regió que com-

prèn els aminoàcids 12 a 112 conté 48 residus de prolina; moltes d'aquestes prolines es troben seguides en grups de tres o més, pel que aquesta regió se l'ha anomenat rica en poliprolines. Segon, es troben tres dominis anomenats WWP/WW, que es creu que regulen interaccions proteïna-proteïna. Tercer, CA150 conté una extensa repetició de dos aminoàcids, glutamina i alanina, de 76 residus en longitud (QA). Quart, adjacent a la regió QA existeix una zona rica en serina, treonina i prolina (STP). Cinquè, una regió de 60 residus en longitud amb aminoàcids altament carregats (KE). Sisè, un senyal de localització nuclear (NLS) i, proper, un lloc de fosforilació per la casein kinasa II (S/T-X-X-D/E). Setè, sis repeticions en l'extrem carboxi-terminal de la proteïna de motius anomenats FF, d'interacció amb proteïnes, i un motiu "leucine zipper" en els últims residus de CA150. Finalment, CA150 conté seqüències PEST que tenen a veure amb la degradació proteica i reciclatge de les mateixes.

CA150 sembla exercir el seu efecte funcional sobre el promotor del VIH-1, ja que la sobreexpressió de CA150 en cèl·lules produeix una dràstica inhibició en l'activitat del promotor viral, tant en presència com en absència de Tat [8]. La repressió del promotor del VIH-1 és específica, ja que CA150 no afecta l'activitat transcripcional d'altres promotors virals [28]. La repressió mitjançada per CA150 depèn de la caixa TATA del promotor del VIH-1 i aquesta inhibició es produeix per una disminució de la capacitat d'elongació dels complexos transcripcionals [28]. Ambdós fenòmens, la dependència de la caixa TATA i la inhibició de l'elongació, es produeixen també en l'activació dels gens del VIH-1 per la proteïna Tat, la qual cosa indica un paral·lisme funcional entre ambdós factors.

L'efecte, a nivell de l'elongació transcripcional, de CA150 probablement estigui intervingut pel complex format per l'ARN-P II i factors associats. De fet, s'ha demostrat una interacció entre CA150 i l'ARNPII en el seu estat fosforilat [29], que és la forma de la ARNPII que intervé en l'etapa de l'elongació. Aquests i altres estudis [30] suggereixen que el promotor del VIH-1 té dues activitats funcionals diferents. Una d'elles és independent de la seqüència

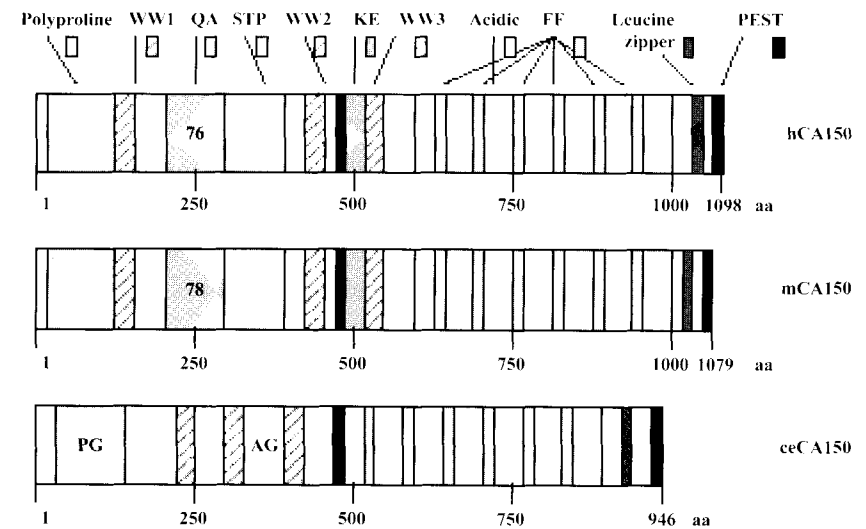


Figura 4: Motius i dominis en la proteïna CA150 humana (h), murina (m) i en *Caenorhabditis elegans* (ce).

TATA i de Tat, i genera una transcripció abortiva, i l'altra és dependent de la caixa TATA i de Tat i genera una transcripció processiva. En relació a això, el nostre grup ha mostrat que els complexos transcripcionals processius són també dependents del coactivador CA150 [28], i que CA150 s'associa de manera estable al complex macromolecular anomenat holoenzim, que té un paper rellevant en la transcripció processiva [8]. Aquestes dades apunten a la formació de diferents complexos transcripcionals sobre el promotor del VIH-1, la composició proteica del qual dictarà les etapes de la iniciació i elongació durant l'activació transcripcional dels gens del VIH-1. Una línia d'investigació prioritària en el nostre laboratori és l'estudi i dissecció dels complexos transcripcionals que regulen el promotor del VIH-1 durant l'inici i transcurs de la transcripció.

A causa del seu paper en la regulació de la transcripció dels gens del VIH-1, és de gran importància dilucidar el mecanisme d'acció de CA150 i la seva contribució a la regulació cel·lular. Un dels objectius d'aquesta investigació és el de determinar el possible ús de CA150 com futura diana terapèutica per a detenir la replicació viral i amb això frenar el desenvolupament de la SIDA.

Virogenòmica

Tendim a pensar en la revolució genòmica com l'estudi inicialment anatòmic i després funcional dels gens de diferents organismes. En aquest terreny, l'esforç a nivell de la comunitat científica mundial és tan important que és difícil innovar i ser competitiu en camps en l'estudi dels quals molts països tenen tradició i duen un avantatge considerable [31, 32]. Existeix, no obstant això, un territori apassionant i poc explorat que és el de la modificació de l'expressió del nostre genoma per microorganismes. Els virus, paràsits obligats que requereixen de la nostra maquinària bioquímica per a realitzar el seu cicle biològic, són un model excel·lent per a analitzar i comprendre la modificació del nostre propi programa genètic. L'ús de "microarrays" ha permès demostrar que la infecció per Citomegalovirus induïx l'expressió de 258 mRNAs cel·lulars, especialment d'aquells gens regulats per interferó [33], un fenomen també observat en la infecció per altres herpesvirus [34]. Altre exemple és el del virus del Sarcoma de Kaposi (KHSV) que induïx el receptor per al stem cell growth factor c-kit, el bloqueig del qual reverteix els canvis fenotípics induïts pel KHSV [35]. També en la infecció per VIH-1 s'ha demostrat en treballs preliminars la inducció de factors de transcripció [36] i l'activació de gens implicats en processos de senyalització i regulació de l'expressió de proteïnes [37].

És possible que la inducció pel propi virus d'alguns d'aquests factors sigui essencial per al seu cicle replicatiu. Això és especialment cert per als virus "petits", com per exemple el VIH-1 que codifica per menys de deu proteïnes, que necessiten forçosament de factors cel·lulars per a realitzar el seu cicle biològic. D'altra banda, des del punt de vista de la investigació en Salut, aquest abordatge experimental per a la identificació de proteïnes cel·lulars importants per a una infecció és especialment rellevant per als virus causants de les grans pandèmies. El VIH-1, paradigma de les noves malalties emergents, compleix aquests requisits, pel que l'estudi sistemàtic de la modificació de l'expressió gènica induïda pel VIH-1 té una especial importància per a definir noves dianes terapèutiques.

Descobriments de nous antivirals mitjançant tècniques genòmiques

El coneixement del mapa genètic humà obre la possibilitat de dibuixar per primera vegada el conjunt de dianes farmacològiques que permetran el disseny de nous fàrmacs. Totes les àrees de la patologia es beneficiaran de les noves estratègies de la farmacogenòmica i la genòmica funcional. El càncer i les malalties neurodegeneratives són objecte avui en dia d'intensa investigació, però les malalties produïdes per virus, aparentment allunyades d'aquesta estratègia, són també objectius potencials per al descobriment de noves rutes d'intervenció terapèutica. Tradicionalment les dianes antivirals són proteïnes del propi virus, no obstant això, el nombre potencial de dianes virals és molt limitat, especialment en els virus "petits" com el VIH-1. Com ja hem esmentat, una estratègia alternativa pot ser inhibir la funció de proteïnes de l'hostatjador que són necessàries per al cicle replicatiu del virus. El desafiament per a obtenir antivirals mitjançant aquesta estratègia és doble: d'una banda han de caracteritzar-se les proteïnes i vies de transducció cel·lulars necessàries per a la replicació viral, i per una altra s'han de rebutjar aquelles on el seu bloqueig representi una toxicitat important per a la vida de la cèl·lula. L'objectiu de l'aplicació de les tècniques genòmiques a la patologia viral és el de descobrir quins gens cel·lulars són induïts o reprimits en el transcurs de la infecció viral i, posteriorment, analitzar i definir la importància del producte d'aquests gens per a la realització del cicle viral amb la fi de dissenyar compostos enfront d'aquestes noves dianes.

Aplicació de la genòmica a l'estudi de la infecció pel VIH-1: anàlisi global de l'expressió gènica cel·lular per SAGE

La majoria dels estudis realitzats que tracten la patogènia de la infecció pel VIH-1 s'han dirigit a un limitat nombre de paràmetres biològics, encara que el fenomen estudiat afecta globalment

al funcionament cel·lular. Per a una millor comprensió dels esdeveniments cel·lulars i patològics causats pel VIH-1 és necessari comparar diferencialment patrons d'expressió gènica cel·lular a gran escala. El plantejament parcial realitzat fins el moment ve donat en gran mesura per les limitacions de les tècniques d'anàlisi. Les noves estratègies i tecnologies aportades per la genòmica funcional i proteòmica permeten plantejar aquest problema amb noves eines i perspectives. En concret, recents avenços tecnològics han donat lloc a una sèrie de mètodes per a l'estudi global de l'expressió gènica en cèl·lules. Mètodes com *serial analysis of gene expression* (SAGE), *Suppression subtractive hybridization* (SSH), *microarrays*, *oligonucleotide xips*, etc., estan sent utilitzats massivament per a identificar gens diferencialment expressats en dues poblacions o estats cel·lulars.

SAGE [38] és una tècnica que aprofita la tecnologia de la seqüenciació d'ADN en massa per a obtenir un perfil quantitatiu de l'expressió gènica cel·lular. SAGE presenta tres avantatges fonamentals: primer, permet l'anàlisi de tots els gens expressats en la cèl·lula; segon, no només identifica el gen sinó que quantifica el corresponent transcrit d'una forma sistemàtica; i tercer, SAGE no requereix del coneixement previ de la seqüència dels gens. És per això que la tècnica SAGE està sent utilitzada avui en dia per a l'anàlisi de nombrosos i variats processos cel·lulars [39-41] (per a una completa revisió de SAGE dirigir-se a l'adreça: <http://www.sagenet.org/home/References.htm>).

La tècnica SAGE identifica els gens aïllant seqüències molt curtes d'ADN (els anomenats tags, de 10-11 parells de bases) corresponents als transcrits d'ARN. L'ús de tècniques d'amplificació d'ADN (PCR, polymerase chain reaction) permet obtenir una gran quantitat d'aquestes seqüències d'una forma específica. Combinant 25-50 de les seqüències dels tags en una sola molècula de plàsmid permet la seva ràpida seqüenciació en un sol canal d'un seqüenciador automàtic d'ADN, permetent un nivell d'eficàcia molt elevat. S'estima que la seqüenciació d'unes 2.000 mostres d'ADN són suficients per a obtenir la representació de tots els transcrits cel·lulars.

Com tota tècnica genòmica, SAGE necessita d'instruments bioinformàtics per a emmagatzemar i analitzar la gran quantitat de dades generades. En concret es necessita: i) extreure i tabular les seqüències específiques dels tags del total seqüenciat, ii) comparar les seqüències específiques dins d'un mateix projecte i, iii) comparar aquestes seqüències amb les emmagatzemades en bancs de dades de gens. En l'actualitat es pot disposar d'aquests programes a Internet (<http://www.sagenet.org/>).

La possibilitat de poder disposar en l'actualitat de grans equips de seqüenciació d'ADN de tipus capil·lar possibilita la seqüenciació de l'elevat nombre de mostres derivat de l'aplicació de la tècnica SAGE. Així, el Servei de Seqüenciació d'ADN del Centre Nacional de Biotecnologia (CNB), del qual aquest nou Acadèmic és el coordinador i responsable científic, disposa d'un laboratori equipat amb un nou instrument de seqüenciació automàtica d'ADN

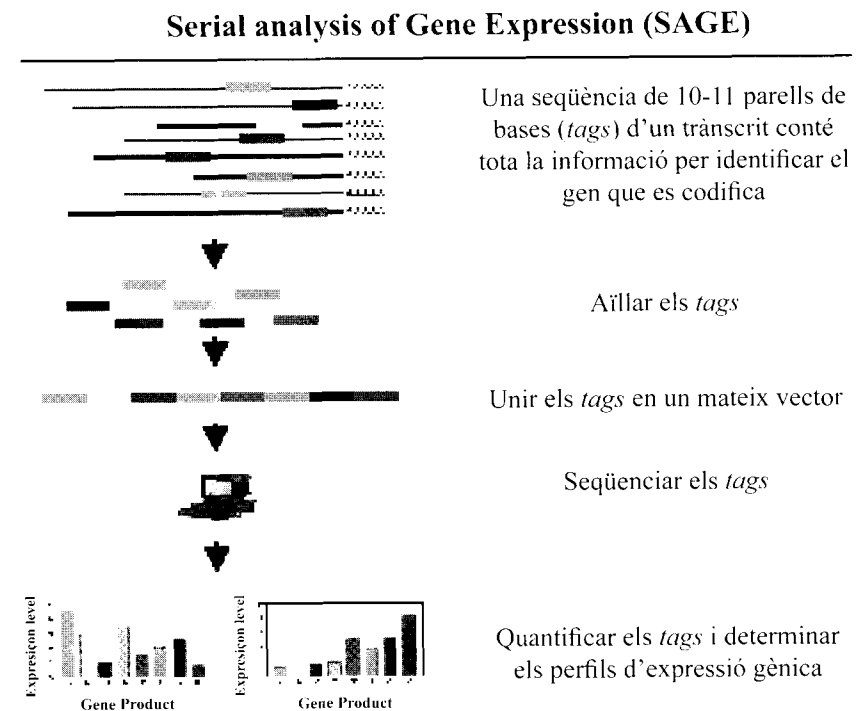


Figura 5: Esquema de la tècnica genòmica SAGE.

per electroforesi capil·lar i anàlisi de fragments (ABI PRISM 3700). L'instrument és capaç d'analitzar de forma automàtica i contínua (24 hores sense la intervenció de l'operador) la càrrega de mostres, electroforesi i anàlisi de dades. El sistema i el seu programari possibilita l'anàlisi de 96 mostres de forma simultània en un temps màxim de 4 hores amb un percentatge d'error inferior al 1.5% en cada 400 bases. Aquest equip fa possible l'estudi dels canvis globals en l'expressió gènica cel·lular mesurats per la tècnica SAGE. El Servei de Seqüenciació d'ADN forma part del nucli bàsic d'un entorn d'infraestructures estratègiques en genòmica, proteòmica i bioinformàtica estructural que s'està desenvolupant en el CNB. Aquest entorn possibilita l'accés a l'ajuda genòmica i bioinformàtica que grans i ambiciosos projectes, com el desenvolupament de la tècnica genòmica SAGE, puguin requerir.

En el nostre laboratori s'està posant a punt la tècnica genòmica SAGE per a analitzar de forma global els canvis produïts en l'expressió gènica cel·lular deguts a la proteïna Tat del VIH-1. Els canvis induïts en l'expressió gènica cel·lular per la proteïna viral Tat contribuirà a entendre el paper que diferents proteïnes cel·lulars poden jugar, aïlladament o en cooperació amb factors virals, en els mecanismes de la replicació i patogenicitat del virus. Aquests coneixements permetran dissenyar nous fàrmacs i estratègies terapèutiques enfront de la infecció pel VIH-1.

Farmacogenètica i farmacogenòmica en la infecció pel VIH-1

La intensa investigació realitzada en la transmissió del VIH-1 i la progressió a la SIDA utilitzant grans grups de pacients ha demostrat la importància de la genètica de l'individu en la patogenicitat del virus i en la resposta als fàrmacs antiretrovirals. Encara que molt menys investigat, la variació gènica del patògen, en aquest cas el VIH-1, també és un element que altera la patogenicitat i la resposta al tractament antiretroviral. A continuació es revisen les implicacions de cadascun d'aquests factors en la infecció produïda pel VIH-1.

Influència de la variació genètica de l'individu en la infecció pel VIH-1

Durant el transcurs de la pandèmia causada pel VIH-1 s'ha vist que individus amb un nivell semblant d'exposició al virus mostren, no obstant això, un grau d'infecció diferent. Així mateix, individus infectats pel VIH-1 progressen a la SIDA de forma diferent. Finalment, diferents pacients amb els mateixos símptomes (infecció pel VIH-1) responen de forma diferent als mateixos medicaments (antiretrovirals). Variacions en determinats gens de l'individu hoste, també anomenats polimorfismes, són responsables d'aquesta heterogeneïtat en la resposta a la infecció viral i al tractament antiretroviral. Els gens que alteren la patogenicitat del VIH-1 són i) els que codifiquen pels correceptors virals i, ii) els que regulen la resposta immune de l'individu. Els gens afectats que regulen la resposta als fàrmacs antiretrovirals són i) els implicats en el biometabolisme dels fàrmacs i, ii) els implicats en el transport i distribució dels mateixos.

Com ja s'ha explicat amb anterioritat, l'entrada del VIH-1 a la cèl·lula infectada requereix del receptor de limfòcits T CD4 i la presència de, almenys, un receptor de quimiocines que actua com a coreceptor. Els coreceptors més importants del VIH-1 són els anomenats CCR5 i CXCR4. Diferents polimorfismes en CCR5 alteren la capacitat d'infecció del virus i/o la progressió a la SIDA. El polimorfisme més important detectat és una delació de 32 parells de bases en la regió codificant del gen del coreceptor (CCR5 Δ 32), que produeix una proteïna no funcional, i que en estat d'homozigosi prevé l'entrada del virus a la cèl·lula i per tant la infecció. La presència de CCR5 Δ 32 en determinades poblacions d'individus caucàsics explica l'elevada resistència a la infecció pel VIH-1, fins i tot en situacions d'elevat risc d'infecció [42,43]. La presència de CCR5 Δ 32 en heterozigosi no prevé la infecció però provoca una progressió a la SIDA més lenta del normal. L'absència d'un fenotip patològic en individus en homozigosi per a CCR5 Δ 32 i la potent activitat *in vitro* i *ex vivo* de molècules que bloquegen CCR5 fan d'aquest coreceptor un candidat ideal

per a una futura intervenció farmacològica. El segon coreceptor viral, CXCR4, no presenta polimorfismes implicats en la infecció pel VIH-1 i/o progressió a la SIDA, sent un gen que admet molta menor variació que CCR5, suggerint un paper més crític en la cèl·lula que l'anterior. Existeixen altres receptors de quimiocines que han estat implicats en l'entrada del VIH-1 a la cèl·lula però el seu paper *in vivo* no s'ha comprovat amb claredat. Pacients infectats pel VIH-1 que presenten en homozigosi polimorfismes que afecten a dos aminoàcids en el coreceptor CX_{3CR}1 (CX_{3CR}1-I249M280) progressen a la SIDA amb major rapidesa que individus infectats sense aquells polimorfismes [44].

La presència de polimorfismes en gens implicats en els mecanismes d'immunitat de l'individu són una altra font important de variació en la resposta a la infecció pel VIH-1. Totes les espècies de mamífers tenen un grup de gens estretament lligats i molt polimòrfics, que van ser descoberts per la seva implicació en el rebuig o acceptació de trasplantaments o empelts de teixits o òrgans; d'aquí deriva el seu nom de Complexe Principal d'Histocompatibilitat (MHC, de l'anglès Major Histocompatibility Complex). Les molècules codificades pel MHC intervien d'una manera central en el desenvolupament de les respostes immunes específiques, tant la humoral com la cel·lular. El MHC és un conjunt de gens alineats en una regió gran i contínua del genoma (uns 4 milions de parells de bases, un 0.8% del genoma) que en l'espècie humana se situa en el cromosoma 6, i es coneix com regió HLA. Determinades combinacions al·lèlicas dels gens del HLA s'han relacionat amb una major resistència a la infecció pel VIH-1. Per exemple, en una població d'individus infectats pel VIH-1 però en que els nivells en sang han estat indetectables durant més de deu anys, el 28-40% tenien una particular combinació de gens del HLA que suggereix que els protegeix de la malaltia [45].

Polimorfismes genètics de factors que intervien en el metabolisme i transport de fàrmacs, així com en les seves dianes (per exemple, receptors), tenen una gran influència en l'eficàcia i toxicitat dels fàrmacs antiretrovirals. D'aquesta manera, les concentracions actives dels fàrmacs depenen del metabolisme i transport

dels mateixos, que al seu torn està condicionat per la variació dels gens responsables. S'han detectat polimorfismes que condicionen l'efecte del tractament antiretroviral en el gen del citocrom P450 (CYP450), principal responsable del biometabolisme dels fàrmacs antiretrovirals, i en el gen de la glicoproteïna P, relacionat amb el transport i distribució dels fàrmacs [46, 47].

Influència de la variació en gens del VIH-1 en la infecció viral

Polimorfismes en gens del VIH-1 són una altra font molt important de variació genètica que condiciona la infecció i el tractament antiretroviral. Polimorfismes en els gens de la transcriptasa inversa i la proteasa viral canvien la capacitat replicativa del VIH-1 tant en presència [23] com en absència [24, 25] del fàrmac antiretroviral. Conèixer aquests canvis genètics en el virus (genotipat) i el seu efecte en la capacitat replicativa del virus (fenotipat) és important per al disseny d'una teràpia òptima i per a una futura teràpia individualitzada per a tractar la SIDA.

El coneixement que es pot generar de l'estudi de la variació genètica en gens de l'individu infectat (MHC, CCR5, CYP450, glicoproteïna P,...) així com en gens del VIH-1 (transcriptasa inversa, proteasa, GP41,...) pot conduir a un futur diagnòstic molecular per al tractament personalitzat de la SIDA.

Comentaris finals

L'aparició de la SIDA fa més de 20 anys ha suposat una pandèmia a nivell mundial de conseqüències encara imprevisibles. Encara que durant aquest temps s'ha enfortit el compromís polític, els fons van en augment, els programes de tractament estan millorant per a adaptar-se a les necessitats, i els esforços de prevenció s'estan ampliant, tot això no és suficient. De la mateixa manera, la investigació que a nivell bàsic ha estat desenvolupant-se en nombrosos laboratoris sobre la biologia molecular del VIH-1, i que ha contribuït d'una forma important a la millora dels pa-

cients infectats i està sent essencial per al desenvolupament d'una vacuna eficaç enfront del virus, segueix sent insuficient. Al costat d'un major compromís polític que redundi en un increment en la investigació sobre el VIH-1, hem de millorar també els aspectes educatius i culturals per a eliminar l'estigma i la discriminació que bloquegen els esforços per a controlar l'epidèmia mundial i creen un clima ideal per a la seva expansió.

Bibliografia

1. UNAIDS/WHO, *AIDS epidemic update 2003*. 2003.
2. E.A. Berger, P.M. Murphy, and J.M. Farber, *Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease*. *Annu. Rev. Immunol.*, 1999. **17**: p. 657-700.
3. J. Alcami, T. Lain de Lera, L. Folgueira, M.A. Pedraza, J.M. Jacque, F. Bachelier, A.R. Noriega, R.T. Hay, D. Harrich, R.B. Gaynor, J.L. Virelizier, and F.J. Arenzana, *Absolute dependence on kappa B responsive elements for initiation and Tat-mediated amplification of HIV transcription in blood CD4 T lymphocytes*. *EMBO J.*, 1995. **14**: p. 1552-1560.
4. K.A. Jones, and B.M. Peterlin, *Control of RNA initiation and elongation at the HIV-1 promoter*. *Annu. Rev. Biochem.*, 1994. **63**: p. 717-743.
5. B.R. Cullen, *Mechanism of action of regulatory proteins encoded by complex retroviruses*. *Microbiol. Rev.*, 1992. **56**: p. 375-394.
6. B.R. Cullen, *HIV-1 auxiliary proteins: making connections in a dying cell*. *Cell*, 1998. **93**: p. 685-692.
7. Q. Zhou and P.A. Sharp, *Tat-SF1: cofactor for stimulation of transcription elongation by HIV-1 Tat*. *Science*, 1996. **274**: p. 605-610.
8. C. Suñé, R. Hayashi, Y. Liu, W.S. Lane, R.A. Young, and M.A. Garcia-Blanco, *CA150, a nuclear protein associated with the RNA polymerase II holoenzyme, is involved in Tat-activated human immunodeficiency virus type 1 transcription*. *Mol. Cell. Biol.*, 1997. **17**(10): p. 6029-6039.
9. J.W. Conaway and R.C. Conaway, *Transcription elongation and human disease*. *Annu. Rev. Biochem.*, 1999. **68**: p. 301-319.
10. B.R. Cullen, *Retroviruses as model systems for the study of nuclear RNA export pathways*. *Virology*, 1998. **249**: p. 203-210.
11. F.J. Palella, K.M. Delaney, A.C. Moorman, M.O. Loveless, J. Fuhrer, G.A. Satten, D.J. Aschman and S.D. Holmberg, *Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection*. *N. Engl. J. Med.*, 1998. **338**: p. 853-860.
12. D. Finzi, J. Blankson, J.D. Siliciano, J.B. Margolick, K. Chadwick, T.

- Pierson, K. Smith, J. Lisziewicz, F. Lori, C. Flexner, T.C. Quinn, R.E. Chaisson, E. Rosenberg, B. Walker, S. Gange, J. Gallant, and R.F. Siliciano, *Latent infection of CD4+ T cells provides a mechanism for lifelong persistence of HIV-1, even in patients on effective combination therapy*. *Nat. Med.*, 1999. **5**: p. 512-517.
13. J.N. Blankson, D. Persaud, and R.F. Siliciano. *The challenge of viral reservoirs in HIV-1 infection*. *Ann. Rev. Med.*, 2002. **53**: p. 557-593.
14. D.D. Ho, *Toward HIV eradication or remission: the tasks ahead*. *Science*, 1998. **280**: p. 1866-1867.
15. D.D. Ho, A.U. Neumann, A.S. Perelson, W. Chen, J.M. Leonard, M. Markowitz, *Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection*. *Nature*, 1995. **373**: p. 123-126.
16. X. Wei, S.K. Ghosh, M.E. Taylor, V.A. Johnson, E.A. Emini, P. Deutsch, J.D. Lifson, S. Bonhoeffer, M.A. Nowak, B.H. Hahn, et al., *Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection*. *Nature*, 1995. **373**: p. 117-122.
17. B.D. Preston, B.J. Poiesz, and L.A. Loeb, *Fidelity of HIV-1 reverse transcriptase*. *Science*, 1988. **242**: p. 1168-1171.
18. I. Najera, A. Holguin, M.E. Quiñones-Mateu, M.A. Muñoz-Fernandez, R. Najera, C. Lopez-Galindez, and E. Domingo. *Pol gene quasispecies of human immunodeficiency virus: mutations associated with drug resistance in virus from patients undergoing no drug therapy*. *J. Virol.*, 1995. **69**: p. 23-31.
19. M.J. Kozal, N. Shah, N. Shen, R. Yang, R. Fucini, T.C. Merigan, D.D. Richman, D. Morris, E. Hubbell, M. Chee, and T.R. Gingeras, *Extensive polymorphisms observed in HIV-1 clade B protease gene using high-density oligonucleotide arrays*. *Nat. Med.*, 1996. **2**: p. 753-759.
20. W.J. Lech, G. Wang, Y.L. Yang, Y. Chee, K. Dorman, D. McCrae, L.C. Lazzeroni, J.W. Erickson, J.S. Sinsheimer, and A.H. Kaplan, *In vivo sequence diversity of the protease of human immunodeficiency virus type 1: presence of protease inhibitor-resistant variants in untreated subjects*. *J. Virol.*, 1996. **70**: p. 2038-2043.
21. C.F. Perno, A. Cozzi-Lepri, C. Balotta, F. Forbici, M. Violin, A. Bertoli, G. Facchi, P. Pezzotti, G. Cadeo, G. Tositti, S. Pasquinucci, et al., *Secondary mutations in the protease region of human immunodeficiency virus and virologic failure in drug-naive patients treated with protease inhibitor-based therapy*. *J. Infect. Dis.*, 2001. **184**: p. 983-991.
22. L. Vergne, M. Peeters, E. Mpoudi-Ngole, A. Bourgeois, F. Liegeois, C. Toure-Kane, S. Mboup, C. Mulanga-Kabeya, E. Saman, J. Jourdan, J. Reynes, and E. Delaporte, *Genetic diversity of protease and reverse transcriptase sequences in non-subtype-B human immunodeficiency virus type 1 strains: evidence of many minor drug resistance mutations in treatment-naive patients*. *J. Clin. Microbiol.*, 2000. **38**: p. 3919-3925.

23. C. Suñé, L. Brennan, D.R. Stover, and T. Klimkait, *Effect of polymorphisms on the replicative capacity of protease inhibitor-resistant HIV-1 variants under drug pressure*. Clin. Microbiol. Infect., 2004. **10**: p. 119-126.
24. M. Markowitz, H. Mo, D.J. Kempf, D.W. Norbeck, T.N. Bhat, J.W. Erickson, and D.D. Ho, *Selection and analysis of human immunodeficiency virus type 1 variants with increased resistance to ABT-538, a novel protease inhibitor*. J. Virol., 1995. **69**: p. 701-706.
25. J. Martinez-Picado, A.V. Savara, L. Sutton, and R. T. D'Aquila, *Replicative fitness of protease inhibitor-resistant mutants of human immunodeficiency virus type 1*. J. Virol., 1999. **73**: p. 3744-3752.
26. J. Durant, P. Clevenbergh, P. Halfon, P. Delgiudice, S. Porsin, P. Simonet, N. Montagne, C.A. Boucher, J.M. Schapiro, and P. Dellamonica, *Drug-resistance genotyping in HIV-1 therapy: the VIRADAPT randomised controlled trial*. Lancet. 1999. **353**: p. 2195-2199.
27. M. Gottfredsson, and P.R. Bohjanen, *Human immunodeficiency virus type 1 as a target for gene therapy*. Frontiers in Bioscience, 1997. **2**: p. 619-634.
28. C. Suñé, and M.A. Garcia-Blanco, *Transcriptional cofactor CA150 regulates RNA polymerase II elongation in a TATA-box-dependent manner*. Mol. Cell. Biol., 1999. **19**: p. 4719-4728.
29. S.M. Carty, A.C. Goldstrohm, C. Suñé, M.A. Garcia-Blanco, and A.L. Greenleaf, *Protein-interaction modules that organize nuclear function: FF domains of CA150 bind the phosphoCTD of RNA polymerase II*. Proc. Natl. Acad. Sci., 2000. **97**: p. 9015-9020.
30. B.R. Cullen, *Does HIV-1 Tat induce a change in viral initiation rights?* Cell, 1993. **73**: p. 417-420.
31. E.S. Lander, L.M. Linton, B. Birren, C. Nusbaum, M.C. Zody, J. Baldwin, K. Devon, K. Dewar, M. Doyle, W. FitzHugh, R. Funke, et. al., *Initial sequencing and analysis of the human genome*. Nature, 2001. **409**: p. 860-921.
32. J.C. Venter, M.D. Adams, E.W. Myers, P.W. Li, R.J. Mural, G.G. Sutton, H.O. Smith, M. Yandell, C.A. Evans, R.A. Holt, J.D. Gocayne, et. al., *The sequence of the human genome*. Science, 2001. **291**: p. 1304-1351.
33. H. Zhu, J.P. Cong, G. Mamtora, T. Gingeras, and T. Shenk, *Cellular gene expression altered by human cytomegalovirus: global monitoring with oligonucleotide arrays*. Proc. Natl. Acad. Sci., 1998. **95**(24): p. 14470-14475.
34. K.L. Mossman, P.F. Macgregor, J.J. Rozmus, A.B. Goryachev, A.M. Edwards, and J.R. Smiley, *Herpes simplex virus triggers and then disarms a host antiviral response*. J. Virol., 2001. **75**(2): p. 750-758.
35. R. Renne, C. Barry, D. Dittmer, N. Compitello, P.O. Brown, and D. Ganem, *Modulation of cellular and viral gene expression by the latency-associated nuclear antigen of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus*. J. Virol., 2001. **75**(1): p. 458-468.
36. F. Bachelierie, J. Alami, F. Arenzana-Seisdedos, and J.L. Virelizier, *HIV enhancer activity perpetuated by NF-kappa B induction on infection of monocytes*. Nature, 1991. **350**: p. 709-712.
37. G.K. Geiss, R.E. Bumgarner, M.C. An, M.B. Agy, A.B. van 't Wout, E. Hammersmart, V.S. Carter, D. Upchurch, J.I. Mullins, and M.G. Katze, *Large-scale monitoring of host cell gene expression during HIV-1 infection using cDNA microarrays*. Virology, 2000. **266**: p. 8-16.
38. V.E. Velculescu, L. Zhang, B. Vogelstein, and K.W. Kinzler, *Serial analysis of gene expression*. Science, 1995. **270**: p. 484-487.
39. V.E. Velculescu, L. Zhang, W. Chou, J. Vogelstein, M.A. Basrai, D.E. Basset Jr., P. Hieter, B. Vogelstein and K.W. Kinzler, *Characterization of the yeast transcriptome*. Cell, 1997. **88**: p. 243-251.
40. L. Zhang, W. Zhou, V.E. Velculescu, S.E. Kern, R.H. Hruban, S.R. Hamilton, B. Vogelstein, and K.W. Kinzler, *Gene expression profiles in normal and cancer cells*. Science, 1997. **276**: p. 1268-1272.
41. T.C. He, A.B. Sparks, C. Rago, H. Hermeking, L. Zawel, L.T. da Costa, P.J. Morin, B. Vogelstein, and K.W. Kinzler, *Identification of c-MYC as a target of the APC pathway*. Science, 1998. **281**: p. 1438-1441.
42. M. Samson, F. Libert, B.J. Doranz, J. Rucker, C. Liesnard, C.M. Farber, S. Saragosti, C. Lapoumeroulie, J. Cognaux, C. Forceille, G. Muyldermans, C. Verhofstede, G. Burtonboy, M. Georges, T. Imai, S. Rana, Y. Yi, R.J. Smyth, R.G. Collman, R.W. Doms, G. Vassart, and M. Parmentier, *Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene*. Nature, 1996. **382**: p. 722-725.
43. R. Liu, W.A. Paxton, S. Choe, D. Ceradini, S.R. Martin, R. Horuk, M.E. MacDonald, H. Stuhlmann, R.A. Koup, and N.R. Landau, *Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection*. Cell, 1996. **86**: p. 367-377.
44. S. Faure, L. Meyer, D. Costagliola, C. Vaneensberghe, E. Genin, B. Autran, J.F. Delfraissy, D.H. McDermott, P.M. Murphy, P. Debre, I. Theodorou, and C. Combadiere, *Rapid progression to AIDS in HIV+ individuals with a structural variant of the chemokine receptor CX3CR1*. Science, 2000. **287**: p. 2274-2277.
45. M. Carrington, G.W. Nelson, M.P. Martin, T. Kissner, D. Vlahov, J.J. Goedert, R. Kaslow, S. Buchbinder, K. Hoots, and S.J. O'Brien, *HLA and HIV-1: heterozygote advantage and B*35-Cw*04 disadvantage*. Science, 1999. **283**: p. 1748-1752.
46. X. Li, and W.K. Chan., *Transport, metabolism and elimination mechanisms of anti-HIV agents*. Adv. Drug Deliv. Rev., 1999. **39**: p. 81-103.
47. J. Fellay, C. Marzolini, E.R. Meaden, D.J. Back, T. Buclin, J.P. Chave,

L.A. Decosterd, H. Furrer, M. Opravil, G. Pantaleo, D. Rietelska, L. Ruiz, A.H. Schinkel, P. Vernazza, C.B. Eap, and A. Teleni; Swiss HIV Cohort Study, *Response to antiretroviral treatment in HIV-1-infected individuals with allelic variants of the multidrug resistance transporter 1: a pharmacogenetics study*. Lancet, 2002, **359**: p. 30-36.