

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
Departamento de Microbiología



TESIS DOCTORAL

**Estudio de la respuesta clínica al tratamiento antirretroviral en
pacientes infectados por VIH-1 mediante el estudio de resistencias y tropismo viral.
Comparación entre subtipos infectantes.**

Manuel Parra Sánchez
Sevilla 2014

ESTUDIO DE LA RESPUESTA CLÍNICA AL TRATAMIENTO ANTIRRETROVIRAL EN PACIENTES INFECTADOS POR VIH-1 MEDIANTE EL ESTUDIO DE RESISTENCIAS Y TROPISMO VIRAL. COMPARACIÓN ENTRE SUBTIPOS INFECTANTES.

Memoria presentada para optar al grado de Doctor en Biología por:

Manuel Parra Sánchez

Dirigida por:

Dr. José Carlos Palomares Folia

Catedrático del Departamento de Microbiología de la Universidad de Sevilla.

Dra. Estrella Martín Mazuelos

Profesora Asociada del Departamento de Microbiología de la Universidad de Sevilla.

**Departamento de Microbiología
UNIVERSIDAD DE SEVILLA**



Fecha inscripción en departamento: Junio de 2012.

Fecha inscripción en registro: Mayo 2013.

Fecha de depósito en Universidad: Mayo 2014.

El Dr. José Carlos Palomares Folía, Profesor Catedrático del Departamento de Microbiología de la Universidad de Sevilla y la Dra. Estrella Martín Mazuelos, Profesora Asociada al Departamento de Microbiología de la Universidad de Sevilla.

CERTIFICAN:

Que el proyecto de tesis titulada: **“ESTUDIO DE LA RESPUESTA CLÍNICA AL TRATAMIENTO ANTIRRETROVIRAL EN PACIENTES INFECTADOS POR VIH-1 MEDIANTE EL ESTUDIO DE RESISTENCIAS Y TROPISMO VIRAL. COMPARACIÓN ENTRE SUBTIPOS INFECTANTES”**, ha sido realizada por Manuel Parra Sánchez y dirigida por los que la suscriben, para ser inscrita en el Departamento de Microbiología de la Universidad de Sevilla.

Lo que hace constar a efectos oportunos, en Sevilla, a 22 de Mayo de 2014

Fdo:

José Carlos Palomares Folía

Estrella Martín Mazuelos

Si conoces a los demás y te conoces a ti mismo,
ni en cien batallas correrás peligro;
si no conoces a los demás, pero te conoces a ti mismo,
perderás una batalla y ganarás otra;
si no conoces a los demás ni te conoces a ti mismo,
correrás peligro en cada batalla.

Sun Tzu. El arte de la guerra.

Agradecimientos.

Durante todos estos años recorriendo los pasillos del laboratorio de Microbiología tengo que agradecer mucho a muchas personas que han hecho posible el procesado de muestras, obtención de datos, análisis y redacción de esta tesis. Espero no dejarme a nadie atrás.

Comenzaré con mis tutores: a la Dra. Martín, mi “mecenas” que me ha permitido disfrutar de este tiempo para redactar esta tesis, por su tiempo y paciencia; al Dr. Palomares, el maestro que me ha enseñado cuanto sabe e intento plasmar en esta tesis, por la gran paciencia que ha tenido conmigo durante estos años, por todos esos almuerzos, reuniones, discusiones y cervezas que celebraban un viernes o un pequeño éxito de esa semana.

A todos los técnicos que están o han pasado por el servicio. De todos ellos he aprendido algo, han amenizado una tarde o han dado una palmada de ánimo. Quiero destacar en este punto a: Luis, el jefe de máquinas de Molecular, la de cosas que he aprendido con él; Nieves, la niña de nuestra sección, siempre una ayuda en cualquier momento; Cele, de los últimos fichajes, siempre una sonrisa que animaba a seguir hasta en los días más complicados; JL Cabezas, cuántos momentos mano a mano con distintas técnicas.

A los distintos residentes que han pasado por el laboratorio en estos años, con especial cariño a Trini e Ismail, compañeros de fatigas, en los buenos y no tan buenos momentos.

Al personal facultativo del laboratorio, por todas esas tardes y momentos compartidos que acompañaban y animaron a la elaboración de este proyecto.

Agradecer a Javier y Felipe (H. Macarena, Sevilla) que me ayudaron con la técnica del tropismo viral e integrasa de VIH, a Isabel (H. Virgen de la Victoria, Málaga) por sus consejos y amistad, a Fede, Marta y Natalia (H. San Cecilio, Granada), por vuestra ayuda en todo lo referente a VIH, consejos y buenos momentos en cada congreso y reunión que hemos coincidido.

A los clínicos de los Hospitales Infanta Elena y Juan Ramón Jiménez (Huelva), Puerta del Mar y Jerez (Cádiz), de la Merced (Osuna) y Valme por facilitar los datos clínicos necesarios.

A Lola, Joaquín e Iñaqui, que me acompañaron y presentaron a los clínicos de los distintos hospitales para recopilar los datos necesarios para el análisis.

A Paco García, por su ayuda con las distintas técnicas de secuenciación y reactivos necesarios, una ayuda fundamental.

A Adela, “responsable” de que comenzara en Micro y acabara redactando esta tesis.

Por último, reservo estas líneas a mis amigos, por su apoyo y ánimo en los momentos asociales que a veces conlleva redactar una tesis. A mis padres y hermana, por su cariño y apoyo incondicional. A Marta, mi alma gemela en este año tan especial.

Finalmente, a todos aquellos que han ayudado en este proyecto de investigación y me haya podido dejar atrás: siempre agradecido.

Índice.

Abreviaturas.
Factores de riesgo contemplados.
Códigos de aminoácidos.
Factores de riesgo contemplados.
Código de nucleótidos.
Código de aminoácidos (Nomenclatura de 1 o 3 letras).
Niveles de evidencia.
Grados de recomendación.

Addendum.

1.Introducción.

1.1. Antecedentes históricos.	1
1.2. El virus de la inmunodeficiencia humana: descripción y clasificación.	1
1.3. Estructura del VIH-1.	3
1.4. Ciclo biológico.	5
1.4.1. Entrada viral.	5
1.4.2. Interacción con los receptores y entrada del virus en la célula.	5
1.4.3. Internalización de la cápside y liberación del ARN viral.	6
1.4.4. Retrotranscripción, transporte e integración.	6
1.4.5. Replicación del VIH.	7
1.4.6. Formación y maduración de los viriones.	7
1.5. Mecanismos de escape viral a la respuesta inmune.	8
1.5.1. Variabilidad genética.	8
1.5.2. Enmascaramiento de los epítomos de neutralización.	9
1.5.3. Latencia, persistencia y reactivación.	9
1.5.4. Cinética de replicación. Definición de cuasiespecie.	9
1.6. Clasificación del VIH.	10
1.6.1. Tipos de VIH.	10
1.6.2 Grupos y subtipos de VIH.	11
1.6.3. Formas circulantes recombinantes (CRFs).	11
1.6.4. Distribución geográfica del VIH-1.	13
1.6.5. Importancia de los subtipos de VIH-1 en el diagnóstico y el tratamiento.	14
1.7 Tratamiento antirretroviral.	15
1.7.1. Inhibidores de la transcriptasa inversa.	16
1.7.1.1 Inhibidores de la RT análogos de nucleósidos (ITIAN).	17
1.7.1.2 Inhibidores de la RT no análogos de nucleósidos (ITINAN).	17
1.7.2 Inhibidores de la proteasa (IPs).	18
1.7.3 Inhibidores de la fusión.	19
1.7.4 Inhibidores de la integrasa.	19
1.7.5 Nuevas moléculas en estudio.	20
1.7.6 Combinación de antirretrovirales aprobados y comercializados.	20
1.8. Definición de fracaso virológico.	21
1.9. Resistencia a los antirretrovirales.	21
1.9.1 Barreras genéticas de resistencia.	22
1.9.2. Resistencia cruzada y multiresistencia.	22
1.9.3. Mutaciones asociadas a resistencias: concepto de mutaciones primarias y secundarias.	23
1.9.3.1. Resistencia a inhibidores de la RT análogos de nucleósidos.	23
1.9.3.2. Resistencia a inhibidores de la RT no análogos de nucleósidos (ITINANs).	25
1.9.3.3. Resistencia a inhibidores de la proteasa (IPs).	25
1.9.3.4. Resistencia a Inhibidores de la Fusión.	26
1.9.3.5. Resistencia a inhibidores de la entrada.	27
1.9.3.6. Resistencia a los inhibidores de la integrasa.	27
1.9.3.7. Importancia de los polimorfismos en subtipos no B.	28
1.9.3.8. Resistencias celulares.	28
1.9.4. Métodos más usados en la práctica clínica para la detección de resistencias.	29
1.9.4.1. Test genotípicos de resistencia.	29
1.9.4.1.1. Variantes minoritarias.	29
1.9.4.1.2. Nuevos test genotípicos: secuenciación masiva.	30
1.9.4.2. Interpretación de las mutaciones de resistencia.	32
1.9.5. Utilidad en la práctica clínica.	33
1.9.6. Utilidad de los estudios de resistencia en los subtipos no B del VIH-1.	33

2. Objetivos.	36
3. Pacientes y métodos.	39
3.1. Estudio epidemiológico de subtipos no-B del VIH-1 en Andalucía Occidental.	40
3.1.1. Pacientes.	40
3.1.2. Métodos.	41
3.1.2.1. Determinación de la carga de ARN viral.	41
3.1.2.2. Subtipado de las cepas de VIH-1.	41
3.1.2.3. Análisis de clusters de subtipos no B.	42
3.1.2.4. Metodología estadística.	42
3.2. Estudio de los polimorfismos naturales en las regiones de la proteasa, retrotranscriptasa, integrasa y región V3 del gen gp120.	43
3.2.1. Detección de mutaciones de resistencia en proteasa y retrotranscriptasa.	43
3.2.2. Extracción de ácidos nucleicos.	43
3.2.3. Amplificación del ácido nucleico: RT-PCR.	44
3.2.3.1. Secuenciación bidireccional y electroforesis de los secuenciados.	45
3.2.3.2. Electroforesis de los productos de secuenciación.	47
3.2.3.3. Alineamiento de las secuencias e interpretación de los resultados.	47
3.2.4. Detección de mutaciones de resistencia en integrasa (subtipos no B).	48
3.2.4.1. Amplificación.	48
3.2.4.2. Secuenciación bidireccional y electroforesis del producto amplificado.	50
3.2.4.3. Electroforesis de los productos de secuenciación.	51
3.2.4.4. Alineamiento de las secuencias e interpretación de los resultados.	51
3.2.5. Determinación del tropismo viral mediante la secuenciación de la región V3 de la glicoproteína 120 del VIH-1.	51
3.2.5.1. Extracción de ácidos nucleicos según el tipo de muestra.	51
3.2.5.1.1. Extracción de sueros.	52
3.2.5.1.2. Extracción de sangre total.	52
3.2.5.2. Preparación de la Master Mix para realizar la RT-PCR.	52
3.2.5.3. Secuenciación bidireccional y electroforesis de los secuenciados.	53
3.2.5.4. Electroforesis de los productos de secuenciación.	54
3.2.5.5. Alineamiento de las secuencias e interpretación de los resultados.	55
3.4. Desarrollo de la aplicación bioinformática “MARGI-HIV Tropism” para la interpretación genotípica del tropismo viral del VIH-1.	56
3.4.1. Introducción: ¿por qué se ha desarrollado esta aplicación?	56
3.4.2. Problema técnico planteado.	57
3.4.3. Descripción detallada de la aplicación.	57
4. Resultados.	60
4.1. Características de la población general de estudio.	61
4.1.1. Distribución de subtipos no B en nuestra población.	64
4.2. Estudio del recuento de CD4 y logCV de VIH en los pacientes naïve incluidos en el estudio.	65
4.3. Estudio de las mutaciones asociadas a resistencia a antirretrovirales del VIH. Comparación en pacientes naïve (resistencias primarias) y pacientes tratados durante los años 2009-2012.	66
4.4. Mutaciones asociadas a resistencia y/o disminución de la actividad del TAR. Comparación entre subtipos B y no B de la población de estudio.	68
4.4.1. Análisis de efectividad (definido como CV<50 copias o indetectable) de los ARVs usados según el subtipo infectante.	69
4.4.2. Respuesta virológica en subtipos no B de nuestra área.	75
4.5. Estudio de polimorfismos en la proteasa y retrotranscriptasa en subtipos no B de VIH-1.	75
4.5.1. Estudio de polimorfismos en proteasa y retrotranscriptasa únicos o mayoritarios de subtipos no B.	78
4.6. Análisis de clústers de subtipos no B.	81
4.7. Tropismo viral mediante la secuenciación de la región V3 de subtipos no B.	85
4.7.1. Prevalencia de polimorfismos asociados a disminución de la actividad de maraviroc.	86
4.7.2. Discordancias entre algoritmos de interpretación genotípica del tropismo de VIH-1 en secuencias con inserciones o deleciones en la región V3: MARGI-HIV Tropism.	87
4.8. Estudio de mutaciones de resistencia a la integrasa viral de VIH-1 subtipos no B.	86
4.8.1. Análisis de polimorfismos de la secuencia de la integrasa viral en subtipos no B.	89

5. Discusión.	90
5.1. Características de la población general del estudio. Distribución de subtipos no B en nuestra población.	91
5.2. Estudio del recuento de CD4 y logCV de VIH en los pacientes naïve incluidos en el estudio.	93
5.3. Estudio de las mutaciones asociadas a resistencia a antirretrovirales del VIH. Comparación en pacientes naïve (resistencias primarias) y pacientes tratados durante los años 2009-2012. Análisis de efectividad de los ARVs usados según subtipo infectante. Respuesta virológica en subtipos no B de nuestra área.	94
5.4. Mutaciones asociadas a resistencia y/o disminución de la actividad del TAR. Comparación entre subtipos B y no B de la población de estudio. Análisis de efectividad (definido como CV<50 copias o indetectable) de los ARVs usados según el subtipo infectante. Respuesta virológica en subtipos no B de nuestra área.	96
5.5. Estudio de polimorfismos en la proteasa y la retrotranscriptasa de subtipos no B.	98
5.6. Análisis de clústers de subtipos no B.	99
5.7. Tropismo viral mediante la secuenciación de la región V3 de subtipos no B. Prevalencia de polimorfismos asociados a disminución de la actividad de maraviroc. Discordancias entre algoritmos de interpretación genotípica del tropismo de VIH-1 en secuencias con inserciones o deleciones en la región V3: MARGI-HIV Tropism.	100
5.8. Estudio de mutaciones de resistencia a la integrasa viral de VIH-1 subtipos no B. Análisis de polimorfismos de la secuencia de la integrasa viral en subtipos no B.	102
6. Conclusiones.	104
7. Referencias.	107
Tablas.	
Tabla 1.1. Clasificación de la familia Retroviridae.	2
Tabla 1.2. Genes codificados en el genoma del VIH.	4
Tabla 1.3. Distribución geográfica de los CRFs. En negrita los analizados en este estudio.	13
Tabla 1.4. Tratamientos antirretrovirales aprobados hasta la fecha para su uso, año de aprobación por la FDA y familia a la que pertenece.	16
Tabla 1.5. Resumen de algunos antirretrovirales en fases avanzadas de estudio.	20
Tabla 1.6. Principales características de los secuenciadores de 3 ^a generación.	31
Tabla 3.1. Estudio de resistencias a antirretrovirales realizados entre los años 2009 y 2012.	40
Tabla 3.2. Procedencia por hospitales de los estudios de resistencia realizados.	40
Tabla 4.1. Características de todos los pacientes recogidos en la base de datos.	61
Tabla 4.2. Motivos de la petición del estudio de resistencias durante el periodo de estudio (%).	62
Tabla 4.3. Porcentaje de pacientes tratados y no tratados durante el periodo de estudio (%).	62
Tabla 4.4. Características de los pacientes infectados por subtipos no-B.	63
Tabla 4.5. Pautas de tratamiento utilizadas en los pacientes VIH-1 subtipo no B.	64
Tabla 4.6. Porcentaje del recuento de CD4 entre los pacientes naïve incluidos en el estudio.	65
Tabla 4.7. Porcentaje de la carga viral (copias/ml) entre los pacientes naïve incluidos en el estudio.	66
Tabla 4.8. Porcentajes de resistencia entre las distintas familias de ARV entre pacientes naïve.	67
Tabla 4.9. Datos demográficos de los pacientes incluidos con subtipo A1.	70
Tabla 4.10. Datos demográficos de los pacientes incluidos con subtipo C.	71
Tabla 4.11. Datos demográficos de los pacientes incluidos con subtipo CRF02_AG.	72
Tabla 4.12. Datos demográficos de los pacientes incluidos con subtipo F1.	74
Tabla 4.13. Listado de polimorfismos encontrados sólo en subtipos no B.	78
Tabla 4.14. Listado de polimorfismos encontrados sólo en RT de subtipos no B.	79
Tabla 4.15. Polimorfismos con mayor frecuencia en subtipo no B comparados con subtipos B.	80
Tabla 4.16. Polimorfismos con mayor frecuencia en subtipo no B comparados con subtipos B en la retrotranscriptasa.	80
Tabla 4.17. Características de los pacientes con tropismo X4.	85
Tabla 4.18. Prevalencia de los polimorfismos asociados a disminución de la actividad de maraviroc.	86

Figuras.

Figura 1.1 Estructura tridimensional del VIH.	3
Figura 1.2. Organización del genoma del VIH-1.	4
Figura 1.3. Esquema de la entrada del virus en la célula huésped.	5
Figura 1.4. Ciclo biológico del VIH.	8
Figura 1.5. Distancia genética en el gen pol del VIH-1.	8
Figura 1.6. Estimación mundial de personas infectadas con VIH-1.	10
Figura 1.7. Árbol filogenético indicando las distancias entre subtipos y grupos de HIV-1 y SIVgor.	11
Figura 1.8. Coinfección, superinfección y recombinación en la infección por VIH.	11
Figura 1.9. Representación de algunos CRFs y su composición genómica.	12
Figura 1.10. Distribución mundial del VIH-1.	13
Figura 1.11. Antirretrovirales y sus dianas.	15
Figura 1.12. Modelo tridimensional de la RT.	17
Figura 1.13. Modelo tridimensional de la proteasa.	18
Figura 1.14. Estructura de las regiones HR1 y HR2 de gp41 y mecanismo de acción de ENF.	19
Figura 1.15. Representación de la barrera de diferentes fármacos y su potencia.	22
Figura 1.16. Mecanismo de resistencia de la RT a ITINANs mediante inhibición competitiva.	25
Figura 1.17. Workflow del proceso de pirosecuenciación de la plataforma 454.	30
Figura 1.18. Distribución de subtipos de VIH-1 de la cohorte CoRis.	34
Figura 3.1. Principios del aislamiento automático de ácidos nucleicos por el sistema MagNA Pure Compact.	44
Figura 3.2. Secuencia del a región V3 amplificada por los cebadores ES7 y E125.	59
Figura 3.3. Ejemplo de secuencia que permite determinar el tropismo viral y que se utiliza en esta aplicación.	59
Figura 4.1. Motivo de la petición en el periodo estudiado (2009-2012) expresada en %.	61
Figura 4.2. Evolución de los pacientes tratados/no tratados en el periodo 2009-2012 (%).	62
Figura 4.3. Porcentaje de subtipos B y no B en la zona de estudio.	64
Figura 4.4. Distribución de los subtipos no B entre las tres ciudades de estudio indicados como porcentaje.	64
Figura 4.5. Distribución de los 70 subtipos VIH-1 no B analizados.	65
Figura 4.6. Recuento CD4 entre los pacientes naïve durante los cuatro años de estudio.	65
Figura 4.7. Representación del % de la carga viral de VIH (copias/ml) de pacientes naïve incluidos en el estudio.	66
Figura 4.8. Número total de resistencias y actividades disminuidas a fármacos de ITIAN, ITINAN e IPs en los cuatro años de estudio entre los pacientes naïve.	66
Figura 4.9. Número total de resistencias y actividades disminuidas a fármacos de ITIAN, ITINAN e IPs en los cuatro años de estudio entre los pacientes tratados.	67
Figura 4.10. Mutaciones asociadas a resistencia a IPs que presentan una frecuencia superior al 1% entre todas las secuencias analizadas en los periodos 2009-2012.	68
Figura 4.11. Mutaciones asociadas a resistencia a ITINANs que presentan una frecuencia superior al 1% entre todas las secuencias analizadas en los periodos 2009-2012.	68
Figura 4.12. Mutaciones asociadas a resistencia a ITIANs que presentan una frecuencia superior al 1% entre todas las secuencias analizadas en los periodos 2009-2012.	69
Figura 4.13. LogCV en las distintas determinaciones de pacientes con subtipo A1.	70
Figura 4.14. LogCV en las distintas determinaciones de pacientes con subtipo C.	71
Figura 4.15. LogCV en las distintas determinaciones de pacientes con subtipo CRF02_AG.	73
Figura 4.16. LogCV en las distintas determinaciones de pacientes con subtipo F1.	75
Figura 4.17. Número de pacientes que consiguieron respuesta virológica y subtipos.	75
Figura 4.18. Análisis de clústers de subtipos A1.	81
Figura 4.19. Análisis de clústers de subtipos C.	82
Figura 4.20. Análisis de clústers de subtipos CRF02_AG.	83
Figura 4.21. Análisis de clústers de subtipos CRF14_BG.	83
Figura 4.22. Análisis de clústers de subtipos F1.	84
Figura 4.23. Secuencias analizadas por WebLogo 3.3 con las secuencias de subtipos no B con tropismo X4.	85
Figura 4.24. Secuencias analizadas por WebLogo 3.3 con las secuencias de subtipos no B con tropismo CCR5.	85
Figura 4.25. Resultado obtenidos tras analizar una secuencia de interés con MARGI-HIV Tropism.	88
Figura 4.26. Frecuencias (%) de sustituciones en cada codón de la integrasa amplificado (codones 12-175).	89

Abreviaturas.

3TC: Lamivudina
ABC: Abacavir
ADN: Ácido desoxirribonucleico
ADNc: ADN complementario
APV: Amprenavir
ARN: Ácido ribonucleíco
ARNm: ARN mensajero.
ARV: Antirretroviral
ATV: Atazanavir
CRF: forma circular recombinante (circular form recombinant)
CVP: Carga viral plasmática
d4T: Estavudina
ddI: Didanosina
DGV: Dolutegravir
dNTP: Desoxinucleótido trifosfato
DRV: Darunavir
EFV: Efavirenz
ENF: Enfuvirtida
ETR o ETV: Etravirina
EVG: Elvitegravir
FPV: Fosamprenavir
FTC: Emtricitabina
IDV: Indinavir
IF: Inhibidores de la fusión
IncCCR5: Inhibidores del correceptor CCR5.
InInt Inhibidores de la integrasa
IP/r: Inhibidor de la proteasa (IP) potenciado con ritonavir
IP: Inhibidores de la proteasa
ITIAN Inhibidor/es transcriptasa inversa análogos nucleósido o nucleótido
ITINAN Inhibidor/es transcriptasa inversa no nucleósidos
ITS Infecciones de transmisión sexual
LPV: Lopinavir
MAR: Mutaciones asociadas a resistencia
MVC: Maraviroc
NFV: Nelfinavir
NVP: Nevirapina
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
pDNA: ADN proviral.
PR: proteasa
RAL: Raltegravir
RPV: Rilpivirina
RT: Retrotranscriptasa o transcriptasa inversa.
RTV: Ritonavir
SQV: Saquinavir
T-20: enfuvirtida
TAR: Tratamiento antirretroviral
TARGA: Tratamiento antirretroviral de gran actividad
TDF: Tenofovir
TPV: Tipranavir
VIH-1: Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1
VIH-2: Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 2
ZDV, AZT: Zidovudina

Factores de riesgo contemplados.

UDVP: Usuarios de drogas por vía parenteral
HMS: Homosexual
HTS: Heterosexual
UDVP/HMS: Usuarios de drogas por vía parenteral y homosexual.
UHMD: Usuario con hemoderivados.

Código de nucleótidos.

A: Adenina
C: Citosina
G: Guanina
T: Timina

Mezclas:

K: G ó T B: C, G ó T N: A, C, G ó T.
M: A ó C D: A, G ó T
R: A ó G H: A, C ó T
S: C ó G V: A, C ó G
W: A ó T
Y: C ó T

Código de aminoácidos (Nomenclatura de 1 o 3 letras):

A (Ala): Alanina
C (Cys): Cisteína
D (Asp): Ácido aspártico
E (Glu): Ácido glutámico
F (Phe): Fenilalanina
G (Gly): Glicina
H (His): Histidina
I (Ile): Isoleucina
K (Lys): Lisina
L (Leu): Leucina
M (Met): Metionina
N (Asn): Asparragina
P (Pro): Prolina
Q (Gln): Glutamina
R (Arg): Arginina
S (Ser): Serina
T (Thr): Treonina
V (Val): Valina
W (Trp): Triptófano
Y (Tyr): Tirosina

Niveles de evidencia.

1. Metaanálisis, revisiones sistemáticas de ensayos clínicos o ensayos clínicos aleatorizados y controlados.
2. Revisiones sistemáticas de estudios de cohorte o de casos control.
3. Estudios no analíticos como informes de casos y serie de casos.
4. Opinión de expertos.

Grados de recomendación.

- A. Existe buena evidencia para recomendar su uso.
- B. Existe evidencia discreta para recomendar su uso.
- C. La evidencia no es concluyente y no se puede recomendar ni desaconsejar su uso. Otros factores pueden influir en el uso de esta intervención.
- D. Existe discreta evidencia para desaconsejar su uso.
- E. Existe buena evidencia para desaconsejar su uso.

Addendum.

Parte de los resultados han sido publicados y presentados a diversos congresos nacionales e internacionales:

1. Desarrollo de una aplicación bioinformática para facilitar la determinación genotípica del tropismo del VIH. **Parra M**, Zakariya I, Ferrero I, Martín-Mazuelos E, Palomares JC. XXIV Reunión de la SAMPAC (Sociedad Andaluza de Microbiología y Parasitología Clínica). Sevilla 10-11 de Noviembre de **2011**. Presentación poster.
2. Estudio de tropismo de subtipos no-B de VIH-1 en la región occidental de Andalucía (Cádiz, Jerez, Huelva, Sevilla y Osuna). **Parra M**, Sivianes N, Pérez L, Bernal S, Martín-Mazuelos E, Palomares J.C. XXIV Reunión de la SAMPAC (Sociedad Andaluza de Microbiología y Parasitología Clínica). Sevilla 10-11 de Noviembre de **2011**. Presentación poster.
3. Bioinformatic application to facilitate the genotypic determination of HIV-1 tropism. **Parra M**, Zakariya I, Córdoba J, Ferrero I, Martín-Mazuelos E, Palomares JC. 22nd ECCMID (European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases). Londres 31 Marzo-03 Abril **2012**. Presentación poster.
4. Aplicación bioinformática para la determinación genotípica del tropismo viral del VIH. **Parra-Sánchez M**, Zakariya-Yousef I, Luna-Peláez N, Ferrero I, Martín-Mazuelos E y Palomares JC. XVI Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Bilbao 9–11 de Mayo de **2012**. Presentación poster-oral.
5. Estudio de las discordancias entre algoritmos de interpretación genotípica del tropismo de VIH-1 en secuencias con inserciones o deleciones en la región V3. **Parra-Sánchez M**, Luna-Peláez N, Zakariya-Yousef I, Martín-Mazuelos E, Palomares JC. XVI Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Bilbao 9–11 de Mayo de **2012**. Presentación poster-oral.
6. Prevalencia de polimorfismos asociados a disminución de la actividad de Maraviroc. **Parra-Sánchez M**, Luna-Peláez N, Martín-Mazuelos E, Palomares JC. XVI Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Bilbao 9–11 de Mayo de **2012**. Presentación poster-oral.
7. Resistance to the most recent protease and non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors across HIV-1 non-B subtypes. Anta L, Blanco JL, Llibre JM, García F, Pérez-Elías MJ, Aguilera A, Pérez-Romero P, Caballero E, Vidal C, Cañizares A, Gutiérrez F, Dalmau D, Iribarren JA, Soriano V, de Mendoza C; on behalf of the Drug Resistance Platform of the Spanish AIDS Research Network. *J Antimicrob Chemother.* **2013**;68:1994-2002.
8. Prevalencia de resistencias primarias en pacientes naïve en el centro de referencia del Hospital de Valme (Sevilla) en los últimos 4 años. Zakariya-Yousef I, Bernal S, **Parra-Sánchez M**, Pérez L, Martín-Mazuelos E, Palomares JC. XVIII de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Valencia 9-11 de abril de **2014**.

1. Introducción.

1.1. Antecedentes históricos.

La primera documentación científica en la que se describe la enfermedad del SIDA se publica el 10 de diciembre de 1980 en el *New England Journal of Medicine*, describiendo una enfermedad nueva que al parecer estaba emergiendo en ese momento. Poco después, el Centro de Control de Enfermedades de los Estados Unidos de Norteamérica (CDC) alertó a la comunidad médica mundial de la posibilidad de una nueva entidad nosológica: el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (AIDS o SIDA), nombre acuñado a mediados de 1982.

En abril de 1983, Margaret Heckler (Secretaria de Salud de Estados Unidos) anunciaba el descubrimiento de un retrovirus causante del SIDA. Dicho hallazgo, conseguido por el grupo del Dr. Robert Gallo, se denominó en primera instancia Virus Linfotrópico de células T humanas tipo III (HTLV-III) (*Gallo et al. 1983*). Simultáneamente en Francia, ese mismo año, el grupo del Dr. Luc Montaigner, haría público el entonces denominado Virus Asociado a Linfadenopatía (LAV) (*Barré-Sinoussi et al. 1983*). Es de señalar que el hallazgo del Dr. Gallo lo hizo a partir de una muestra de tejido linfático que le envió el Dr. Montaigner. Meses después se demuestra que el HTLV -III y el LAV son el mismo y único virus y se decide que ambos grupos son los codescubridores del virus.

En mayo de 1986, un panel de expertos en virología, propone y acepta nombrar este virus como Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH). Este mismo año, se describe por primera vez en un grupo de prostitutas asintomáticas en Senegal un virus relacionado antigénicamente con el VIH y responsable de casos de SIDA en esa región. Se denominó VIH tipo 2 (VIH-2) para diferenciarlo del inicial, denominado VIH tipo 1. (*Clavel et al. 1986*).

1.2. El virus de la inmunodeficiencia humana: descripción y clasificación.

El VIH es un virus de ARN monocatenario que pertenece a la familia *Retroviridae*, subfamilia *Orthoretrovirinae*, del género *Lentivirus* y englobados dentro del grupo de *Lentivirus de primates*. La clasificación completa se detalla en la tabla 1.1.

Tabla 1.1. Clasificación de la familia Retroviridae. En negrita, retrovirus patógenos humanos (Fuente: ICTV database, Julio 2012). Nota: ICTV: International Committee on taxonomy of Viruses. (<http://ictvonline.org>). *: Especie tipo del género.

FAMILIA RETROVIRIDAE

SUBFAMILIA ORTHORETROVIRINAE

GÉNERO ALPHARETROVIRUS (9 especies)

Avian carcinoma Mill Hill virus 2
 *Avian leukosis virus
 Avian myeloblastosis virus
 Avian myelocytomatosis virus 29
 Avian sarcoma virus CT10
 Fujinami sarcoma virus
 Rous sarcoma virus
 UR2 sarcoma virus
 Y73 sarcoma virus

GÉNERO BETARETROVIRUS (5 especies)

Jaagsiekte sheep retrovirus
 Langur virus
 Mason-Pfizer monkey virus
 *Mouse mammary tumor virus
 Squirrel monkey retrovirus

GÉNERO DELTARETROVIRUS (3 especies)

*Bovine leukemia virus
Primate T-lymphotropic virus 1
Primate T-lymphotropic virus 2
Primate T-lymphotropic virus 3

GÉNERO EPSILONRETROVIRUS (3 especies)

*Walleye dermal sarcoma virus
 Walleye epidermal hyperplasia virus 1
 Walleye epidermal hyperplasia virus 2

GÉNERO GAMMARETROVIRUS (17 especies)

Chick syncytial virus
 Feline leukemia virus
 Finkel-Biskis-Jenkins murine sarcoma virus
 Gardner-Arnstein feline sarcoma virus
 Gibbon ape leukemia virus
 Guinea pig type-C oncovirus
 Hardy-Zuckerman feline sarcoma virus
 Harvey murine sarcoma virus
 Kirsten murine sarcoma virus
 Moloney murine sarcoma virus
 *Murine leukemia virus
 Porcine type-C oncovirus
 Reticuloendotheliosis virus
 Snyder-Theilen feline sarcoma virus
 Trager duck spleen necrosis virus
 Viper retrovirus
 Woolly monkey sarcoma virus

GÉNERO LENTIVIRUS (9 especies)

Bovine immunodeficiency virus
 Caprine arthritis encephalitis virus
 Equine infectious anemia virus
 Feline immunodeficiency virus
***Human immunodeficiency virus 1**
Human immunodeficiency virus 2
 Puma lentivirus
 Simian immunodeficiency virus
 Visna/maedi virus

SUBFAMILIA SPUMARETROVIRINAE

GÉNERO SPUMAVIRUS (6 especies)

African green monkey simian foamy virus
 Bovine foamy virus
 Equine foamy virus
 Feline foamy virus
 Macaque simian foamy virus
***Simian foamy virus**

1.3. Estructura del VIH-1.

El VIH-1 está formado por una partícula esférica de aproximadamente 100 nm. La membrana exterior del virus o envuelta viral es una bicapa lipídica (derivada de la célula huésped durante el proceso de salida de viriones por gemación) en la que se encuentran insertadas glicoproteínas, en 72 proyecciones externas y antígenos de histocompatibilidad de clases I y II derivadas de las células, formando un complejo proteico conocido como *env*. Estas proyecciones están constituidas por repeticiones de moléculas llamadas glicoproteína 120 (*gp120*), y tres moléculas llamadas glicoproteína 41 (*gp41*) que ancla la estructura en la envoltura viral.

Dentro de la envoltura viral se encuentra una matriz esférica intermedia que rodea a una cápside troncocónica interna, que contiene el genoma vírico y diversas proteínas esenciales. La cápside, compuesta de 2.000 copias de la proteína viral p24, rodea dos cadenas simples e idénticas de ARN de polaridad positiva no segmentado con un tamaño total aproximado de 9.8 Kb (*Briones et al. 2005*). El VIH tiene tres genes estructurales mayores (*gag*, *pol*, y *env*) que contienen la información necesaria para hacer la síntesis de proteínas estructurales de nuevas partículas víricas (Figura 1.1).

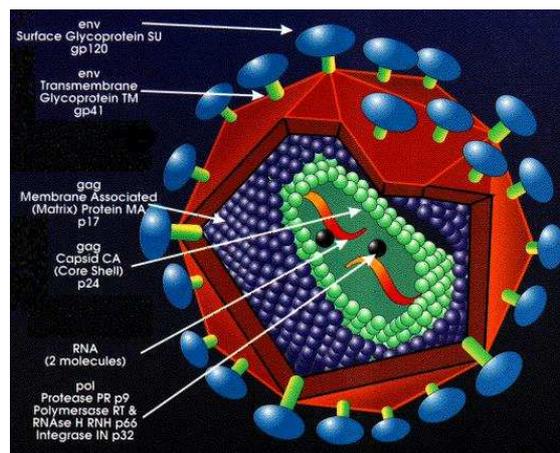


Figura 1.1. Estructura tridimensional del VIH. Adaptado de: <http://www.yale.edu/bio243/HIV/hivstructure.html>

El VIH cuenta además con dos reguladores (*tat* y *rev*) y cuatro accesorios (*nef*, *vpr*, *vpu* y *vif*; no esenciales *in vitro*), que contienen la información necesaria para producir las proteínas que controlan la capacidad infectiva del virus, producción de nuevas copias del virus o el desarrollo de la enfermedad. Además, en su forma de provirus, el genoma se encuentra flanqueado por unas secuencias repetidas o LTR (*Long Terminal Repeats*) que permiten la integración en el genoma celular. Dentro de estas secuencias se encuentran los elementos reguladores de la iniciación de la transcripción viral (Figura 1.2).

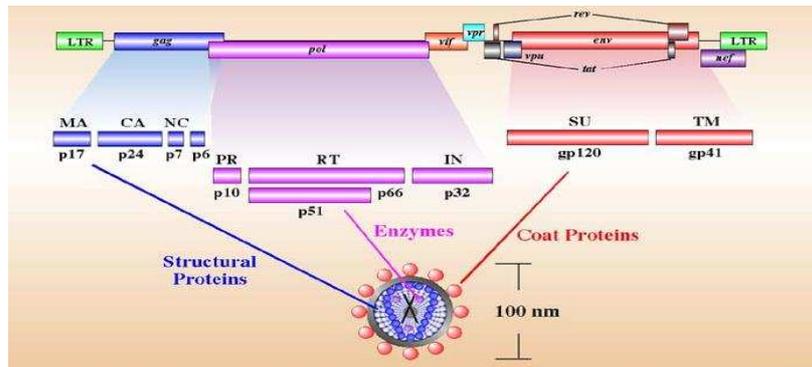


Figura 1.2. Organización del genoma del VIH-1. Adaptado de:
<http://www.stanford.edu/group/virus/retro/2005gongishmail/HIV.html>

En la siguiente tabla se resumen las características de los genes estructurales, reguladores y accesorios del VIH (Tabla 1.2).

Tabla 1.2. Genes codificados en el genoma del VIH.

Genes	Nombre	Precursor	Proteína	Localización y actividad descrita
Estructurales	gag	p55	p17	Proteína miristilada de la matriz vírica. Estructural.
			p24	Proteína de la cápside vírica. Estructural.
			p7	Proteína de la nucleocápside. Empaquetamiento del ARN vírico. Facilitación de la transcripción inversa (1).
			p6	Proteína de la nucleocápside. Conducción de Vpr al interior del virión (2). Encapsidación-liberación de viriones.
	Pol	p160	p10	Aspartilproteasa: procesamiento postraduccional de gag y gag-Pol.
			p50 (3)	Transcriptasa inversa: transformación del ARN vírico en ADN proviral.
			p15 (3)	RNasa H: eliminación del molde de ARN una vez transcurrida la transcripción inversa.
Env	gp160	gp120 (gp125 en VIH-2)	Glicoproteína de envoltura. Interacción virus - receptor CD4 y correceptores celulares.	
		gp41 (gp36 en VIH-2)	Glicoproteína transmembrana. Anclaje de gp120. Fusión de membranas vírica y celular.	
Reguladores	tat		Tat (p14)	Activador de la transcripción: síntesis ARNm.
	rev		Rev (p19)	Fosfoproteína. Exportación del ARN vírico: núcleo-citoplasma.
Accesorios	nef		Nef (p27)	Regulación negativa ante CD4 y MHC-I en membrana celular. Interferencia en la activación de linfocitos T. Estimulación de la infectividad de viriones.
	vpr (4)		Vpr (p15)	Transporte del Complejo de Preintegración al núcleo. Bloqueo del ciclo celular. Inducción de diferenciación celular.
	vpu (sólo en VIH-1)		Vpu (p16)	Bloqueo del CD4 en el retículo endoplásmico celular, evitando la interacción con gp120 de nueva síntesis. Incrementa la liberación de viriones de la célula infectada. Aumenta la susceptibilidad de las células infectadas por el VIH-1 a la muerte mediada por Fas.
	vif		Vif (p23)	Factor de infectividad viral. Proteína citoplasmática. Infectiosidad de viriones extracelulares. Impide la acción de APOBEC-3G

Nota: 1. Datos de Lapadat-Tapolsky et al. (1993).

2. Datos de Paxton et al. (1993).

3. Todas estas escisiones no siempre ocurren de manera eficiente. Aproximadamente el 50% de las transcriptasas inversas (p50) permanecen ligadas a la RNasa H (p15) formando un solo polipéptido (p65).

4. vpx, proteína de 12 kD, presente en VIH-2. Gen accesorio, homólogo de vpr. Relacionado con la patogenicidad del virus.

1.4. Ciclo biológico.

1.4.1. Entrada viral.

La primera etapa del proceso de entrada del virus consiste en la unión del virus a moléculas de membrana en determinados tipos celulares. Algunas de estas interacciones son inespecíficas (baja afinidad por el VIH), mientras que otras tienen mayor importancia patogénica (lectinas DC-SIGN y L-SIGN, expresadas en células dendríticas). La unión y fagocitosis del virus se produce por residuos de carbohidratos e integrinas (como ICAM-3) de la membrana de linfocitos. Tras la endocitosis y presentación de antígenos en el HLA-II. La alta afinidad de la unión del VIH a estas lectinas facilita e incrementa la infección de los linfocitos circundantes mediante varios mecanismos: concentración de partículas en estas estructuras, activación de linfocitos y la propagación a partir de células dendríticas infectadas. Todo esto explica la propagación del VIH y hace de las células dendríticas un reservorio donde la infección se establece y se transmite a los linfocitos CD4 (Alcamí, 2004).

1.4.2. Interacción con los receptores y entrada del virus en la célula.

La entrada del VIH en la célula se produce mediante la interacción con 2 tipos de receptores: el receptor CD4 y los receptores de quimiocinas. Aunque hay descritos varios tipos de estos receptores que pueden actuar como receptores virales, CCR5 (R5) y CXCR4 (X4) son los más importantes (González *et al*, 2010). La afinidad del virus por un tipo u otro de este tipo de receptores se ha definido como tropismo viral y está relacionado con la secuencia de aminoácidos y conformación de distintas regiones codificadas en la gp120, especialmente en la tercera región variable de la envuelta (V3). El uso de uno u otro correceptor define el tropismo de la cepa: cepas R5 con tropismo a macrófagos, cepas X4 con tropismo a células T y cepas dual-mixtas (R5X4) que pueden entrar en la célula utilizando cualquiera de los dos correceptores. (Figura 1.3)

Las cepas CCR5, o no sincitiales, están implicadas en la transmisión y etapas tempranas de la infección, por lo que no se detectan en estos estadios cepas X4. En las primeras etapas de la infección sólo se expresa el receptor CCR5 en la membrana, mientras que el receptor CXCR4 se encuentra internalizado. Durante el avance de la infección, se desarrollan cepas con tropismo X4 (sincitiales) o dual-mixto, relacionados con la depleción mayoritaria de linfocitos CD4 (López-Aldeguer *et al*, 2005).

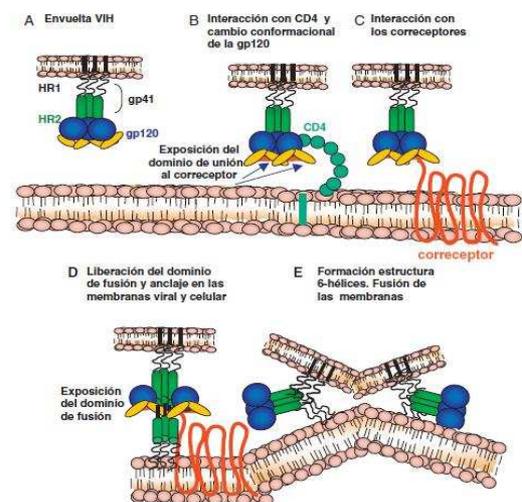


Figura 1.3. Esquema de la entrada del virus en la célula huésped.

Adaptado de: Alcamí *et al*. 2011.

En este proceso, la molécula gp120 experimenta un cambio conformacional al interactuar con CD4, produciéndose a continuación una segunda interacción con el receptor de quimiocinas CCR5 o CXCR4. Este doble reconocimiento de receptores induce la exposición de la región amino-terminal de gp41 que permite la fusión virus-célula y la entrada de la partícula vírica (Figura 3) (*Delgado et al. 2011*).

1.4.3. Internalización de la cápside y liberación del ARN viral.

El proceso de descapsidación del ARN viral se origina en el citoplasma celular, siempre que el virus escape a los mecanismos de bloqueo de la célula hospedadora. Este bloqueo se realiza por medio de TRIM5 α , APOBEC3G y tetherina, regulados positivamente por el interferón tipo I (activado por ARN o ADN virales). El VIH ha generado distintas estrategias que combina la mutación adaptativa de distintas proteínas virales con la generación de proteínas específicas que inhiben estos factores de restricción celular.

Brevemente, el VIH-1 evade la acción de TRIM5 α mutando residuos críticos en la proteína de la cápside (*Sastri et al. 2011*). En cuanto a la acción de APOBEC3G, el VIH-1, mediante *vif* (factor de infectividad viral), sintetiza la proteína Vif que se une a APOBEC3G en la célula productora de virus y lo dirige a la maquinaria de degradación del proteasoma (*Goila-Gaur et al. 2008*). Por otro lado, la tetherina es inhibida por la proteína Vpu. Estudios recientes han observado que este proceso es diferente entre los tres tipos de VIH-1: la tetherina inhibe únicamente el tipo M mientras que los tipos N y O no disponen de genes Vpu o Nef que bloqueen a la tetherina. Recientemente se ha demostrado que el tipo P tampoco puede inhibirla (*Sauter et al. 2012*). En estos tipos de VIH-1 deben existir mecanismos alternativos, o quizás el eficiente bloqueo mediado por tetherina de estos viriones, es la causa por la que estas variantes no se han extendido de forma pandémica como el tipo M del VIH-1 (*Neil et al. 2008* y *Douglas et al. 2010*).

1.4.4. Retrotranscripción, transporte e integración.

La liberación del ARN e inicio del escape a los mecanismos de restricción celular se produce en el citosol mediante la retrotranscripción del ARN viral llevado a cabo por la enzima transcriptasa inversa o retrotranscriptasa (RT). Esta enzima genera una doble hebra de ADN que duplica los LTR situados a ambos extremos del genoma proviral. Para la síntesis de la segunda cadena de ADN actúa la ribonucleasa H, que degrada parcialmente el molde de ARN original, generando así un ADN de doble cadena. Este ADN sintetizado se transporta al núcleo (mediado por Vpr y p17, conformando el complejo de pre-integración) mientras que Nef aumenta la eficiencia de retrotranscripción en el genoma celular mediante la acción de la integrasa viral constituyendo la forma proviral del VIH (*Schwartz et al. 1995* y *Agace et al. 2000*). Este proceso es dependiente de factores celulares inducidos por activación celular (*Coiras et al. 2009*) y en linfocitos CD4 en reposo, el genoma viral se transcribe a ADN de forma incompleta ya que no

se produce la finalización de la retrotranscripción y la integración a menos que la célula se active (*Zack et al. 1990*). Estas formas provirales no integradas pueden permanecer en el citosol celular hasta una semana, constituyendo un reservorio potencial del VIH como un marcador de infección celular reciente (*Chun et al. 1997*).

1.4.5. Replicación del VIH.

Una vez integrado el VIH, pueden darse tres fenómenos: latencia, replicación de forma controlada o replicación masiva.

El inicio de replicación conlleva la transcripción y síntesis del ARNm del VIH a partir del ADN proviral integrado en el genoma celular. Este proceso no depende de proteínas virales, sino de factores celulares que interaccionan con las secuencias reguladoras localizadas en las LTR (*Agace et al. 2000*). Entre estos factores, destaca NF-kB como principal elemento regulador de la transcripción del VIH en linfocitos CD4 a partir de su estado de latencia (*Alcamí et al. 1995*).

La transcripción completa del genoma viral es mediada por la proteína vírica Tat (en cooperación con NF-kB y Sp1), actuando como un *enhancer* que permite la elongación completa del ARN viral (*Gaynor et al. 1992*). El ARNm, sintetizado en un único transcrito, es transportado al citosol y allí procesado en transcritos de diferentes tamaños. Tanto el procesamiento como el transporte del ARNm está mediado por la proteína Rev. Así mismo, también está implicada en el proceso de ensamblaje de los ARNm con los polisomas (*Green et al. 1991*).

1.4.6. Formación y maduración de los viriones.

Finalizada la síntesis de todas las proteínas virales, éstas son procesadas antes de ensamblarse. En este proceso participan Vif, Vpu y la proteasa viral (*Emerman et al. 1998* y *Cullen et al. 1998*). La proteasa viral procesa los precursores proteínicos Gag y Gag-pol dando lugar a las proteínas de la nucleocápside, la transcriptasa inversa y la propia proteasa viral. El procesamiento de gp160 en sus productos (gp120 y gp41) lo realiza una proteasa celular.

La maduración final y el correcto ensamblaje de todas las proteínas virales ocurren al final del ciclo infeccioso, durante el proceso de gemación. Para ello, el nucleoide migra hacia la membrana celular y se recubre de la membrana lipídica y de glucoproteínas de superficie adheridas a ella. A continuación, la partícula viral madura se desprende por gemación, constituyendo una partícula viral madura (Figura 1.4).

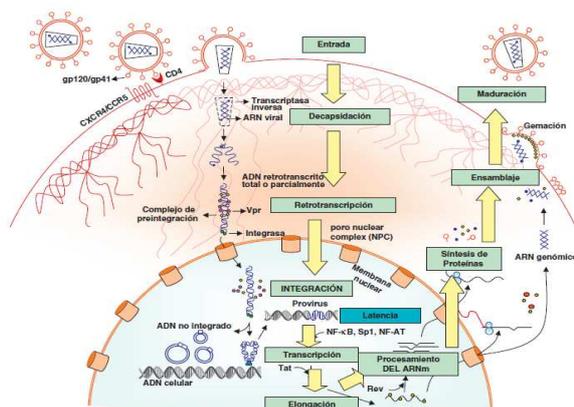


Figura 1.4. Ciclo biológico del VIH. Adaptado de: Alcamí et al. 2011.

1.5. Mecanismos de escape viral a la respuesta inmune.

1.5.1. Variabilidad genética.

Parte de la alta tasa de variabilidad del VIH se debe a la tasa de error en la transcripción llevado a cabo por la transcriptasa inversa, la cual introduce una sustitución por cada 10^{-3} - 10^{-4} nucleótidos por ronda de replicación con una elevada tasa de replicación (10^{9-10}). Esto da lugar a una gran proporción de virus defectivos, pero por otro lado se generan una gran diversidad de virus capaces de escapar al control de la respuesta inmunitaria específica (Wei et al. 2003 y Miedema et al. 2006).

Este fenómeno es destacable en el gen pol, el más conservado, donde la divergencia entre nucleótidos en subtipos VIH-1 oscila entre el 7-13% (llegando hasta un 25%) y entre cepas de un mismo individuo en el mismo momento puede oscilar alrededor del 2% (Figura 1.5) (Santos et al. 2011). El VIH-1 y el VIH-2 comparten un 60% de homología en la secuencia proteica del gen pol, y las estructuras de la retrotranscriptasa, proteasa e integrasa son relativamente similares en cuanto a la región catalítica (Hizi et al. 1991, Ohtaka et al. 2005 y Roquebert et al. 2008). Este dato es importante porque la historia natural, la transmisibilidad y respuesta al tratamiento son diferentes. En la variabilidad genética no sólo intervienen las mutaciones puntuales, también las duplicaciones, deleciones e inserciones, tanto por recombinación homóloga como no homóloga.

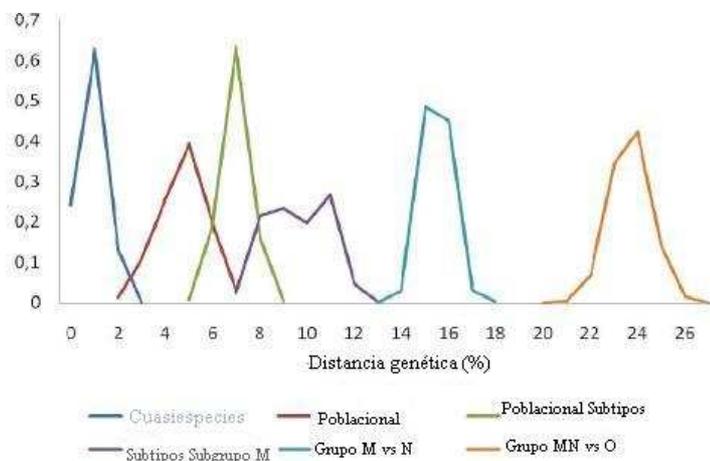


Figura 1.5. Distancia genética en el gen pol del VIH-1. Modificado de: Santos et al. 2011.

1.5.2. Enmascaramiento de los epítomos de neutralización.

El enmascaramiento se produce porque la envuelta viral es una estructura trimérica que oculta unos dominios altamente conservados. Estos epítomos pueden sufrir una glicosilación de los residuos aminoácidos reconocidos por los anticuerpos neutralizantes (*González et al. 2010*) lo que otorgan una gran flexibilidad y variabilidad estructural proporcionando una extraordinaria capacidad de escape.

1.5.3. Latencia, persistencia y reactivación.

La instauración del virus en los reservorios antes de que se desencadene la respuesta inmunitaria específica supone otro obstáculo para el control de la replicación viral ya que el virus se establece en los linfocitos infectados. Estudios previos (*García et al. 1999*) observaron que al interrumpir el TARGA en un paciente con viremia controlada durante años, en pocos días se producía un repunte de la carga viral a niveles similares a los previos al iniciar el TARGA. Por otro lado, estudios mediante técnicas ultrasensibles muestran que en todos los pacientes en TARGA se mantiene una replicación a bajo nivel (1-5 copias de ARN/ml) demostrando persistencia viral en determinados reservorios (*Palmer et al. 2008*).

1.5.4. Cinética de replicación. Definición de cuasiespecie.

La aplicación de modelos matemáticos han demostrado que diariamente se producen en un paciente VIH-1+ del orden de 10^9 a 10^{10} partículas virales, lo que conlleva la destrucción directa de entre 10^7 a 10^8 linfocitos CD4 (*Ho et al. 1995* y *Ho et al. 1996*).

Todos estos fenómenos provocan una elevada heterogeneidad genética que permite que en la población de virus de un mismo individuo coexistan genomas relacionados entre sí, pero no idénticos, conocidos como *cuasiespecies víricas*. Evolutivamente, la existencia de cuasiespecies se ha originado por presión selectiva, competencia y selección de genomas mejor adaptados a la presión ejercida por el sistema inmune o la presencia de fármacos (*Domingo et al. 1997* y *Domingo et al. 2001*).

En un individuo infectado, cuando se realiza un estudio genotípico de resistencias a antirretrovirales, observaremos una secuencia promedio o consenso, pero esta secuencia mayoritaria no siempre coincide con la secuencia promedio o de la población. Las cuasiespecies permanecen a niveles bajos dentro de la población global (*variantes minoritarias*) hasta que surge una presión selectiva que hace que su número aumente. Es conocido que la presión selectiva ejercida por los fármacos sustituirá a unas subpoblaciones sensibles por otras resistentes, pero sin eliminar por completo las primeras, que permanecerán en algún reservorio.

1.6. Clasificación del VIH.

1.6.1. Tipos de VIH.

Actualmente hay descritos dos tipos de virus de la inmunodeficiencia humana: VIH-1 y VIH-2. El más extendido a nivel mundial es el VIH-1, que a finales de 2012, se estimaba hubiera 35.3 millones [32.2–38.8] infectados por este tipo (*UNAIDS Report 2013*) (Figura 1.6). El VIH-2 tiene una distribución más limitada, siendo endémica en regiones del este de África, donde puede llegar a tener una prevalencia del 10% (*Poulsen et al. 1993* y *Reeves et al. 2002*). A nivel mundial, se han descrito casos en Norte América y Europa, pero todos los casos reportados se trataban de inmigrantes o nativos de regiones endémicas. Esta limitación en la infección por el VIH-2 se debe a que el ratio de infectividad del VIH-1/VIH-2 se ha estimado en un valor comprendido entre 3.40 y 3.86, de ahí la mayor distribución a nivel mundial del tipo 1 (*Gilbert et al, 2003*).

En España, hasta diciembre de 2010, se habían comunicado 244 casos de infección por VIH-2. La mayoría eran varones (66%) y originarios de África Subsahariana (73%) (*Treviño et al, 2012*).



Figura 1.6. Estimación mundial de personas infectadas con VIH-1.

Fuente: <http://www.unaids.org>

El VIH se originó mediante transmisión múltiple zoonótica desde el virus de la inmunodeficiencia de simios (SIV) hasta humanos en África Central y Oeste. Actualmente más de 40 especies de primates son portadores de infección por el SIV específico de cada especie (*Aghokeng et al. 2010*) y existe una correlación geográfica entre el SIV de chimpancés (*Pan troglodytes troglodytes*, SIVcpz) y el mangabí gris (*Cercocebus atys*, SIVsm) con el VIH humano (*Plantier et al. 2009*, *Peeters et al. 2008* y *Van Heuverswyn et al. 2007*).

1.6.2. Grupos y subtipos de VIH.

El VIH-1 se clasifica en 4 grupos: M (Main), N (New), O (Outlier) y P (Primate) (Figura 1.7). Por otro lado, el VIH-2 se ha clasificado en 8 grupos: A–H.

Dentro del VIH-1 la prevalencia de cada grupo es muy variable siendo el grupo M el único grupo de VIH considerado pandémico (aproximadamente 33 millones de infectados). El grupo O lo encontramos casi exclusivamente en África Central y Oeste, destacando Gabón, Guinea Ecuatorial y Camerún, cuya prevalencia es muy baja (1.1%). El grupo N se reduce a un pequeño grupo de personas en Camerún (apenas 13 individuos, lo que supone una prevalencia del 0.1%). En 2009 se definió un nuevo grupo de VIH-1, el grupo P, que se ha identificado en 2 individuos en la ciudad de Yaoundé (Camerún) hasta la fecha (prevalencia de 0.06%). (Simon et al. 1998, Ayouba et al. 2001, Roques 2004, Plantier et al. 2009 y Vallari et al. 2011).

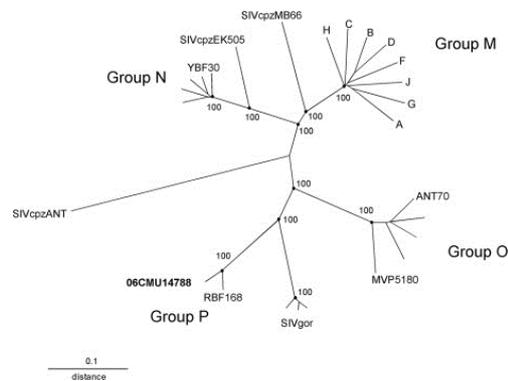


Figura 1.7. Árbol filogenético indicando las distancias entre subtipos y grupos de HIV-1 y SIVgor. Para enraizar el árbol se ha usado una secuencia de SIV de chimpancé (SIVcpzANT). Modificado de Vallari et al. 2011

1.6.3. Formas circulantes recombinantes (CRFs).

El proceso de recombinación en el VIH-1 se produce in vivo como consecuencia de la infección simultánea del individuo por dos variantes del virus (coinfeción), o en distinto momento (superinfección o infección por VIH en un paciente previamente infectado) (Gottlieb et al. 2004 y Fang et al.2004).

Este fenómeno genera virus que no pueden ser considerados subtipos puros sino recombinantes entre dos o más subtipos, por lo que se les conoce como recombinantes o mosaico (Figura 1.8).

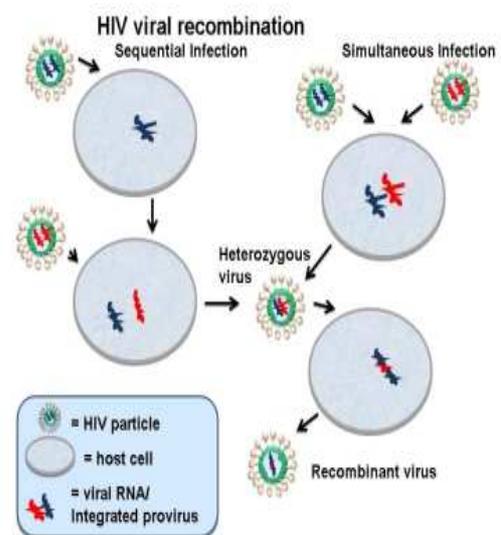


Figura 1.8. Coinfección, superinfección y recombinación en la infección por VIH. Modificado de <http://www.itg.be/itg/>

1.6.4. Distribución geográfica del VIH-1.

La distribución mundial del VIH-1 se describió en el apartado 1.6.2 y en más detalle en la figura 1.10.

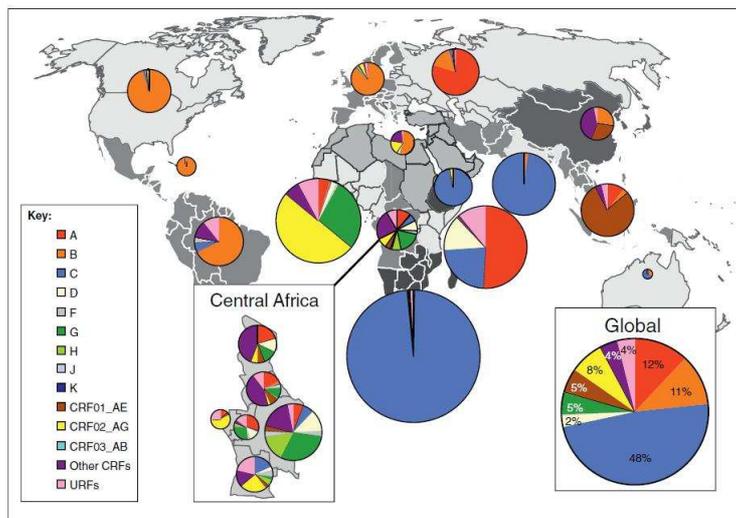


Figura 1.10. Distribución mundial del VIH-1. Modificado de Hamelaar et al. 2012.

La distribución mundial de los CRFs se describe en la tabla 1.3.

Tabla 1.3. Distribución geográfica de los CRFs. En negrita los analizados en este estudio. Modificado de Hamelaar et al. 2012.

CRF	Distribución geográfica	CRF	Distribución geográfica	CRF	Distribución geográfica	CRF	Distribución geográfica
CRF01_AE	Sudeste Asiático, Este de Asia, África Central	CRF15_01B	Tailandia	CRF29_BF	Brasil	CRF43_02G	Arabia Saudí
CRF02_AG	África Occidental, África Central, MENA	CRF16_A2D	Kenia, Argentina, Corea del Sur	CRF30_0206	Niger	CRF44_BF	Chile
CRF03_AB	Este de Europa and Central Asia	CRF17_BF	Sudamérica	CRF31_BC	Brasil	CRF45_AKU	África Central
CRF04_cpx	Grecia, Chipre	CRF18_cpx	Cuba, África Central	CRF32_06A1	Estonia	CRF46_BF1	Brasil
CRF05_DF	África Central, Europa	CRF19_cpx	Cuba, África Central	CRF33_01B	Malasia, Singapur, Indonesia	CRF47_BF	España
CRF06_cpx	África Central, África Oriental, Estonia	CRF20_BG	Cuba	CRF34_01B	Tailandia	CRF48_01B	Malasia
CRF07_BC	China	CRF21_A2D	Kenia	CRF35_AD	Afganistán, Irán	CRF49_cpx	Gambia
CRF08_BC	China	CRF22_01A1	Camerún	CRF36_cpx	Camerún	CRF50_A1D	Reino Unido
CRF09_cpx	África Occidental, África Central	CRF23_BG	Cuba	CRF37_cpx	Camerún, Mozambique	CRF51_01B	Singapur
CRF10_CD	Tanzania	CRF24_BG	Cuba	CRF38_BF1	Uruguay	CRF52_01B	Sudeste Asiático
CRF11_cpx	África Central	CRF25_cpx	África Central, Arabia Saudí	CRF39_BF	Brasil	CRF53_01B	Malasia
CRF12_BF	Sudamérica	CRF26_AU	RD Congo	CRF40_BF	Brasil	CRF54_01B	Malasia
CRF13_cpx	África Central	CRF27_cpx	RD Congo	CRF41_CD	No definido	CRF55_01B	China
CRF14_BG	España	CRF28_BF	Brasil	CRF42_BF	Luxemburgo		

Durante la redacción de esta tesis se incluyeron, pendientes de confirmación, los siguientes CRF: CRF57_BF (China), CRF59_01B (China), CRF61_BC (China), CRF63_02A1 (Siberia, Rusia) y CRF65_cpx (China).

1.6.5. Importancia de los subtipos de VIH-1 en el diagnóstico y tratamiento.

La diversidad del VIH ha tenido un fuerte impacto en el diagnóstico ya que los equipos comerciales han tenido que ser capaces de detectar todas las variantes del virus. Las pruebas serológicas de cribado (actualmente de cuarta generación) basadas en anticuerpos dirigidos contra proteínas estructurales (p24gag y gp41env) y la mayoría de los métodos de enzimoinmunoensayo poseen una alta sensibilidad y especificidad frente cepas del grupo M de VIH-1 y VIH-2, pero aún existe cierta dificultad para identificar sujetos con infección reciente por subtipos no B poco frecuentes (URFs y CRFs). Esto es debido a que los antígenos empleados comercialmente se basan en cepas del subtipo B.

Las pruebas de diagnóstico molecular se han basado en cebadores genéricos para detectar y determinar la carga viral plasmática (CVP) causada por todos los subtipos del VIH-1. Para la medición de la CVP se han utilizado clásicamente tres pruebas comercializadas: Amplicor HIV-1 (Roche Diagnostics), Versant o método del DNA ramificado (b-DNA) (Siemens Healthcare) y NucliSens (bioMerieux), que utiliza el sistema NASBA (*nucleic acid sequence based amplification*). Durante los últimos años se han desarrollado pruebas basadas en real time PCR (RT-PCR). En nuestro país hay comercializadas dos de ellas: COBAS TaqMan (Roche Diagnostics) y RealTime HIV-1 (Abbott Molecular). Ambas se basan en la amplificación y la detección del ARN viral. El rango de detección es desde 50 hasta 1 millón de copias/mL (RealTime HIV-1) y desde 20 hasta 10 millones de copias/mL (TaqMan) (*Schumacher et al. 2007 y Foulongne 2006*).

En lo referente al tratamiento antirretroviral, los estudios de resistencia a los antirretrovirales (genotípicos o fenotípicos) presentan algunos problemas de detección de resistencia en algunos subtipos y CRFs. En este apartado cabe destacar la importancia de subtipar correctamente la cepa infectante, ya que algunas herramientas disponibles online están basadas principalmente en subtipos B (*Yebra et al. 2011*).

En cuanto al diseño de vacunas frente al VIH tiene objetivo una vacuna que brinde protección frente a todas las cepas del VIH-1, para lo cual se requieren preparados multivalentes. Para ello, datos recientes sugieren que las relaciones evolutivas del VIH podrían ser de mayor utilidad que las consideraciones regionales en términos de diseño de vacunas. Por este motivo, se ha propuesto el uso de secuencias de consenso o antecesoras de un subtipo específico con la finalidad de minimizar las diferencias genéticas entre las cepas de las vacunas y las cepas contemporáneas. Este enfoque potencialmente podría incrementar la reactividad cruzada y la amplitud de respuesta de una vacuna en relación con el uso de una única cepa (*Lal et al. 2005*).

1.7. Tratamiento antirretroviral.

Hasta la fecha, la terapia antirretroviral agrupa un arsenal de 23 fármacos comercializados (solos o en combinación con otros) dirigidos contra las enzimas del VIH: transcriptasa inversa (RT), proteasa, integrasa y antagonistas del receptor CCR5 (Figura 1.11) (tabla 1.4). La aparición de resistencias frente a los inhibidores nucleósidos de RT (ITIAN), inhibidores no nucleósidos (ITINAN) e inhibidores de proteasa (IP) es causa y consecuencia del fracaso del tratamiento virológico y de supresión viral incompleta.

Figura 1.11. Antirretrovirales y sus dianas.
Modificado de De Clercq, 2007.

El objetivo del tratamiento actual es la supresión de la replicación viral para conseguir una carga viral indetectable en plasma. Según el panel de expertos y las guías nacionales e internacionales, esto se puede conseguir en pacientes naïve mediante el uso de la terapia triple, es decir, mediante la combinación de tres fármacos que no presenten resistencia cruzada entre sí para evitar la rápida aparición de mutaciones asociadas a resistencia a estos fármacos.

Estos fármacos se clasifican en 6 clases o familias: los inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos/nucleótidos (ITIAN), los inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleótidos (ITINAN), los inhibidores de la proteasa (IP), los inhibidores de la fusión (IF), los inhibidores del correceptor CCR5 (IncCCR5) y los inhibidores de la integrasa (InInt).

Recientes estudios indican que el subtipo viral puede influir en la eficacia del tratamiento y que la existencia previa de mutaciones o polimorfismos o rápida selección de estas podrían disminuir la eficiencia de los antirretrovirales.

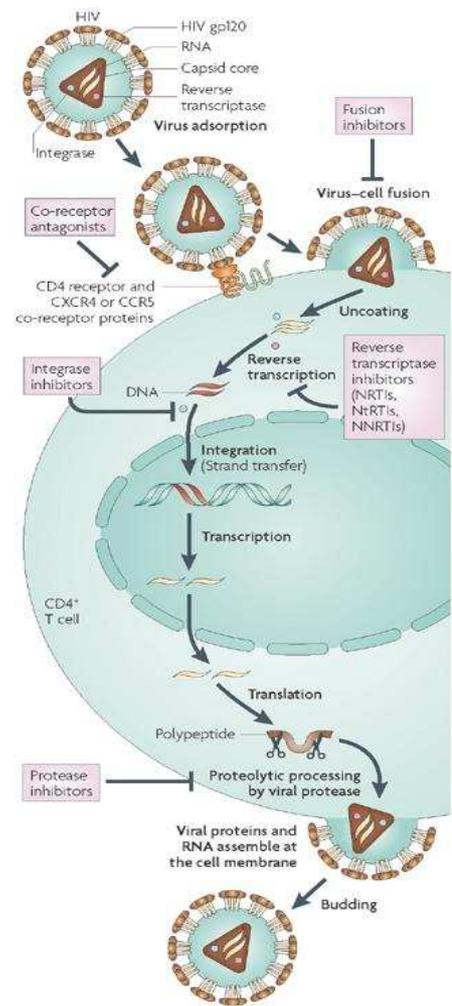


Tabla 1.4. Tratamientos antirretrovirales aprobados hasta la fecha para su uso, año de aprobación por la FDA y familia a la que pertenece.

Año	Fármaco	Familia	Año	Fármaco	Familia	Año	Fármaco	Familia
1987	AZT	NRTI	1997	DLV	NNRTI	2003	T20	IF
1991	DDI	NRTI	1997	NFV	IP	2005	TPV	IP
1992	DDC	NRTI	1998	ABC	NRTI	2006	DRV	IP
1994	D4T	NRTI	1998	EFV	NNRTI	2007	MRV	CCR5
1995	3TC	NRTI	1999	AMP	IP	2007	RAL	II
1995	SQV	IP	2000	LPV	IP	2008	ETR	NNRTI
1996	NVP	NNRTI	2001	TDF	NRTI	2011	RPV	NNRTI
1996	IDV	IP	2003	FTC	NRTI	2012	GS 9350*	IP
1996	RTV	IP	2003	ATV	IP	2012	EVG#	II

Nota: ddC, IDV (indinavir), DLV (delavirdina) o (NFV) Nelfinavir se han retirado del mercado o han caído en desuso debido a su alta toxicidad. *Cobicistat (potenciador como RTV) aprobado por la FDA en Agosto 2012. #Elvitegravir (inhibidor de la integrasa). Comercializado junto a GS 9350, FTC y TDF en un único comprimido (Stribild®). Dolutegravir (DTG), nuevo inhibidor de la integrasa, ha sido aprobado por la EMEA en 2013 pero no se espera su comercialización en España hasta octubre de 2014.

1.7.1. Inhibidores de la transcriptasa inversa.

La transcriptasa inversa o retrotranscriptasa (RT), es una de las enzimas claves dentro del ciclo biológico del VIH. Se encarga de la sintetización de ADN a partir de una cadena de ARN (actividad ADN polimerasa ARN-dependiente con actividad ARNasa H).

La proteína es un heterodímero formado por dos subunidades: p51 y p66. La primera de ellas engloba los primeros 440 aa del gen y no tiene actividad enzimática. Su función es estabilizar y aumentar la eficacia del proceso de retrotranscripción funcional. La subunidad p66 la conforman 560 aa del gen de la RT y engloba la región activa de la enzima. Está constituida por tres subdominios, uno que englobaría la cadena de ADNc, otro con actividad ARNasa y el subdominio de conexión (Figura 1.12).

Al ser una enzima imprescindible dentro del ciclo del virus, es una de las dianas más usadas en las terapias antirretrovirales. Los inhibidores de la RT se clasifican en dos categorías: los inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos (ITIAN o NRTI) y los no análogos de nucleósidos (ITINAN o NNRTI). Los inhibidores nucleosídicos son análogos de los nucleósidos usados en el proceso de la transcripción del ADN y actúan como terminadores de la cadena que se está sintetizando. Los análogos no nucleosídicos son un grupo bioquímicamente diverso que inhibe no competitivamente la polimerización del ADN.

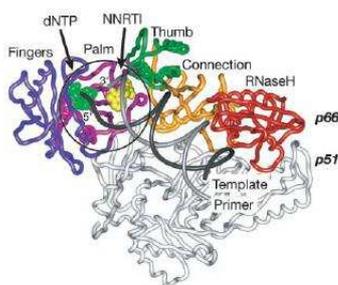


Figura 1.12. Modelo tridimensional de la RT. Modificado de Pata et al. 2004.

1.7.1.1. Inhibidores de la RT análogos de nucleósidos (ITIAN).

Actualmente encontramos 6 fármacos comercializados: zidovudina (AZT), didanosina (ddI), estavudina (D4T), lamivudina (3TC), emtricitabina (FTC) y abacavir (ABC). En este mismo grupo se clasifica el tenofovir (TDF), que no es un nucleósido sino un nucleótido pero que estructuralmente es similar a los anteriores.

- Análogos de Timidina: Zidovudina (AZT) y Estavudina (d4T). Ambos casi en desuso por su toxicidad.

- Análogos de Citosina: Lamivudina (3TC), Emtricitabina (FTC) y Zalcitabina (ddC). El 3TC y el FTC usados frecuentemente en combinación. El ddC prácticamente no se usa.

- Análogos de Guanosina: Abacavir (ABC): Uso muy frecuente. Antes de su uso es necesario el estudio genotípico del alelo HLA B*5701 asociado a una reacción de hipersensibilidad (fiebre, rash cutáneo, fatiga, náusea...). Las personas portadores de este alelo no pueden usar ABC. La prevalencia de este alelo en la cohorte española está próxima al 6% (Arrizabalaga et al. 2009).

- Análogos de Adenosina: Didanosina (ddI) y Tenofovir (TDF). El TDF muy usado actualmente. El ddI en desuso.

1.7.1.2. Inhibidores de la RT no análogos de nucleósidos (ITINAN).

La principal diferencia con respecto al grupo anterior es que no necesitan ser modificados previamente por enzimas celulares. Actúan por unión no competitiva a un bolsillo hidrofóbico de la región catalítica en la subunidad p66 provocando un cambio conformacional en su estructura impidiendo tanto la colocación del molde y su iniciador como su orientación con respecto al centro catalítico. Este grupo se ha descrito como no activos frente a cepas del grupo O de VIH-1 y VIH-2. En cuanto al resto de subtipos de VIH-1 son activos, aunque se pueden encontrar diferencias de sensibilidad entre subtipos.

Dentro de esta familia encontramos:

- Nevirapina (NVP): Primer ITINAN comercializado en España. Cada vez se usa menos debido a su baja barrera genética y la rápida aparición de cepas resistentes.
- Efavirenz (EFV): Uso extendido, tanto individualmente como combinado junto a FTC y TDF (Atripla®). Resistencia cruzada con NVP.
- Etravirina (ETR): ITINAN de segunda generación con una alta barrera genética y eficaz frente a mutaciones de resistencia a los otros fármacos de este grupo, como K103N y Y181C.
- Rilpivirina (RPV): nuevo ITINAN de segunda generación aprobado en 2011 que al igual que ETR presenta una alta barrera genética. Se comercializa tanto en comprimidos individuales como combinado junto a FTC y TDF (Eviplera®).

1.7.2. Inhibidores de la proteasa (IPs).

La proteasa del VIH es una aspartil-proteasa codificada por el gen pol que codifica una proteína de 99 aa muy conservada entre los distintos subtipos formando una molécula homodimérica que presenta una hendidura o dominio central activo (Figura 1.13). Esta enzima actúa sobre dos proteínas virales precursoras (Gag y Gag–Pol) dando lugar tres proteínas mayores: p24, p17 y p7 que conforman parte del core del virus, y tres proteínas pequeñas: p6, p2 y p1 con actividad funcional durante el proceso de exportación viral. La actividad enzimática sobre la poliproteína Gag–Pol produce las proteínas con actividad enzimática implicadas en el ciclo del virus: transcriptasa inversa, integrasa y la misma proteasa.

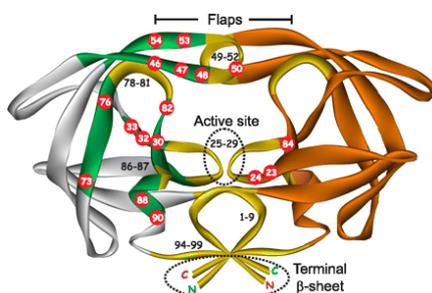


Figura 1.13. Modelo tridimensional de la proteasa. Modificado de Davis et al. 2012.

Los primeros IPs comercializados tenían una barrera genética baja (resistencias a partir de 2-3 mutaciones) como fueron Saquinavir (SQV) e Indinavir (IDV), actualmente en desuso. Posteriormente se aprueba el uso de Ritonavir (RTV), usado como potenciador (inhibe el complejo enzimático P450 permitiendo mantener unos niveles estables de los IPs en sangre). Los siguientes en aparecer fueron: Nelfinavir (NFV) permitido también en uso pediátrico (hoy en desuso por toxicidad), Amprenavir (AMP, ya en desuso), Lopinavir potenciado con Ritonavir (LPV/r), Atazanavir (ATV), Tipranavir (TPV) y Darunavir (DRV). Estos dos últimos presentan una gran barrera genética, pero ha sido DRV el que se ha impuesto claramente frente a TPV. Hoy día, los IPs más usados son ATV y DVR.

1.7.3. Inhibidores de la fusión.

A los ya comentados receptores CCR5 y CXCR4, hay que incluir a CD4 (receptor de proteína de las células T auxiliares), gp120 y gp41. Estas dos últimas estrechamente relacionadas con CCR5 y CXCR4.

Actualmente existen dos agentes inhibidores de la entrada autorizados:

- Enfuvirtida (ENF, T20). Su unión a gp41 (regiones HR1 y HR2) interfiere la aproximación de las dos membranas impidiendo la fusión entre virión y célula. Es un péptido de 36 aa derivado de la secuencia HR2 de gp41 (Figura 1.14). No tiene actividad frente a cepas de VIH-2. En desuso debido a su forma de administración (inyecciones subcutáneas).

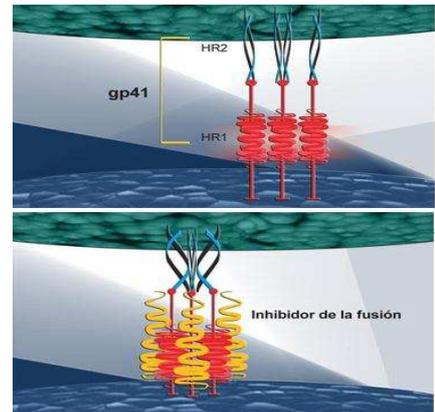


Figura 1.14. Estructura de las regiones HR1 y HR2 de gp41 (arriba) y mecanismo de acción de ENF (abajo).

- Maraviroc (MRV). Antagonista de los receptores de quimiocinas o inhibidor de CCR5. Impide la interacción con la gp120 del virión. Se requiere realizar un estudio previo de determinación del tropismo vira y que el virus sea CCR5 trópico para su uso. En caso de cepas X4 trópicas o dual mixtas (R5/X4) no debe usarse.

1.7.4. Inhibidores de la integrasa.

Se trata de una proteína de 288 aa constituida por 3 dominios: un dominio N-terminal (residuos 1-50), un dominio central o catalítico (residuos 50- 212) y un dominio C-terminal (residuos 212-288). Es en la zona catalítica donde se concentran las mutaciones de resistencia a estos fármacos. Hay 3 fármacos comercializados o próximos a su comercialización:

- Raltegravir (RAL), el primero en comercializarse. Eficaz tanto en pacientes naïve como en terapia de rescate. Su alto precio limita su uso, por lo que no se recomienda como terapia inicial.

- Elvitegravir (EVG), recientemente aprobado por la FDA coadministrado con GS-9350 (Cobicistat), FTC y TDF en un único comprimido (Stribild®). Presenta resistencia cruzada con RAL.

- Dolutegravir (DGV), aprobado y comercialización en 2014. No presenta resistencia cruzada a los anteriores. Recientemente se ha probado su no inferioridad con raltegravir en pacientes pretratados pero naïve para inhibidores de la integrasa (Pozniak et al. 2013).

1.7.5. Nuevas moléculas en estudio.

Actualmente encontramos nuevos fármacos en diferentes etapas de ensayo clínico cuyo fin es modificar y/o aumentar el perfil de resistencias actual, la simplificación del tratamiento para aumentar la adherencia y la reducción de toxicidad. Algunos de los que se encuentran en fases más desarrolladas se resumen en la tabla 1.5.

Tabla 1.5. Resumen de algunos antirretrovirales en fases avanzadas de estudio.

Fuente: <http://aidsinfo.nih.gov/> y Menendez-Arias 2013.

Familia	Nombre	Compañía	Fase	Familia	Nombre	Compañía	Fase
ITIAN	Amdoxovir (DAPD)	RFS Pharma	II	Integrasa	Dolutegravir (S/GSK1249572)	ViiV Healthcare	III
	Apricitabine (AVX-754)	Shire Pharmaceuticals	II/III		S/GSK1265744 (GSK-744)	Shionogi-GlaxoSmithKline	IIb
	Elvucitabine (ACH-126, Fd4C)	Achillion	II		MK-2048	Merk	II
	Festinavir (OBP-601, d4T derivado)	Bristol-Myers Squibb	IIb	PRO-140 (anticuerpo bloqueador CCR5)	Progenics	II	
	Fosalvudine (alovudina precursor)	Heidelberg Pharmaceuticals	II	Ibalizumab (TNX-355, TMB-355; anticuerpo bloqueador CD4)	Tanox / Genentech	II	
	Racivir	Pharmasset	II	BMS-663068 (bloqueador gp120)	Bristol-Myers Squibb	II	
ITINAN	BILR-355/r BS	Boehringer Ingelheim	II	Inhibidor entrada	INCB-9471 (bloqueador CCR5)	Incyte	II
	Calanoline A	Sarawac Medichem Pharm	II		PF-232798 (bloqueador CCR5)	ViiV Healthcare	II
	GSK-2248761 (IDX899)	ViiV Healthcare	II		SP-01A	Samantian Pharm	II
	MIV-150	Medivir & Chiron	II		TAK-652-Ceniciviroc (bloqueador CCR5)	Tobira (licensed from Takeda)	II
	RDEA-806	Ardea	II		AMD-70 (bloqueador CXCR4)	Genzyme Corporation	II
	UK-435061	ViiV Healthcare	III		Vicriviroc (bloqueador CCR5)	Schering-Plough/Merck	II
	TMC-120 (Dapivirine)	Janssen R&D	II				
	Lersivirine*	ViiV Healthcare	IIb				

Nota: * detenido en fase IIb en Febrero de 2013. En paréntesis nombre precomercial y/o actividad.

1.7.6. Combinación de antirretrovirales aprobados y comercializados.

En la actualidad se dispone de cuatro combinaciones que incluyen análogos de nucleósido y nucleótido en combinación: ABC+3TC (*Kivexa*®), TDF+FTC (*Truvada*®), AZT+3TC (*Combivir*®) y AZT+3TC+ABC (*Trizivir*®). Estos compuestos deben usarse siempre en combinación con un antirretroviral de otra familia para constituir un triple régimen que permita un éxito virológico a largo plazo. *Trizivir* está reservado para pacientes en los que no es posible el uso de análogos ni inhibidores de la proteasa.

Otras combinaciones de fármacos comercializadas incluyen inhibidores de la transcriptasa inversa no nucleósidos en combinación con análogos de nucleósidos y nucleótidos, como son los casos de TDF+FTC+EFV (*Atripla*®) y el recientemente aprobado TDF+FTC+RPV (*Eviplera*®) (*De Clercq 2012*).

La última combinación aprobada en agosto de 2012 por la FDA y recientemente comercializada es la combinación EVG/COBI/FTC/TDF (*Stribild*®) con la novedad que incluyen el nuevo potenciador Cobicistat y un nuevo inhibidor de la integrasa (Elvitegravir) que puede usarse como tratamiento de inicio (*de Jesús et al. 2012*).

1.8. Definición de fracaso virológico.

La supresión virológica se define como el mantenimiento de la carga viral plasmática (CVP) por debajo de los niveles detectables (<50 copias/mL o <20copias/mL, según técnica utilizada). Se considera fracaso virológico cuando se obtienen dos CVPs mayores a 20-50 copias/mL a partir de la semana 24 del inicio del TAR o si tras alcanzar CVP indetectable, vuelve a ser detectable en dos determinaciones consecutivas. Se ha descrito que valores de CVP entre 200 y 1.000 copias/mL están asociados estrechamente con la selección de mutaciones de resistencia por lo que se consideran fracasos virológicos (*Taiwo et al. 2011*). Por otro lado, existen factores que pueden conducir a un fracaso virológico que dependen directamente del paciente (adherencia), el TAR usado (absorción y/o interacción con otros fármacos) y la cepa del virus.

En determinados pacientes con CVP controlada se han observado brotes transitorios de viremia de bajo nivel o *blips* (*Havliv et al. 2001*) que vuelven espontáneamente a ser indetectables sin ningún cambio en el tratamiento. Estos valores habitualmente son inferiores a 200 copias/mL. La mayoría de ellos no se relacionan con fallo virológico (*Lee et al. 2006*) pero en algunos casos se han observado la aparición de mutaciones de resistencia (*Macias et al. 2005*).

1.9. Resistencia a los antirretrovirales.

La resistencia al tratamiento antirretroviral se define como la disminución de la sensibilidad del virus a los efectos inhibidores que poseen los ARVs y que se traduce como un aumento de la CVP originando un fracaso virológico. La aparición de resistencias se debe a la propia dinámica viral del VIH donde la mayoría de estas mutaciones no influyen en la susceptibilidad de los fármacos, pero algunas pueden dar lugar a una disminución de la actividad o resistencia al fármaco. Este fenómeno da lugar a *variantes virales o cuasiespecies* que pueden presentar alguna de estas mutaciones. Por último, otro factor influyente en la aparición de estas mutaciones es la supresión viral incompleta que desencadena la selección de cuasiespecies con mutaciones preseleccionadas, que sometidas a presión selectiva por estos ARVs se convertirían en la población viral mayoritaria.

Dentro del marco de las resistencias, existen mutaciones como M184V que disminuyen la capacidad replicativa del virus y la capacidad de disminución de linfocitos, perjudicando por tanto al fitness viral, en comparación con la *cepa salvaje o wild type*.

1.9.1 Barreras genéticas de resistencia.

La concentración inhibitoria de un fármaco necesaria para inhibir el 50% de la replicación viral (IC50) dependerá de cuanto más resistente sea el virus. Existen fármacos con baja barrera genética en los que la presencia de una o dos mutaciones pueden elevar considerablemente el valor de IC50, como por ejemplo 3TC, NVP, EFV o RAL. Mientras que AZT y los IPs sin potenciar presentan una barrera intermedia. Otros fármacos como el resto de ITIANs, ETR, RPV y los IP/r presentan una barrera genética elevada (Figura 1.15).

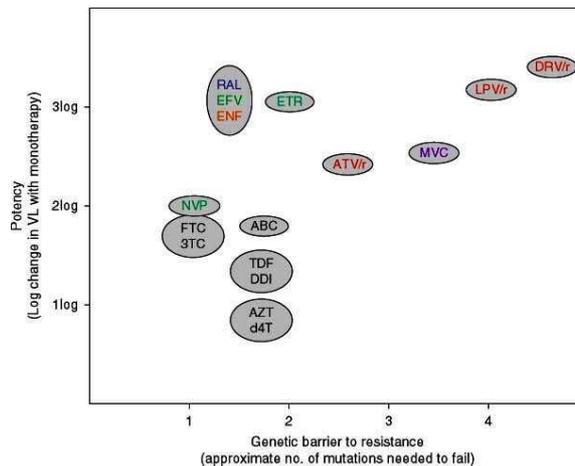


Figura 1.15. Representación de la barrera de diferentes fármacos y su potencia (medida en logaritmo de la carga viral en monoterapia). (Adaptado de Tang et al, 2012). Nota: VL=carga viral.

1.9.2. Resistencia cruzada y multiresistencia.

Las mutaciones que van emergiendo durante el tratamiento con un ARV pueden causar resistencia cruzada a otro fármaco de la misma familia que el paciente no haya recibido nunca. Por ejemplo, K103N en la RT produce resistencia cruzada a los ITIAN de primera generación (NVP y EFV), pero no afecta a los de segunda generación (ETV y RPV).

El complejo Q151L/M (A62V, V75I, F77L, F116Y y Q151L/M) está asociado con la administración de regímenes que contengan d4T o ddI. La prevalencia de este complejo es poco frecuente en VIH-1 pero puede conferir resistencia a todos los ITIAN (*Schmit et al. 1996*). En VIH-2 se observa una frecuencia mayor tanto de este complejo como de la mutación K65R (*Descamps et al, 2004*).

La inserción de dos serinas en la posición 69 y la mutación T69S son otro ejemplo de multiresistencia que parecen favorecer la escisión de análogos de timidina, y que en combinación con la mutación T215Y puede favorecer la escisión de AZT, ddI y d4T (*Calmy et al. 2004*).

Existe un conjunto de mutaciones, conocidas como mutaciones de análogos de timidina (TAM) que engloban a M41L, D67N, K70R, L210W, T215Y/F y K219E/Q. Estas mutaciones se seleccionan más

frecuentemente durante la pérdida de respuesta a regímenes que contengan AZT o d4T, pero éstas pueden conferir resistencia al resto de análogos de nucleósidos y nucleótidos, incluyendo al TDF (*Hanna et al. 2000* y *Miller et al. 2001*).

En el caso de los inhibidores de la proteasa es necesario que se acumulen al menos dos de las mutaciones primarias I47A/V, G48M/V, I50L/M/V, I54A/M/V, L76V, V82A/F/S/T, N88S, I84A/C/V y L90M para producir una resistencia cruzada en los IPs.

Debido a este fenómeno de resistencias cruzadas se ha consensuado la secuenciación de los ARVs en un orden específico (*Guía GeSIDA 2013*).

1.9.3. Mutaciones asociadas a resistencias: concepto de mutaciones primarias y secundarias.

Las mutaciones primarias son aquellas mutaciones individuales que aparecen en fases tempranas en la aparición de resistencias a los ARVs. Este tipo de mutaciones son las que confieren resistencia a un antirretroviral o familia (en caso de resistencia cruzada) en aquellos sujetos sin tratamiento previo o naïve. Se estima que el 8.5% de las infecciones recientes en España tienen mutaciones de resistencia (4.4% a los ITIAN, 4% a los ITINAN y 2.2% a los IP) pudiendo comprometer los tratamientos de primera línea (*García et al. 2011*).

Las mutaciones secundarias son mutaciones que se van acumulando en el genoma viral cuando están presentes una o más mutaciones primarias. Por ello, se define como resistencia secundaria a aquellas mutaciones asociadas a resistencia en pacientes con experiencia a tratamiento antirretroviral.

1.9.3.1. Resistencia a inhibidores de la RT análogos de nucleósidos.

Existen dos mecanismos de resistencia asociados a los ITIAN: la pirofosforólisis dependiente de ATP (proceso que permite continuar con la síntesis de ADN al conseguir eliminar el ITIAN que debería interrumpir la síntesis nuevas hebras de ADN) (*Scott, 2001*) y por otro lado, las mutaciones de la RT que permiten que la enzima discrimine entre el nucleósido natural y el análogo sintético debido a la disminución de la afinidad por este último en favor del sustrato natural de la enzima, permitiendo así continuar la síntesis de ADN (*Loveday, 2001*).

El mecanismo de resistencia mediante la pirofosforólisis era el mecanismo más frecuente de resistencia hasta hace algunos años con el uso del d4T y la ZDV (ambos análogos de la timidina). Hoy sólo se detectan en aquellos pacientes denominados históricos. Se ha comprobado que el ITIAN con mayor capacidad de resistir a los efectos de la pirofosforólisis es TDF debido a su estructura espacial flexible en su unión con el grupo fosfato.

El mecanismo de pérdida de afinidad en la incorporación del ITIAN es hoy día el más frecuente. Dentro de las mutaciones reconocidas, destaca la mutación M184V que produce un cambio conformacional provocando una alta resistencia a 3TC/FTC (estimada en >100 veces) y que no afecta a la afinidad por el sustrato natural. También se observa con las mutaciones K65R (en TDF y en menor medida en ABC) y L74V (ABC), aunque aparecen con menor frecuencia que la M184V. También comparte este mecanismo el complejo de multiresistencia Q151M pero a día de hoy es poco frecuente.

Dentro del patrón mutacional de este grupo de fármacos se han propuesto cuatro grupos de mutaciones dependiendo del efecto que generan (*Vingerhoets et al. 2010*):

1. M184V: es de las primeras mutaciones en ser seleccionadas por la mayoría de los TAR (desde los primeros hasta hoy día) ya que puede ser seleccionado por 3TC, FTC (produciendo una alta resistencia a estos dos fármacos), ABC y en menor medida ddI. Conocida por la asociación con la disminución del fitness viral, presenta una reversión parcial de la resistencia mediada por otras mutaciones, como es el caso de la a ZDV, d4T y TDF. La mutación M184I es igual de importante ya que es la que precede a M184V y es reemplazada en el tiempo por esta variante (*Diallo et al. 2003*).

2. Grupo de 6 TAMs. Estas mutaciones pueden aparecer por dos vías distintas de acumulación de mutaciones: TAM1 y TAM2. La primera vía se encuentra el aminoácido tirosina en la posición 215 (T215Y), mientras que en la segunda es la fenilalanina (T215F) la que está presente. Esta vía engloba las mutaciones M41L, L210W y T215Y, mientras que por la vía segunda suelen englobarse D67N, K70R, T215F y K219QE. El patrón de resistencias que provocan estas mutaciones es diverso siendo ZDV el más perjudicado (1-2 TAM), seguido de ABC (≥ 2 TAM + M184V) y en un tercer escalón encontraríamos a d4T, ddI y TDF (≥ 3 TAM).

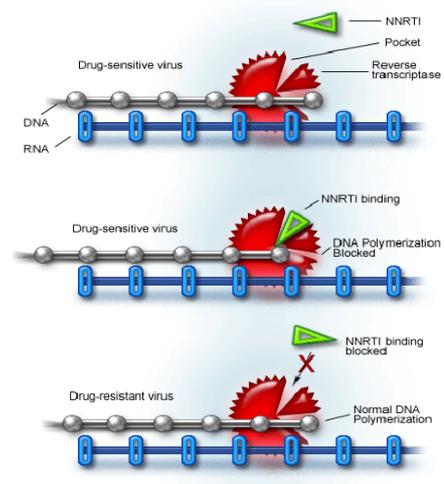
3. Grupos de mutaciones no timidínicas (K65RN, K70EG, L74VI, V75TM e Y115F). La mutación K65R confiere resistencia intermedia a TDF, ddI, ABC y 3TC/FTC, bajo nivel de resistencia a d4T e hipersensibilidad a ZDV (*Sluis-Cremer et al. 2000*). Esta mutación, junto con M184V reduce significativamente el fitness viral ya que disminuye la replicación viral. Por su parte, L74V confiere resistencia a ddI y es seleccionada por este fármaco además de ABC. Confiere resistencia intermedia a ddI. Para ABC son necesarias más mutaciones para que le confiera resistencia. También reduce significativamente la capacidad replicativa del virus.

4. Complejo de multiresistencia Q151M. Descrito en el punto 1.9.2, origina una alta resistencia a casi todos los ITIAN (parcial a 3TC y TDF).

1.9.3.2. Resistencia a inhibidores de la RT no análogos de nucleósidos (ITINANs).

Esta familia se caracteriza por la afinidad por el dominio hidrofóbico que la RT presenta en su centro catalítico al que confieren tal cambio conformacional que impiden la polimerización del ADN. Son inhibidores no competitivos que utilizan puntos de unión diferentes al sustrato que la enzima utiliza, pero al unirse prácticamente todos en el mismo sitio presentan una amplia resistencia cruzada entre ellos (Figura 1.16).

Figura 1.16. Mecanismo de resistencia de la RT a ITINANs mediante inhibición competitiva. Modificado de Clavel et al, 2004.



El mecanismo de resistencia es producida por mutaciones entre los codones 100-108 y 179-190 de la RT las cuales provocan una disminución de las interacciones hidrofóbicas facilitando la disociación de la unión entre el ITINAN y la RT. Otra región de unión engloba los codones 225-236. En el primero de los codones podemos encontrar las mutaciones A98G, K101E y V108I (bajo nivel de resistencia), la mutación L100I (nivel intermedio de resistencia a efavirenz y bajo a nevirapina, etravirina y rilpivirina), K101P (resistencia a rilpivirina) y la mutación más relevante dentro de este codón, la K103N que confiere alto nivel de resistencia causando resistencia a efavirenz y nevirapina, pero que no afecta a etravirina y rilpivirina. En los codones 179-190 destacan Y181C/I/V, Y188H/L y G190A/S mientras que en los codones 225-236 destacan P225H, M230L y P236L.

Esta familia no es activa frente al grupo O de VIH-1 y VIH-2 porque presenta cambios estructurales en esta región hidrofóbica que les confieren resistencia natural a estos fármacos, en concreto, en los codones 181-188.

Uno de los últimos estudios realizados en España (*Anta et al. 2013*) sobre la posible existencia de posibles diferencias en la resistencia a etravirina y rilpivirina en los que los polimorfismos naturales puedan influenciar en la barrera genética concluyeron que V108I, Y188I y G190A era más prevalente en subtipos B, mientras que V90I eran más frecuentes en subtipos no B, pero ninguna diferencia consiguió diferencia significativa.

1.9.3.3. Resistencia a inhibidores de la proteasa (IPs).

Se han descrito más de 60 mutaciones que implican resistencia a uno o más IP en más de 30 posiciones diferentes (*Johnson et al. 2010*) localizadas en el dominio central y proximidades.

Las mutaciones asociadas a resistencia de los IPs se localizan en el dominio central y cercanías. Las mutaciones fuera de esta zona no afectan a la sensibilidad al fármaco pero si a la cinética de esta enzima del virus. Las mutaciones primarias de resistencia a IPs se caracterizan por afectar a la sensibilidad del virus a esta familia y en ocasiones, aumentar la capacidad replicativa de aquellos virus portadores de mutaciones mayores.

Las mutaciones en el dominio central son: D30N, V32I, G48M/V, I50V/L, V82A/C/F/L/M/S/T y I84A/C/V. La mutación D30N se asocia históricamente con el uso de nelfinavir, mientras que G48V se asocia a pacientes con saquinavir y la I50V con amprenavir.

Las mutaciones en el dominio de hélice comprenden los aminoácidos comprendidos entre las posiciones 33 al 62. Encontramos las mutaciones M46I/L/V, I47V e I54A/L/M/S/T/V. Las que aportan un mayor grado de resistencia son la M46 y la I54.

Existen otros cambios en otros residuos que pueden comprometer la sensibilidad de los IPs como son las mutaciones G73S, N88D/G/T/S y L90M.

De igual modo que ocurre con otros antirretrovirales, también encontramos mutaciones que producen hipersensibilidad y restan resistencia en caso de encontrarse otras mutaciones. Estas sustituciones son L24I (tipranavir), I50L (indinavir, saquinavir, fosamprenavir, lopinavir, tipranavir y darunavir), I50V y I54L (tipranavir), L76V (saquinavir, atazanavir y tipranavir) y N88S (fosamprenavir y darunavir).

En esta enzima del virus están cobrando cada vez más importancia las variaciones naturales o polimorfismos, especialmente dentro de los subtipos no B del VIH-1. Entre ellos destacan las sustituciones en posiciones de resistencia: L10I/V; K20I/R; M36I; V82I; L89I/M. En el estudio anteriormente citado de Anta et al, 2013, en el que se analizó también la prevalencia de polimorfismos para tipranavir y darunavir, se observó una prevalencia mayor de resistencia en subtipos B que en los no B (11% vs 4.3%, $p=0.004$) indicando una mayor exposición de este fármaco en este grupo. Para darunavir no se encontraron diferencias entre subtipos (5.8% vs 5.5%, $p=0.998$).

1.9.3.4. Resistencia a Inhibidores de la Fusión.

Se trata de un fármaco con barrera genética baja que selecciona rápidamente mutaciones. Reservado para pacientes multirresistentes, con escasas o nulas opciones de rescate, en los que sea imposible usar otros fármacos de última generación como pudieran ser maraviroc, darunavir o raltegravir. Las mutaciones más frecuentes aparecen entre los residuos 36-40 y 42-45 del dominio HR1 de la gp41.

Estas sustituciones se asocian a un alto grado de resistencia y disminución del fitness viral, por lo que suelen desaparecer rápidamente al retirar el fármaco (Xei *et al.* 2002).

También se han asociado mutaciones en la región HR2 (N126K, N137K y S138A) que influyen en la sensibilidad a T-20. S138A es un polimorfismo natural encontrados en variantes del grupo O y N de VIH-1.

1.9.3.5. Resistencia a inhibidores de la entrada.

Presenta dos mecanismos de resistencia descritos en pacientes que han fracasado con este antirretroviral. El primero de ellos y más común es el mecanismo de escape de las variantes X4-tropicas preexistentes de bajo grado, no detectadas por estar por debajo de los límites de los test de tropismo (Cooper *et al.* 2010). El segundo de ellos implica la selección de mutaciones dentro de la región V3 de la proteína gp120 del virus. El patrón específico de mutaciones que pueden conferir resistencia a MRV en pacientes R5-tropicos aún está poco claro. Entre ellas destacan las mutaciones 4L, 11R, 19S, 21T y 28V que confieren resistencia a MRV. Por otro lado, en pacientes incluidos en el ensayo MOTIVATE se han identificado una serie de mutaciones y patrones de mutaciones asociados a disminución de la actividad. Algunas de ellas son: 13H, 16A, 20L, G15_P16INSA, N24_I25INSI, G18DEL, 11S+26V, 18G+22T, 19S+26V, 20F+21I, 20F+25D+26V, G15_P16INSG+25D (Seclén *et al.* 2010, Yuan *et al.* 2011, Parra-Sánchez M *et al.* 2012). Destacan los cambios producidos en las posiciones 11 y 26, así como las mutaciones 4L, 11R y 19S, asociadas con peor respuesta. Algunos aislados R5 resistentes a MVC presentan mutaciones inclusive fuera del bucle V3: en el V1, V2, C4 y algunos aislados resistentes *in vitro* también en gp41. Sin embargo, no se ha descrito resistencia cruzada con T-20.

1.9.3.6. Resistencia a los inhibidores de la integrasa.

La integrasa se constituye por 288 aa y tres dominios funcionales: N-terminal (1-50), C-terminal (213-288) y región catalítica (51-212), siendo esta zona en donde aparecen la mayoría de mutaciones las mutaciones de resistencia.

El fracaso terapéutico a raltegravir se asocia con tres vías distintas de acumulación de mutaciones. La más frecuente es la vía N155H (40%), seguida de la Q148H/K/R (30%) e Y143C/R (10%). La presencia de estas mutaciones por si solas condiciona una resistencia de alto grado. Las mutaciones menores asociadas a N155 son: L74M, E92Q/V, T97A, F121Y, G163K/R, V151A/I, S230R, junto con la propia mutación Y143H. Las mutaciones menores descritas son: L74M, E138A/K y G140A/C/S.

Raltegravir y elvitegravir presentan una resistencia cruzada casi completa pero el último fármaco de la familia, dolutegravir, no presenta resistencia a las mutaciones N155H e Y143C/R e incluso se han

documentado recientemente datos de eficacia virológica por la vía 148 duplicando la dosis del fármaco (Eron *et al.* 2011). Estudios recientes con dolutegravir han mostrado diferencias en las combinaciones de las mutaciones H51Y y R263K al comparar subtipo B con CRF02_AG. Esta combinación puede disminuir la actividad de la integrasa en un 60% y el fitness viral hasta 51 veces. En CRF02_AG no sería necesario la presencia de la segunda mutación para que se produzcan estos efectos (Mesplede *et al.* 2013).

1.9.3.7. Importancia de los polimorfismos en subtipos no B.

En general, los polimorfismos o mutaciones asociadas a resistencia descritas para subtipos B también confieren resistencia a los subtipos no-B y hasta la fecha no existen evidencias de que subtipos no-B seleccionen mutaciones primarias nuevas y/o distintas que los B. Entre subtipos no-B no hay una mayor frecuencia de mutaciones de resistencia primarias en comparación con subtipos B. Sin embargo, es más frecuente la existencia de polimorfismos y mutaciones secundarias en posiciones asociadas a resistencia tanto en la RT como en la PR. Las mutaciones primarias asociadas a resistencia son las mismas independientemente del subtipo. Sin embargo, algunas aparecen claramente con mayor frecuencia en unos subtipos que en otros.

Aunque la mayor parte de la información fenotípica apunta a similitudes en términos de susceptibilidad entre los subtipos B y no B, cada vez hay más indicios de que algunos polimorfismos relacionados en la proteasa podrían intervenir en la susceptibilidad específica a algunos IPs inhibidores de la RT e integrasa. En algunas cepas no-B la acumulación de ciertos polimorfismos y mutaciones secundarias en la PR se ha asociado a una reducción en la susceptibilidad *in vitro* a IPs (incluso en ausencia de mutaciones primarias).

Por lo tanto, aunque existe una amplia base teórica que sustenta que el subtipo del VIH puede influir en la respuesta al TAR, no se han encontrado evidencias clínicas que nos puedan ayudar a determinar si existe un tratamiento óptimo para los distintos subtipos del VIH (Rivas *et al.*, 2006).

1.9.3.8. Resistencias celulares.

La resistencia celular es otro mecanismo a tener en cuenta ya que se ha detectado la existencia de bombas de expulsión de los antirretrovirales en la membrana de los linfocitos y otros tipos celulares. Se han descrito el MDRP-1 (glicoproteína-P) para los IP y la MDRP-4 para los ITIAN (Lee *et al.* 1998 y Huisman *et al.* 2000). Este mecanismo puede inhibir las reacciones enzimáticas requeridas para la activación celular de determinados fármacos o la entrada de éstos en las células.

Otro mecanismo es el efecto de contrarregulación o down-regulation de la timidin-quinasa celular encargada de la trifosforilación de la misma que provoca una reducción del paso de AZT a la forma AZT

trifosfato activa. De igual modo está implicada en la fosforilación de la d4T provocando una disminución de la actividad pacientes tratados previamente con AZT (*Sommadossi et al. 1995*).

1.9.4. Métodos más usados en la práctica clínica para la detección de resistencias.

Los métodos actuales que se encuentran aprobados y comercializados incluyen test genotípicos y fenotípicos, los cuales utilizan suero, plasma o células mononucleares periféricas (proviral en estudio de tropismo, por ejemplo) y permiten orientar sobre el tratamiento óptimo para cada paciente, cuando empezar o sustituir un fármaco por otro por la aparición de mutaciones de resistencia. Los métodos genotípicos son con diferencia los más utilizados en la práctica clínica, por lo que nos centraremos en éstos.

1.9.4.1. Test genotípicos de resistencia.

Como ya se ha comentado anteriormente, la variabilidad genética del virus conlleva a la aparición de mutaciones en el genoma viral que puede llegar a alterar la sensibilidad a los antirretrovirales. Este fenómeno ocurre más frecuentemente en aquellos pacientes que utilizan pautas subóptimas o la adherencia al tratamiento no es la adecuada. En este escenario es fundamental la detección de mutaciones que puedan derivar en un fracaso virológico y que permitirán elegir un tratamiento de rescate adecuado con la consiguiente disminución de mortalidad a largo plazo (*Hirsch et al. 2008*).

El principio fundamental de estos test es la detección de mutaciones en el genoma del virus asociadas a resistencia a antirretrovirales. Para su realización son necesarios dos pasos: retrotranscripción del ARN viral y amplificación de los genes que son diana de los distintos antirretrovirales (RT, proteasa o integrasa) mediante PCR. Posteriormente, con este producto de amplificación y mediante el uso de una plataforma de secuenciación con su software que permite la detección de las mutaciones y las compara con una cepa patrón. Existen varias pruebas comerciales basadas en la secuenciación por el método de Sanger que se ha automatizado y que facilitan su realización. Entre ellas las más usadas son: GeneSeq HIV (Monograms BioSciences), TruGene genotyping Kit (Siemens) o ViriSeq HIV-1 Genotyping System (Abbott Molecular). Los ensayos genotípicos exigen que la base molecular de las resistencias esté suficientemente caracterizada, lo que permite que la detección de mutaciones sea predictiva de la falta de actividad de un determinado antirretroviral.

1.9.4.1.1. Variantes minoritarias.

Tanto los test genotípicos, fenotípicos y virtuales detectan bien aquellas mutaciones que se encuentran de forma más prevalente entre las cuasiespecies presentes en un paciente. El problema es que cuando estas mutaciones están presentes en menos del 15-20% de estas cuasiespecies (variantes

minoritarias), estas pruebas pueden llegar a no detectarlas lo que puede significar que se produzca un fracaso virológico. La alternativa a este problema sería la secuenciación masiva que pueden reportar las mutaciones en baja proporción y aportar más información sobre el riesgo de fracaso virológico en estos casos (*Li et al. 2011*).

1.9.4.1.2. Nuevos test genotípicos: secuenciación masiva.

Las técnicas hasta ahora disponibles permitían obtener un 98-100% de éxito en la amplificación en muestras con una carga viral superior a 500-1.000 copias/ml (*Parra-Ruiz et al. 2009*), pero la secuencia obtenida con estos métodos no es otra que la secuencia promedio de todas las variantes presentes en la muestra original, siendo difícil detectar mutaciones que supongan menos del 10-20% del total (*Paredes et al. 2010*), lo que conlleva que aquellas variantes minoritarias puedan obviarse en el estudio, y puedan posteriormente ser seleccionadas cuando se emplea el fármaco al que confiere resistencia.

En los últimos años se están incorporando poco a poco a los laboratorios de diagnóstico de los hospitales las plataformas de secuenciación masiva, destacando entre ellas la tecnología 454-UDS (GS Junior y GS FLX+, Roche Diagnostics). Se trata de una metodología basada en la pirosecuenciación masiva que implica preparación de una genoteca de cDNA con posterior amplificación de los fragmentos mediante emPCR (PCR de emulsión) y secuenciación basada en la incorporación de nucleótidos (pirofosfato) y producción de luz (por medio de la luciferasa) detectable por una cámara óptica tipo CCD. A continuación un software específico (AVA, Amplicon variant Analysis Software) se encargará del alineamiento de las secuencias y mediante el software DeepCheck (Therapy Edge, ABL) (Figura 1.17). Este equipo permite secuenciar fragmentos con una calidad óptima de entre 250-600 pb en aproximadamente 6-10 horas (dependiendo número muestras y tamaño del fragmento) generando hasta 35 millones de bases de información (Mb).

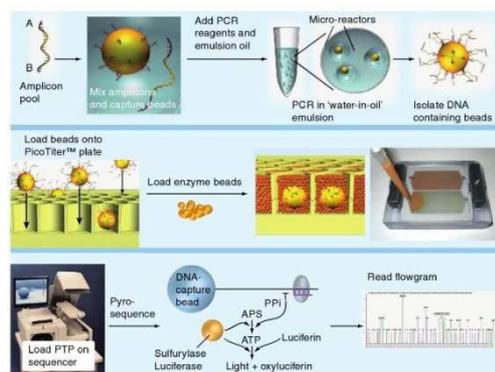


Figura 1.17. Workflow del proceso de pirosecuenciación de la plataforma 454. (Modificado de Gega et al, 2011)

Otras plataformas existentes son:

- Ion Torrent (Life). La metodología que usa este equipo es similar al procedimiento del 454 GS Junior, pero que en vez de usar luminiscencia y detectores de luz, incorpora sensores de voltaje capaces de

detectar los H+ liberados cada vez que un nucleótido se une a la nueva cadena en formación, es decir, la señal que detecta es el cambio de pH ínfimo en la solución de reacción. El proceso se lleva a cabo en chips con más de once millones de pocillos. Cada proceso genera entre 10 Mb y 1000 Mb de información en un tiempo estimado de 3 horas.

- MiSeq (Illumina) que se basa en terminadores reversibles y los fragmentos que permite amplificar son de 35-75 pb. Es un método basado en la polimerización del ADN, donde la incorporación de un nucleótido marcado con fluorescencia y protegido en la cadena naciente impide que ésta siga creciendo. Tras detectar la señal fluorescente, se elimina el grupo protector y se puede incorporar otro nucleótido marcado, con lo que empieza un nuevo ciclo. Cada proceso genera 1600 Mb de información en un tiempo de 27 horas con una baja tasa de error.

- ABI Solid (Applied Biosystems) se basa en la obtención de secuencias por ligación de octámeros marcados de secuencia conocida a la cadena de ADN, con la posterior detección de la señal fluorescente emitida tras cada ligación. Los fragmentos que permite amplificar son de 25-75 pb.

De un estudio reciente (*Loman et al. 2012*), concluimos que la plataforma más eficiente y precisa es el MiSeq con una tasa de error menor al 0.1%. El equipo más rápido es Ion Torrent con una velocidad que puede alcanzar los 330 Mb por hora pero con una tasa de error que alcanza el 1.5% (unos 15 errores por cada Mb), específicamente en fragmentos donde las secuencias son repetitivas. La plataforma que genera los fragmentos de secuencias más largos (alta fiabilidad hasta unas 600 pb, pero en aumento con las nuevas versiones de software) y permitía un mejor ensamblaje del genoma fue el 454 GS Junior.

Por lo tanto, a día de hoy la plataforma 454 se presenta como la referencia para entrar en el laboratorio de diagnóstico en VIH de los hospitales mientras que las otras plataformas pueden quedar relegadas a resecuenciar genomas ya conocidos o para el estudio de expresión de transcritos pese a tener las ventajas de precio y fiabilidad con regiones de homopolímeros.

A pesar de lo novedoso de cada técnica, ya se encuentran en desarrollo lo que se conoce como tercera generación de secuenciadores masivos. Estos se resumen en la siguiente tabla:

Tabla 1.6. Principales características de los secuenciadores de 3ª generación.

	Equipo	Compañía	Método de secuenciación	DNA molde	Longitud lecturas (pb)	Tiempo carrera (h)	nt/carrera (Gb)
3ª Generación de secuenciadores	Helicos tSMS	Helicos Biosciences	Polimerasa	Molécula única	25-45	192	37
	Pacific Biosciences	Pacific Biosciences	Polimerasa	Molécula única	1000	NA	NA
	ZX Genetics	ZX Genetics	Microscopia electrónica	Molécula única	NA	NA	NA

1.9.4.2. Interpretación de las mutaciones de resistencia.

Una vez obtenidas las mutaciones que presenta el virus infectante de cada paciente se pueden utilizar diferentes algoritmos de interpretación de mutaciones asociadas a resistencias.

Estos algoritmos se encuentran alojados en servidores online de acceso gratuito. A partir de archivos .fasta o .seq generados tras la secuenciación, obtendremos un completo informe con las mutaciones encontradas y la interpretación de los niveles de resistencia a todos los antirretrovirales. Entre estos algoritmos destacan:

A nivel nacional: Red de Investigación en SIDA (RIS, www.retic-ris.net).

A nivel internacional:

- a) HIV Drug Resistance Database (<http://hivdb.stanford.edu>). Además permite realizar el subtipado. Se encuentra entre los más utilizados.
- b) Geno2pheno (www.geno2pheno.org). Permite el subtipado viral de una forma más precisa que el anterior, especialmente en subtipos no B. Incorpora algoritmos para la resistencia de la integrasa viral y la interpretación del tropismo viral.
- c) Agence Nationale de Recherches sur le SIDA et les hépatites virales (ANRS francesa, www.hivfrenchresistance.org).
- d) Euresist Network website (www.euresist.org)
- e) Sociedad Internacional de SIDA de EE.UU. (www.iasusa.org).

Es importante conocer que no todos los sistemas de interpretación aportan la misma calidad ni cantidad de información y sólo algunos cuentan con reglas de interpretación específica y actualizada para subtipos no B (*Eberle et al. 2012*). Entre estos sistemas destacan las de la Sociedad Internacional de SIDA (IAS), cuyo panel de expertos publican periódicamente este listado (*Johnson et al. 2013*). A nivel nacional destaca la Guía de Resistencias a los antirretrovirales, editada por el panel de expertos de la Red de investigación en SIDA (RIS) y actualizada anualmente.

Otro mecanismo para la interpretación de las mutaciones de resistencia encontradas se basa en el uso de algoritmos de interpretación basados en la respuesta de clínica en los que se tienen en cuenta mutaciones, respuesta al tratamiento y niveles plasmáticos de ARN. No existen para todos los fármacos y no están validados para su uso en la clínica.

Por lo general existe buena correlación entre estos algoritmos pero suelen darse casos de discordancia en la interpretación de resultados, principalmente a la sensibilidad producidos (un fármaco sea sensible por un algoritmo y actividad disminuida o resistente por otro). Por otro lado cabe mencionar que no todas las herramientas online tienen la misma fiabilidad a la hora de definir correctamente el

subtipado de nuestra cepa de estudio ya que la base de Stanford discrimina correctamente los subtipos B y CRF02_AG pero no subtipos A1 y F1 (subtipos muy frecuentes en nuestra población de estudio y a continuación discutida). Para este fin existen varias herramientas que permiten subtipar correctamente nuestras cepas (*Yebra et al. 2011* y *Pineda-Peña et al. 2013*).

1.9.5. Utilidad en la práctica clínica.

En varios estudios publicados con pacientes residentes en países denominados desarrollados, la prevalencia de resistencias primarias en pacientes con infección aguda o crónica ha aumentado h superar el 10% (*Novak et al. 2005*, *Wensing et al. 2005* y *Cane et al. 2005*). A nivel nacional, en estudios multicéntricos que incluían pacientes con infección reciente encontraron que un 14% de las cepas tenía mutaciones primarias (*de Mendoza et al. 2005*), que se redujo en estudios posteriores hasta llegar a un 10% (*Sánchez Oñoro et al. 2007* y *Palacios et al. 2008*). En un estudio más reciente y en una población no tratada en el periodo 2004-2008 en los nuevos diagnósticos de la cohorte prospectiva de adultos de la red de Sida (CoRIS) se ha estimado en el 8,4% (*García et al. 2011*). Los últimos datos publicados han mostrado una disminución progresiva de la prevalencia global de transmisión de cepas con mutaciones de resistencia, estableciéndose en 2011 en 7,5% (*Monge et al. 2012*).

Debido al incremento de pacientes con subtipos no-B que se diagnostican actualmente en España se debe considerar la realización del subtipo viral a la vez que el estudio de resistencia (*García et al. 2011*, *Yebra et al. 2012* y *Abecasis et al. 2013*).

Otras recomendaciones a tener en cuenta son:

- En pacientes con fracaso virológico las pruebas de resistencias deben realizarse durante el TAR activo porque la población viral resistente será sustituida por otra sensible a las pocas semanas de retirar los fármacos. Estos resultados se deben interpretar teniendo en cuenta los estudios previos de resistencia, historia terapéutica y adherencia.

- En pacientes en seguimiento durante varios años se debe considerar repetir el genotipado antes de iniciar el TAR ante la posibilidad de haber sufrido una reinfección con mutaciones de resistencia.

1.9.6. Utilidad de los estudios de resistencia en los subtipos no B del VIH-1.

Como se ha comentado previamente, la mayoría de las infecciones por VIH a nivel mundial son producidas por subtipos no B (aproximadamente el 89%). A pesar de que el subtipo B es el más prevalente en Occidente, sólo supone un 11% a nivel mundial; el subtipo A en Europa del este y norte de Asia (a nivel global supone el 12%), el subtipo C en África (países sudafricanos), Oriente Próximo, India y Brasil

(a nivel global supone hasta el 48% de los infectados por VIH-1), CRF01_AE en el sudeste asiático y CRF02_AG en el oeste de África (5 y 8% a nivel global, respectivamente) (Hameelar et al. 2012). Esta distribución mundial tan marcada está cambiando y la prevalencia de subtipos no B está aumentando en América y Europa, debido principalmente a la inmigración. Los estudios más recientes en Europa (Paraskevis et al. 2009 y Abecasis 2013) han analizado los eventos migratorios de estos subtipos a lo largo de 16 países europeos, la diferencias claras entre países y los subtipos dominantes en cada área (la menor prevalencia de subtipos B de pacientes nuevo infectados se encontraron en Israel (27.9%) y Portugal (39.2%) mientras que los de mayor prevalencia los encontramos en Polonia (96.2%) y Eslovenia. La prevalencia de subtipos en Europa fue: subtipo B (66.1%), seguido del subtipo A1 (6.9%), subtipo C (6.8%) y CRF02_AG (4.7%). Los datos de estos estudios sugieren una alta compartimentalización determinada por las características sociales, según sugieren los autores. En España, uno de los estudios más recientes (Yebra et al. 2012), un 12.2% eran cepas de VIH-1 subtipo no B. Los subtipos encontrados entre los pacientes incluidos en la CoRis (Figura 1.18) y determinaron que tanto los URFs como CRFs se están introduciendo en España a través de inmigrantes y los propios nativos. Según la evolución de los últimos años, se espera un incremento en la frecuencia de estos subtipos aumentando la heterogeneidad del VIH en nuestro país.

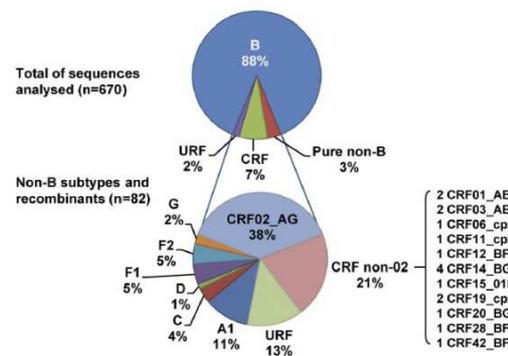


Figura 1.18. Distribución de subtipos de VIH-1 de la cohorte CoRis. Modificado de Yebra et al, 2012.

La disminución de la sensibilidad en subtipos no B está poco estudiada en comparación con la del subtipo B, principalmente porque este predomina en los países donde se emplearon primero los antirretrovirales (ARVs), añadido además la disponibilidad de los tests de resistencia. Sin embargo, existe la posibilidad de que diferencias genéticas entre los subtipos den lugar a un patrón de mutaciones diferente que confiera resistencia en respuesta a la presión de los ARVs. Esta posibilidad es apoyada por el hecho de que el VIH-1 presenta polimorfismos naturales que suponen hasta un 35% entre los diferentes subtipos (Brener et al. 2007, Yebra et al. 2012 y Kouri et al. 2012). Debido a estas diferencias, es posible que la diversidad genética dentro del VIH-1 influya en el tipo de resistencias que eventualmente pueden surgir tras la exposición al fármaco, así como en la tasa de aparición de esas resistencias. Esta diversidad también puede afectar el grado de resistencia cruzada a los ARV de la misma familia, con el potencial de impacto sobre los resultados clínicos, la preservación de la respuesta inmunológica, y el fracaso virológico, como se ha comprobado en un reciente estudio en la que la mutación K65R está implicada en subtipos C (Kantor 2006 y Theys et al. 2013).

De igual modo, los algoritmos de interpretación de resistencias genotípicas asociadas a mutaciones en VIH están principalmente, por no decir casi exclusivamente, desarrollados para el VIH-1 subtipo B. Debido a que otros subtipos y sus formas recombinantes poseen una serie de aminoácidos específicos o polimorfismos naturales, localizados en posiciones asociadas a resistencia que difieren con el subtipo B pueden provocar muy frecuentemente resultados discordantes entre los cinco algoritmos más usados de interpretación de resistencia (Stanford, geno2pheno, NCBI, EuResist y Rega). Estos algoritmos sobreestiman la resistencia en subtipos no B debido a patrones naturales de mutación, con la consecuente instauración de tratamientos incorrectos que conllevan al fracaso terapéutico o selección de nuevas mutaciones de resistencia. Todos los estudios recientes, revelan una mayor incidencia de resistencias en subtipos no-B tanto para inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleosidos (ITINAN), inhibidores de transcriptasa inversa análogos de nucleósidos (ITIAN), inhibidores de proteasa (IP), inhibidores de integrasa e inhibidores de la entrada viral, y existe la posibilidad de que la causa sea una incorrecta interpretación de estos polimorfismos naturales (*Chueca et al. 2009* y *Yebra et al. 2010*).

Se han descrito previamente los llamados polimorfismos específicos de subtipo o mutaciones que aparecen de manera estadísticamente significativa con una mayor prevalencia en pacientes no tratados infectados por los distintos subtipos no-B que en aquellos infectados por subtipo B. De igual modo, esta diferencia en la prevalencia de polimorfismos y mutaciones puede llevar a diferencias en la resistencia y traer consigo un fracaso virológico. Generalmente estos cambios específicos de subtipos no suelen encontrarse en el centro activo por lo que no están directamente implicados en procesos catalíticos donde se suelen unir los antirretrovirales, por lo que no estarían implicados en mutaciones de resistencia o en el fitness viral.

En resumen, pese a la cantidad de trabajos publicados y aplicaciones disponibles para el correcto subtipado de las cepas de VIH, aún es escasa la información sobre polimorfismos en determinados subtipos y la influencia que estos puedan ejercer sobre la correcta respuesta del TAR. Por otro lado, es importante conocer los datos epidemiológicos de la infección por VIH en Andalucía occidental, en especial en los casos por subtipos no B, prevalencia de mutaciones y resistencias en las distintas familias y efectividad del TAR usado.

2. Objetivos.

2. Objetivos.

En base a los antecedentes expuestos en el apartado de Introducción, se ha planteado el siguiente trabajo experimental que conforma esta Tesis, para la cual se han propuesto los siguientes objetivos que se exponen a continuación.

Con la realización del presente trabajo pretendemos contribuir en el conocimiento de la epidemiología de la infección VIH-1 en Andalucía occidental, donde los últimos años se ha producido un aumento de casos de infecciones por subtipos no-B principalmente por motivos de inmigración. Por ello, se requiere el estudio de los polimorfismos naturales propios de cada subtipo en los genes de la proteasa, la retrotranscriptasa, la integrasa y el tropismo viral, ya que pueden determinar en gran medida actividad de los fármacos inhibidores de la proteasa, retrotranscriptasa, integrasa e inhibidores de la entrada del virus. Por este motivo, consideramos que este estudio es necesario para la optimización del régimen terapéutico utilizado en nuestros pacientes.

En referencia al estudio genotípico del tropismo viral, los actuales algoritmos de interpretación más utilizados (*geno2pheno coreceptor* y PSSM) están optimizados para subtipos B de VIH-1 (sólo PSSM incorpora subtipos B y C). Ambos presentan algunos errores o limitaciones, como por ejemplo, que no expanden la secuencia (*geno2pheno*) o comenten errores de alineamiento (PSSM). Por esto y otros motivos, detallados a continuación, ha sido objetivo del presente trabajo el desarrollo de una aplicación informática que recoja la interpretación de ambos algoritmos, así como la corrección de estos errores.

Por otro lado, un análisis detallado de mutaciones o polimorfismos naturales presentes en nuestra población (especialmente entre los subtipos no B) y su efecto sobre la respuesta virológica al tratamiento nos permitirá evaluar y/o desarrollar algoritmos de interpretación genotípica que corroboren los *scores* de interpretación de mutaciones previamente definidos en la bibliografía, así como conocer si existen mutaciones o polimorfismos que no estén incluidas en dichos scores pero puedan tener relación con la pérdida de eficacia de algún antirretroviral empleado en nuestra población.

Resumiendo, los objetivos del presente trabajo son los siguientes:

1. Vigilancia epidemiológica de **subtipos no-B del VIH-1** en Andalucía Occidental. Estimación interanual de la prevalencia de cada uno de estos subtipos y caracterización de los pacientes infectados por subtipos no-B en nuestra población de estudio.
2. Estudio de **resistencias primarias** en nuestra población. Análisis de las **mutaciones de resistencia** y comparativa entre subtipos B y no B. Estudio de **polimorfismos naturales** en proteasa, retrotranscriptasa, integrasa y región V3 del gen gp120 de cepas no B de VIH-1.

3. Análisis de **efectividad de los TARs** usados entre nuestros subtipos no B.
4. Análisis de **clusters** de subtipos no B en nuestra área de estudio.
5. Desarrollo de la aplicación bioinformática “**MARGI-HIV Tropism**” para la interpretación genotípica del tropismo viral del VIH-1.

3. Pacientes y métodos.

3.1. Estudio epidemiológico de subtipos no-B del VIH-1 en Andalucía Occidental.

Estimación interanual de la prevalencia de cada uno de estos subtipos y caracterización de los pacientes infectados por subtipos no-B en nuestra población.

3.1.1. Pacientes.

Se realizó un estudio retrospectivo, de cohortes, utilizando para ello las secuencias analizadas en el sistema OpenGene System (Siemens Healthcare Diagnostic) y datos recogidos en una base de datos elaborada para el presente estudio. En esta base se recogen los datos de pacientes VIH-1⁺ en el periodo de 4 años, comprendido entre enero de 2009 y diciembre de 2012 en las que se incluyeron los datos de distintos hospitales de Andalucía occidental: Hospital del SAS de Jerez y Hospital de Puerta del Mar (Cádiz), Hospital Infanta Elena y Hospital Juan Ramón Jiménez (Huelva), Hospital de la Merced y Hospital de Valme (Sevilla) (Tablas 3.1 y 3.2). En este último hospital se realizaron los estudios de resistencia genotípica solicitados por todos estos centros, ya que es el Centro de Referencia de dichos hospitales para las resistencias virales.

Se incluyeron y analizaron un total de 940 muestras pertenecientes a un total de 855 pacientes. En todas estas muestras se realizó el estudio de resistencias y/o polimorfismos naturales y el subtipado. Desde junio de 2010 se ha conservado el ARN extraído de todos los pacientes con subtipos no B para posteriormente realizar el estudio genotípico de tropismo viral y el estudio de resistencias en la integrasa viral. Ambos estudios se realizaron a un total de 41/70 (58.6%) muestras.

Tabla 3.1. Estudio de resistencias a antirretrovirales realizados entre los años 2009 y 2012.

<u>Año</u>	<u>Muestras estudiadas (%)</u>
2009	240 (25.5)
2010	248 (26.4)
2011	247 (26.3)
2012	205 (21,8)
Total	940

Tabla 3.2. Procedencia por hospitales de los estudios de resistencia realizados.

<u>Hospital</u>	<u>Muestras estudiadas (%)</u>
Hospital del SAS de Jerez	208 (21.9)
Hospital de Puerta del Mar	212 (22.6)
Hospital Infanta Elena	159 (16.9)
Hospital Juan Ramón Jiménez	133 (14.1)
Hospital de la Merced	26 (2.8)
Hospital de Valme	204 (21.7)
Total	940

En la base de datos se recogieron los siguientes datos: demográficos disponibles de los pacientes (sexo, edad y país de origen), epidemiológicos (grupo de riesgo para la transmisión de la infección y subtipo), clínicos (coinfección por hepatitis B o C, sífilis, clamidias, gonococos o papiloma humano), datos de laboratorio (carga viral y recuento de CD4, basal y cada 3-6 meses), terapéuticos (motivo de la petición: naïve, primoinfección, primer o segundo fracaso, multifracaso u otros motivos: toxicidad, embarazo o abandono, así como tratamiento utilizados) y genotípicos (estudios de resistencia a IPs, ITIANs, ITINAN, integrasa y tropismo viral).

3.1.2. Métodos.

3.1.2.1. Determinación de la carga de ARN viral.

La carga viral (niveles plasmáticos de ARN del virus) se determinó mediante los siguientes instrumentos:

1. COBAS Amplicor-COBAS Taqman (Roche Diagnostics).
2. m2000 (Abbott Molecular)

Ambos equipos, totalmente automatizados, permiten realizar de forma simultánea la amplificación y cuantificación del ARN. Su funcionamiento se basa en 5 procesos fundamentales: 1) extracción del ARN de la muestra; 2) transcripción inversa para generar ADNc; 3) amplificación de este ADNc por PCR con cebadores específicos; 4) hibridación del producto amplificado con sondas oligonucleotídicas específicas marcadas y 5) detección por colorimetría del producto amplificado.

El límite de detección inferior fue distinto en función del instrumento y la versión utilizada por cada hospital. El límite actual para el equipo COBAS Amplicor-COBAS Taqman es de 20 copias/mL. Para el equipo de Abbott, el límite es de 40 copias/mL.

3.1.2.2. Subtipado de las cepas de VIH-1.

La determinación del subtipo infectante en cada muestra se realizó mediante el análisis de las secuencias obtenidas por secuenciación del gen *pol* obtenidas por medio del TruGene® HIV-1 Genotyping kit (Siemens Healthcare Diagnostic). Este sistema amplifica un fragmento de 918 pb que engloba los codones 4-99 del gen de la proteasa viral y los codones 38-247 de la RT. La secuencia obtenida se alinea con respecto a la secuencia molde o wild type (LAV-1 HIV) utilizando el software OpenGene(Siemens Healthcare Diagnostic). Las secuencias obtenidas se analizan empleando la base de datos de Stanford (<http://hivdb.stanford.edu>). Esta herramienta incluye el programa HIVseq para análisis de secuencias que

compara las secuencias de transcriptasa inversa y proteasa de estudio con secuencias consenso de distintos subtipos incluidos en su base.

Para llevar a cabo este proceso es necesario exportar la secuencia obtenida en formato FASTA o SEQ. Ambos formatos son reconocidos por la aplicación, que tras el análisis obtenemos el subtipo y un % de similitud con respecto a la secuencia de referencia de la base.

En caso de obtener como resultado una cepa no-B, se reanalizaron estas secuencias con otras herramientas, ya que como se ha descrito previamente, la base de Stanford puede cometer errores en la clasificación del subtipado (Yebra, 2011). Estas herramientas fueron: 1. la aplicación de *geno2pheno* resistance (<http://www.geno2pheno.org/>), 2. *Euresist* (<http://engine.euresist.org/>) y 3. análisis filogenético usando secuencias de referencia de HIV-1 grupo M obtenidas de la base de datos de los Álamos (<http://www.hiv.lanl.gov/>). El alineamiento de secuencias se realizó utilizando el programa *ClustalX* v2.0.11. Se construyó un árbol mediante *Neighbour-joining* usando el modelo de Kimura-2 parámetros mediante el programa *MEGA 6*. El remuestreo “bootstrap” (n=1000) del alineamiento múltiple fue realizado con un punto de corte de 700.

3.1.2.3. Análisis de clusters de subtipos no B.

Las secuencias consenso de referencia se obtuvieron de la base de datos de Los Alamos (<http://www.hiv.lanl.gov/>). Para la alineación de estas secuencias y las de interés se empleó el software *Clustal Omega* v 1.2.0. Para la obtención de clusters se empleó la herramienta *MEGA6* considerando para el cálculo de las distancias entre pares de secuencias métodos de máxima verosimilitud e inferencia Bayesiana (modelo de sustitución de nucleótidos general tiempo reversible o GTR, con un bootstrapping de 1000 réplicas). Se define como cluster cuando tenga valores de bootstrap igual o superior al 98% y una distancia genética media intra-cluster menor de 0.03.

3.1.2.4. Metodología estadística.

Las variables principales en este estudio fueron: tratamiento (“no tratamiento”: pacientes naïve o primoinfección, y “si tratamiento”: pacientes con tratamiento previo), recuento CD4 y logCV. La variable secundaria fue el subtipo de VIH-1 (“subtipo B” vs “subtipo no B”).

Se realizó un análisis descriptivo en el que las variables cuantitativas se expresaron como medianas (rango intercuartílico o IQR: primer cuartil-tercer cuartil) y las variables cualitativas como número (porcentaje). Para analizar las relaciones entre las variables cualitativas y cuantitativas, se realizaron tablas de contingencia, se aplicaron las pruebas Chi-Cuadrado y t de Student, respectivamente. El análisis estadístico descriptivo e inferencial fue realizado usando el programa estadístico *SPSS 22.0* (IBM Corporation, Somers, NY, USA).

3.2. Estudio de los polimorfismos naturales en las regiones de la proteasa, retrotranscriptasa, integrasa y región V3 del gen gp120.

3.2.1. Detección de mutaciones de resistencia en proteasa y retrotranscriptasa.

El método de detección de resistencias se realizó mediante la técnica de secuenciación de ácidos nucleicos de TruGene® HIV-1 Genotyping kit (Siemens Healthcare Diagnostic) con el instrumento OpenGene DNA Sequencing system (Siemens Healthcare Diagnostic). Esta técnica consta de 5 etapas: extracción de ácidos nucleicos (ARN), amplificación mediante RT-PCR, reacción PCR-CLIP, secuenciación y electroforesis del producto amplificado, alineamiento de las secuencias e interpretación de los resultados.

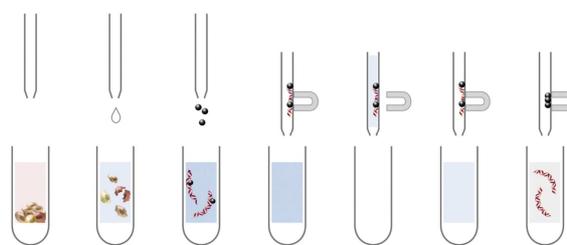
Para la interpretación de resistencias a IPs, ITIANs, ITINANs, integrasa y región V3 se tuvieron en cuenta las reglas de interpretación de resistencia de la Agencia Nacional Francesa de Estudio del VIH (ANRS v23, Septiembre 2013), la HIV Drug Resistance Database de Stanford (Junio 2013), la IAS-USA Drug Resistance Mutations in HIV-1 list (2013) y la Guía 2013 de resistencias a antirretrovirales de la Red de Investigación en SIDA (RIS). El algoritmo de interpretación de resistencias utilizado como referencia en este trabajo ha sido el score utilizado por la HIV Drug Resistance Database de Stanford.

La HIV Drug Resistance Database de Stanford clasifica, según el score obtenido, de la siguiente manera: *Susceptible* (score 0 to 8), *Potential low-level* (9 to 14), *Low* (15 to 30), *Intermediate* (30 to 55) and *High* (≥ 60).

3.2.2. Extracción de ácidos nucleicos.

Es la primera etapa con la que se consigue hacer accesible la diana de estudio, es decir, el ARN que se encuentra en la cápside viral del VIH. El proceso es el siguiente: 1. pretratamiento del suero para conseguir la lisis de las partículas víricas; 2. separación del ARN del resto de componentes virales y proteínas séricas mediante unión a una partícula sólida magnética; 3. lavado y 4. purificación.

En nuestro estudio se empleó el protocolo de extracción automática MagNA Pure Compact (Roche Diagnostics). El kit empleado para ello fue el MagNA Pure Compact Nucluc Acid Isolation kit I (Roche Diagnostics). Para ello se utilizó de partida 700 μ l de suero para obtener un eluido de 50 μ l (Figura 3.1).



1. Muestra a procesar.
2. Lisis celular y digestión proteica.
3. Unión de ácidos nucleicos a la superficie de las partículas magnéticas.
4. Eliminación de restos celulares mediante lavados.
5. Separación del complejo partícula magnética-ácido nucleico.
6. Elusión del ácido nucleico por elusión a alta temperatura.
7. Eliminación de las partículas magnéticas. Eluido final listo para su procesamiento.

Figura 3.1. Principios del aislamiento automático de ácidos nucleicos por el sistema MagNA Pure Compact. (Adaptado de Biochemica 2003).

3.2.3. Amplificación del ácido nucleico: RT-PCR.

La amplificación se realizó según el siguiente protocolo:

1. Preparación de la Master Mix I y II.

Para ello hay que poner a temperatura ambiente los siguientes reactivos (RT-PCR primers, dNTP Solution, DTT Solution y RT-PCR buffer), dejando en el congelador el RNase Inhibitor, la RT enzyme y la DNA polimerase. Antes de utilizarlos es conveniente darle un vortex y un spin rápido (quick run). Se preparan en tubos eppendorf de 1.5 ml. El volumen a emplear depende del número de muestras (n°) a procesar. Una vez preparados la Master Mix se deben vortexear.

Nb Reaction	3	4	5	6*
RT-PCR Primer	21	27	36	42
dNTP	5,3	6,8	9	10,5
DTT	3,5	4,5	6	7
RNase-Inhibitor	1,8	2,3	3	3,3



Master Mix I

Nb Reaction	3	4	5	6*
RT-PCR Buffer I	35	45	60	70
RNase Inhibitor	1,8	2,3	3	3,5
RT-Enzyme	3,5	4,5	6	7
DNA Polymerase	8,8	11,3	15	17,5



8 Master Mix II

2. Dispensar 9 µl de la Master Mix I en un tubo Eppendorf de 0.2 ml por cada muestra. A continuación se añaden 17 µl del ARN extraído. Se mezcla con la pipeta.

3. Encendemos el termociclador (GeneAmp® PCR System 9700, Applied Biosystems), seleccionamos el programa “VIH RT_PCR”. Cuando alcance los 90 °C colocamos las muestras. Empieza el programa con 2 minutos a 90 °C, seguido de 60 minutos a 50 °C. Cuando hayan transcurrido unos 5 minutos a 50 °C, dispensamos el Master Mix II. Para ello, quitamos la tapa del termociclador y sin sacar las muestras, una a una vamos dispensando los 14 µl de la Master Mix II, teniendo la precaución de mezclar con la pipeta y cerrar el tapón inmediatamente. Este ciclo de RT-PCR dura aproximadamente 4 horas. El programa completo de amplificación es el siguiente:

90°C - 2 min
50°C - 60 min
94°C - 2 min
(94 °C - 30 seg // 57 °C - 30 seg// 68 °C - 2 min) x 20 ciclos.
(94 °C - 30 seg // 60 °C - 30 seg// 68 °C - 2.5 min) x 17 ciclos.
68 °C - 7 min
4 °C - ∞

Al finalizar se puede continuar con la secuenciación o conservar los amplificadores a 4°C hasta el día siguiente.

Con este proceso obtenemos como producto de amplificación una región de aproximadamente 1.3 Kpb del gen *pol*.

3.2.3.1. Secuenciación bidireccional y electroforesis de los secuenciados.

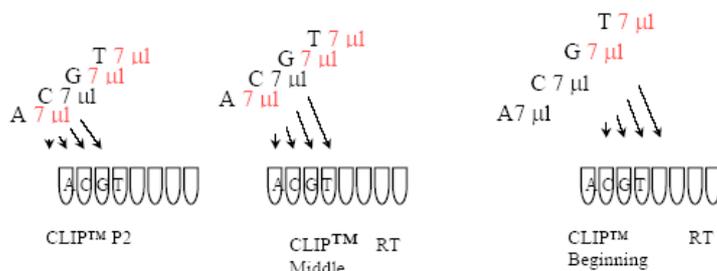
La reacción de secuenciación se basa en una secuenciación bidireccional o reacción CLIP que se basa en una modificación del método de Sanger que emplea terminadores de la secuencia de ADN (ddNTP).

La mayoría de los métodos usados en secuenciación emplean estos ddNTP marcados con fluoróforos. En este caso los terminadores no están marcados, son los primers los que se han marcado; un primer incorpora el fluoróforo Cy5.5 en el extremo 5', el otro incorpora el fluoróforo Cy5.0 en el extremo 3'. Estos fluoróforos emiten luz a distintas longitudes de onda conocidas (694 y 674 nm respectivamente) lo que permite, por medio de un láser, diferenciar la emisión de los productos de secuenciación iniciados con cada uno de estos dos cebadores. De esta forma obtenemos en un mismo tubo la secuencia "sense" y "antisense" (*forward* y *reverse*). El secuenciador semiautomático OpenGene DNA sequencing System, dispone de un sistema láser que realiza lecturas cada 30 segundos para registrar las señales que emiten los fluoróforos. El secuenciador incorpora un sistema de registro de ambas longitudes de onda de modo que permite la lectura simultánea de la secuencia en ambas direcciones (5' y 3').

Partimos del producto de amplificación obtenido en el paso anterior. Para cada amplificado a secuenciar vamos a realizar tres reacciones distintas de secuenciación: CLIP PR, en la que obtendremos una secuencia bidireccional del gen de la proteasa (codones 1-99); CLIP RTB en la que secuenciaremos el principio del gen de la retrotranscriptasa (RT *beginning*, codones 40-142) y finalmente, CLIP RTM, en la que secuenciaremos la parte media del gen de la retrotranscriptasa (RT *middle*, codones 138-247).

Para la realización de la reacción CLIP se utilizó según el siguiente protocolo:

Se ponen los terminadores y el Clip buffer a temperatura ambiente y a continuación se les da un vórtex y un spin rápido. Dispensar 7 µl de cada terminador por cada muestra y cada región. Se emplean, las microplacas con pocillos de 0.2 µl. Cambiar siempre de punta.



1. Preparación de la Master Mix III.

Se hace en un tubo Eppendorf de 2 ml. La CLIP enzyme (AmpliTaq FS) se deja en el congelador hasta que vaya a ser dispensada. Antes de utilizarla hay que dar un vórtex y un spin rápido. Una vez preparada la Master Mix III se debe dar un vórtex para mezclar.

No Reacciones	2	4	5	6	7	8
Water	132,5	246	328	368	437	475
CLIP™ Buffer I	38	62	83	100	111	120
AmpliTaq FS	7	11,7	15,6	17,7	20,8	22,5

2. Dispensar 71 µl de la Master Mix III en tubos eppendorf de 0.2 ml, uno por muestra.

3. Dispensamos 5 µl del producto de la RT-PCR obtenido en el paso previo al Eppendorf correspondiente la Master Mix III y mezclamos muy bien con la pipeta. A continuación dispensamos 5 µl de dicha mezcla a cada pocillo conteniendo los terminadores. La forma más apropiada es tomar los 5 µl de la mezcla y añadirlo al tubo con los 7 µl del terminador apropiado para la secuencia que se trate y mezclarlos con la pipeta procurando que todo el contenido (12 µl) quede en el fondo. Cambiar de punta en cada terminador. Poner los tapones a la microplaca.

4. Ponemos el termociclador en marcha y cuando está alcanzando los 95 °C ponemos la microplaca que contiene las muestras. El programa completo del termociclador es el siguiente:

94 °C - 5 min

(94 °C - 20 seg // 56 °C - 20 seg // 70 °C - 1.5 min) x 30 ciclos.

70 °C - 5 min.

4 °C ∞

5. Una vez transcurrido todo el programa (2 horas aproximadamente), y el termociclador está a 4 °C, se debe añadir el reactivo de parada previamente vorteadado. Se puede hacer sobre el mismo termociclador; para ello, se toman 14 µl del reactivo de parada, y se añade sobre la pared del pocillo de modo que resbale y procurando que todo el contenido (26 µl) quede en el fondo. Cambiar de punta en cada muestra.

6. Desnaturalizar los productos de reacción calentando a 70-95 °C durante 2 minutos. Si no se va a hacer la electroforesis guardar la microplaca en nevera.

3.2.3.2. Electroforesis de los productos de secuenciación.

Una vez realizada la reacción CLIP y la parada, obtendremos, por cada muestra 12 tubos: 4 CLIP PR (uno con ddNTP), 4 de la CLIP RT_B y 4 de la CLIP RT_M. En cada tubo tenemos los primers marcados que no se hayan incorporado, distintos fragmentos con un peso molecular variable con primers marcados incorporados, productos de secuenciación con la secuencia completa con primers incorporados y ADNc en exceso sin secuenciar. Durante la electroforesis estos componentes se separan en función de su peso molecular.

Para llevar a cabo este proceso debemos:

- Coger un cristal (MicroCel 500 Cassete, Siemens HealthCare Diagnostics), colocar el peine de 16 pocillos. Colocarlo, asegurándolo en su posición correcta en la tostadora (Gel toaster, Siemens Healthcare Diagnostics) y llenar con la pistola de gel de poliacrilamida (Surefill 6% Sequencing Gel, Siemens HealthCare Diagnostics) con cuidado de no formar burbujas.
- Encender la tostadora y transcurridos unos minutos de exposición a luz UV y tras emitir una alarma de aviso, retirar el cristal y limpiar con cuidado los restos del polímero formado que quedan alrededor del peine. Retirar el peine con cuidado de no romper los pocillos.
- Colocar el cristal en la torre del secuenciador (Long-Read Tower; Siemens HealthCare Diagnostics); llenar las cámaras superior e inferior con 1 ml de buffer TBE 1x previamente preparado (900 ml de agua estéril y 100 ml de buffer TBE 10X (Roche Diagnostic).
- Programar el secuenciador introduciendo en el software (GeneObjects 4.1, v2008) los datos de identificación de la muestra, paciente, regiones y direcciones que se van a cargar en cada uno de los pocillos del gel, los parámetros de electroforesis (gel temperature: 60°C; Gel Voltage: 2000V; Laser power: 50%; Run clock: 0.5 sec sampling; Tiempo del run: 50 minutos).
- Realizar un *prerun* para que el buffer TBE comience a pasar por los carriles.
- Lavar los pocillos con TBE 1X para eliminar las burbujas.
- Cargar en cada pocillo 1,8 µL de muestra desnaturalizada.
- Correr las muestras según los parámetros antes indicados.

Tras finalizar la electroforesis, el sistema recoge todas las señales emitidas en cada carril y las transforma en un cromatograma.

3.2.3.3. Alineamiento de las secuencias e interpretación de los resultados.

El último proceso de la secuenciación consiste en el correcto alineamiento de las secuencias amplificadas. Este procedimiento es llevado a cabo mediante el software GeneObjects 4.1 el cual integra los 4 cromatogramas obtenidos para cada región secuenciada (PR, RT_B y RT_M) y para cada dirección (5' y

3'). Tras hacer la asignación de bases (*base calling*), podremos visualizar la secuencia correspondiente a cada una de las regiones y cada una de las direcciones.

Después de revisar posibles errores de asignación de bases, se requiere combinar las secuencias obtenidas en las direcciones 5' y 3' de cada región secuenciada que serán comparadas con una secuencia de una cepa de referencia o *wild type* (HIV-1_{LAV-1}, GenBank, número K02013).

En este punto se recomienda ser cauteloso para corregir y editar posibles errores de interpretación del software o resolver mezclas que no codifican un aminoácido o generan codones de STOP, así como inserciones o deleciones en la secuencia.

Alternativamente, como control interno de calidad, se puede comprobar que no se han producido una contaminación cruzada entre muestras. Para ello utilizaremos la aplicación de fingerprinting.

Las secuencias obtenidas pueden ser transformadas a formato texto, más concretamente, en formato FASTA o SEQ, las cuales permiten ser exportadas. Con este formato se realiza el subtipado y el análisis de mutaciones de resistencia mediante otros algoritmos de interpretación.

Para la determinación del subtipo e interpretación de resistencias se utiliza la aplicación online gratuita de Genotype Resistance Interpretation de la HIV Drug Resistance Database de la Universidad de Stanford. En caso de que el subtipo determinado sea no B, se reanaliza con la aplicación de Geno2pheno y EuResist.

3.2.4. Detección de mutaciones de resistencia en integrasa (subtipos no B).

3.2.4.1. Amplificación.

La amplificación se realizó según el siguiente protocolo:

1. Preparación de la Master Mix para realizar la RT-PCR.

Para ello hay que poner a temperatura ambiente los siguientes reactivos (primers, dNTPs, DTT Solution y RT-PCR buffer), dejando en el congelador el RNase Inhibitor, la RT-PCR enzyme mix. Antes de utilizarlos es conveniente darle un vortex y un spin rápido (quick run). Se preparan en tubos eppendorf de 1.5 ml. El volumen a emplear depende del número de muestras (Nº) a procesar. Una vez preparados la Master Mix se deben vortexear.

N reaction	n=1	n=2	n=3	n=4
RT- PCR buffer 5X	5	10	15	20
DTT (100mM)	1,25	2,5	3,75	5
dNTPs (10mM)	0,5	1	1,5	2
IN2R (10mM)	1	2	3	4
IN2F (10mM)	1	2	3	4
RNase Inhibitor (40U/μl)	0,25	0,5	0,75	1
RT-PCR enzyme mix	0,5	1	1,5	2
H ₂ O	9,5	19	28,5	38

2. Dispensar 19 μl de la Master Mix en un tubo Eppendorf de 0.2 ml por cada muestra. A continuación se añaden 6 μl del ARN extraído. Se mezcla con la pipeta.

3. Encendemos el termociclador (GeneAmp® PCR System 9700, Applied Biosystems), seleccionamos el programa “RT-PCR integrada”. Este ciclo de RT-PCR dura aproximadamente 4 horas. El programa completo de amplificación es el siguiente:

50°C - 30 min
94°C - 2 min
(94 °C - 15 seg // 60 °C - 30 seg// 72 °C – 1 min) x 40 ciclos.
72 °C - 7 min
4 °C - ∞

Al finalizar se puede continuar con la nested-PCR o conservar los amplificados a 4°C hasta el día siguiente.

Con este proceso obtenemos como producto de amplificación una región de aproximadamente 1110 Kpb del gen *pol*.

2. Reacción de Nested-PCR.

La reacción de nested-PCR se realizó a partir del siguiente protocolo:

N reaction	n=1	n=2	n=3	n=4
Buffer 10X	2,5	5	7,5	10
MgCl ₂ (25mM)	0,75	1,5	2,25	3
dNTPs (10 mM)	0,5	1	1,5	2
Primer FININ (5mM)	1.75	3,5	5.25	6.75
Primer RINEX (5mM)	1.75	3,5	5.25	6.75
Taq Polimerasa 5U	0,2	0,4	0,6	0,8
H ₂ O	16	32	48	64

2. Dispensar 23 μl de la Master Mix en un tubo eppendorf de 0.2 ml por cada muestra. A continuación se añaden 2 μl de ADN previamente amplificado. Se mezcla con la pipeta.

3. Encendemos el termociclador (GeneAmp® PCR System 9700, Applied Biosystems), seleccionamos el programa “Nested-integrasa”. Este ciclo de PCR dura aproximadamente 2 horas. El programa completo de amplificación es el siguiente:

94°C - 3 min
 (94 °C - 45 seg // 57 °C - 45 seg// 72 °C – 1 min) x 35 ciclos.
 72 °C - 7 min
 4 °C - ∞

Con este proceso obtenemos como producto de amplificación una región de aproximadamente 860 Kpb del gen *pol*.

3.2.4.2. Secuenciación bidireccional y electroforesis del producto amplificado.

Para la realización de la reacción CLIP-PCR se utilizó la siguiente master mix con el kit Termo Sequenase Primer Cycle Sequencing (GE Healthcare). Los primers usados (I1F1 e I1F2) estaban marcados con los fluoróforos Cy5.5 y Cy5 respectivamente y englobaban los codones 40 a 170 de la integrasa.

Nb reaction	n=1	n=2	n=3	n=4
H ₂ O	9	18	27	36
Primer I1F1	1,5	3	4,5	6
Primer I1F2	1,5	3	4,5	6

1. Dispensar 12 µl de la Master Mix en tubos Eppendorf de 0.2 ml, uno por muestra.
2. Dispensamos 2 µl del producto de la Nested-PCR obtenido en el paso previo al Eppendorf correspondiente que contiene la master mix. Mezclamos muy bien con la pipeta. A continuación dispensamos 2 µl de dicha mezcla a cada pocillo conteniendo los terminadores. La forma más apropiada es tomar los 2 µl de la mezcla y añadirlo al tubo con los 3 µl del terminador apropiado para la secuencia que se trate y mezclarlos con la pipeta procurando que todo el contenido (4 µl) quede en el fondo. Cambiar de punta en cada terminador. Poner los tapones a la microplaca.
3. Ponemos el termociclador en marcha y cuando está alcanzando los 95 °C ponemos la microplaca que contiene las muestras. El programa completo del termociclador es el siguiente:

94°C – 5 min
 (94°C – 20 seg // 62°C – 20 seg // 70°C – 20 seg) x 30
 70°C- 5 min
 4°C - ∞

5. Una vez transcurrido el programa (2 horas aproximadamente), y el termociclador está a 4 °C, se debe añadir el reactivo de parada previamente vorteadado. Se puede hacer sobre el mismo termociclador; para ello, se toman 6.5 µl del reactivo de parada y se añade sobre la pared del pocillo de modo que resbale y procurando que todo el contenido (9 µl) quede en el fondo. Cambiar de punta en cada muestra.

6. Desnaturalizar los productos de reacción calentando a 95 °C durante 2 minutos. Si no se va a hacer la electroforesis guardar la microplaca en nevera.

3.2.4.3. Electroforesis de los productos de secuenciación.

El fundamento del proceso de electroforesis es el mismo que el descrito en el apartado anterior (3.1.2.2.3). Las únicas diferencias es que en esta ocasión entraremos en la sesión de Integrasa y en el tiempo de run marcamos 70 minutos. La carga de muestra en cada pocillo es de 1,8 µl.

3.2.4.4. Alineamiento de las secuencias e interpretación de los resultados.

El proceso es similar al descrito en el apartado 3.2.3.3. Las secuencias obtenidas se compararán con la cepa de referencia en la que no existen mutaciones asociadas a resistencia, en este caso usaremos la región de la integrasa de HIV-1_{LAV-1}.

Al igual que para la proteasa y retrotranscriptasa, revisaremos la secuencia obtenida para corregir los posibles errores de interpretación del software y la correcta concordancia entre las secuencias 5' y 3', así como intentar resolver las mezclas que no codifiquen para un aminoácido, codones de STOP o inserciones o deleciones en la secuencia.

Las secuencias obtenidas se exportarán en formato FASTA o SEQ para ser posteriormente analizadas en la aplicación online de Geno2pheno_{integrase} (<http://integrase.bioinf.mpi-inf.mpg.de/index.php>).

3.2.5. Determinación del tropismo viral mediante la secuenciación de la región V3 de la glicoproteína 120 del VIH-1.

3.2.5.1. Extracción de ácidos nucleicos según el tipo de muestra.

Extracción del ARN (plasma) o ADN (ADN proviral a partir de sangre total).

- Para extracción de ARN viral: Suero de pacientes VIH+ con carga viral ≥ 1000 copias/ml que vengán acompañados de su volante de petición correspondiente.
- Para extracción de ADN proviral: sangre total de pacientes VIH+ con carga viral inferior a 1000 copias/ml o carga viral indetectable (<20 copias/ml)

Ambas extracciones se realizan con el equipo MagNAPure Compact. Los extraídos obtenidos se conservarán a -80°C.

3.2.5.1.1. Extracción de sueros.

Seleccionar el protocolo de purificación Total_NA_Plasma_external_Lysis, con un volumen de muestra de 700 µl y un volumen de elusión de 50 µl.

3.2.5.1.2. Extracción de sangre total.

1. Lisis mecánica en MagNA Lyser:

- Vortear las muestras para homogenizarlas al menos 30 min en el vortex Genie2.
- Añadir 1,5 ml de sangre en un tubo de SeptiFast Lys Kit (Roche Diagnostic)
- Agitación a 70 rpm durante 15 seg en MagNA Lyser.
- Dejar reposar 10 minutos a temperatura ambiente y extraer.

2. Extracción con MagNA Pure Compact:

- Seleccionar el protocolo de purificación ADN bacteriano V3.2. El volumen de muestra son 400 µl de la sangre lisada obtenida en el paso anterior. El volumen de elusión será 50 µl.

Nota: Se recomienda hacer la extracción del ADN en menos de 48 horas tras recibir la muestra. De este modo evitaremos la degradación de la muestra por parte de ADNasas presentes en la sangre y obtendremos una mejor calidad en la secuenciación de la región de estudio.

3.2.5.2. Preparación de la Master Mix para realizar la RT-PCR.

Para ello hay que poner a temperatura ambiente los siguientes reactivos (primers P150 y P151, dNTPs, DTT Solution y RT-PCR buffer), dejando en el congelador el RNase Inhibitor y la RT-PCR enzyme mix. Antes de utilizarlos es conveniente darle un vortex y un spin rápido (quick run). Se preparan en tubos Eppendorf de 1.5 ml. El volumen a emplear depende del número de muestras (Nº) a procesar. Una vez preparados la Master Mix se deben vortear.

Reactivo	N=1	N=2	N=3	N=4
H ₂ O	10	20	30	40
5x Reac. Buffer	5	10	15	20
DTT solution	1,25	2,5	3,75	5
dNTPs 10mM	0,5	1	1,5	2
E150 5pmol/ml	1,25	2,5	3,75	5
E151 5pmol/ml	1,25	2,5	3,75	5
RNasin	0,25	0,5	0,75	1
Enzyme Mix	0,5	1	1,5	2

2. Dispensar 20 µl de la Master Mix en un tubo Eppendorf de 0.2 ml por cada muestra. A continuación se añaden 5 µl del ARN o ADN extraído. Mezclar bien con la pipeta.

3. Encendemos el termociclador (GeneAmp® PCR System 9700, Applied Biosystems), seleccionamos el programa “RT-PCR V3”. Este ciclo de RT-PCR dura aproximadamente 4 horas. El programa completo de amplificación es el siguiente:

48°C – 45 min
94°C – 2 min
(94°C – 15 seg / 55°C – 30 seg / 72°C – 45 seg) x 35 ciclos
72°C – 7 min
4°C - ∞

Al finalizar se puede continuar con la nested-PCR o conservar los amplificados a 4°C hasta el día siguiente.

2. Reacción de Nested-PCR.

La reacción de nested-PCR se realizó a partir del siguiente protocolo:

Reactivo	N=1	N=2	N=3	N=4
Buffer 10X	2,5	5	7,5	10
dNTPs 10mM	0,5	1	1,5	2
MgCl ₂ 25mM	1,5	3	4,5	6
LR33 5mM	1,3	2,6	3,9	5,2
LR34 5mM	1,3	2,6	3,9	5,2
H ₂ O	15,5	31	46,5	62
Taq Pol 5U/ml	0,5	1	1,5	2
Total	23	46	69	92

2. Dispensar 23 µl de la Master Mix en un tubo Eppendorf de 0.2 ml por cada muestra. A continuación se añaden 2 µl de ADN previamente amplificado. Se mezcla con la pipeta.

3. Encendemos el termociclador (GeneAmp® PCR System 9700, Applied Biosystems), seleccionamos el programa “Nested-V3”. Este ciclo de PCR dura aproximadamente 2 horas. El programa completo de amplificación es el siguiente:

94°C – 2 min
(94°C – 30 seg / 55°C – 30 seg / 72°C – 3 seg') x 35 ciclos
72°C – 7 min
4°C - ∞

3.2.5.3. Secuenciación bidireccional y electroforesis de los secuenciados.

Para la realización de la reacción CLIP-PCR se utilizó la siguiente master mix con el kit Termo Sequenase Primer Cycle Sequencing (GE Healthcare). Los primers usados (ES7 y E125) estaban

marcados con los fluoróforos Cy5.5 y Cy5 con el que amplificaremos una región en la que se engloba la región de 105 nucleótidos en la que se engloban los 35 aminoácidos que codifican la región V3 de estudio.

Reactivo	N=1	N=2	N=3	N=4
H2O	9,5	19	28,5	38
Primer ES7 (5 µM)	1	2	3	4
Primer E125 (5 µM)	1	2	3	4

1. Dispensar 11.5 µl de la Master Mix en tubos Eppendorf de 0.2 ml, uno por muestra.
2. Dispensamos 1.5 µl del producto de la Nested-PCR obtenido en el paso previo al Eppendorf correspondiente que contiene la master mix. Mezclamos muy bien con la pipeta. A continuación dispensamos 2 µl de dicha mezcla a cada pocillo conteniendo los terminadores. La forma más apropiada es tomar los 2 µl de la mezcla y añadirlo al tubo con los 2 µl del terminador apropiado para la secuencia que se trate y mezclarlos con la pipeta procurando que todo el contenido (4 µl) quede en el fondo. Cambiar de punta en cada terminador. Poner los taponetes a la microplaca.
3. Ponemos el termociclador en marcha y cuando está alcanzando los 95 °C ponemos la microplaca que contiene las muestras. El programa completo del termociclador es el siguiente:

94 °C - 5 min
 (94 °C - 20 seg // 62 °C - 20 seg // 70 °C - 2min) x 30 ciclos.
 70 °C - 5 min.
 4 °C ∞

4. Una vez transcurrido el programa (2 horas aproximadamente), y el termociclador está a 4 °C, se debe añadir el reactivo de parada previamente vorteadado. Se puede hacer sobre el mismo termociclador; para ello, se toman 6.5 µl del reactivo de parada y se añade sobre la pared del pocillo de modo que resbale y procurando que todo el contenido (10.5 µl) quede en el fondo. Cambiar de punta en cada muestra.
5. Desnaturalizar los productos de reacción calentando a 95 °C durante 2 minutos. Si no se va a hacer la electroforesis guardar la microplaca en nevera.

3.2.5.4. Electroforesis de los productos de secuenciación.

El fundamento del proceso de electroforesis es el mismo que el descrito en el apartado anterior (3.1.2.2.3). Las únicas diferencias es que en esta ocasión entraremos en la sesión de V3 y en el tiempo de run marcaremos 40 minutos. La carga de muestra en cada pocillo es de 1,8 µl.

3.2.5.5. Alineamiento de las secuencias e interpretación de los resultados.

El proceso es similar al descrito en el apartado 3.3.3.3. Las secuencias obtenidas se compararán con la cepa de referencia en la que no existen mutaciones asociadas a resistencia, en este caso usaremos la región V3 de la gp120 de HIV-1_{LAV-1}.

Al igual que para la proteasa, retrotranscriptasa e integrasa, revisaremos la secuencia obtenida para corregir los posibles errores de interpretación del software y la correcta concordancia entre las secuencias 5' y 3', así como intentar resolver las mezclas que no codifiquen para un aminoácido, codones de STOP o inserciones o deleciones en la secuencia.

Las secuencias obtenidas se exportarán en formato FASTA o SEQ para ser posteriormente analizadas en la aplicación online de Geno2pheno_{coreceptor} (<http://coreceptor.bioinf.mpi-inf.mpg.de/index.php>). Seleccionaremos un cut-off de 10% como tasa de falsos positivos (FPR). Anotaremos el valor de % FPR y la interpretación obtenida (CCR5 o X4). De igual modo indicaremos si la regla 11/25 lo clasificaría como X4 (pueden darse interpretaciones de tropismo CCR5 y la regla 11/25 lo indique como X4).

A continuación, como indica el documento consenso para la determinación genotípica del tropismo del VIH en la práctica clínica (Actualización de Septiembre de 2011), realizaremos una interpretación combinatoria para aumentar la sensibilidad para detectar las cepas X4 (Chueca et al. 2009). Para ello, entraremos en la aplicación online de Fortinbras PSSM (<http://fortinbras.us/cgi-bin/fssm/fssm.pl>), seleccionando los siguientes parámetros:

- Use predictor: Subtype B X4/R5 (Si es subtipo C usaremos la matriz subtype C SI/NSI)
- Pre-Process: Align to matrix.
- Seleccionar “Expand degenerate sequence” y “Full expansion” para obtener el resultado de todas las combinaciones obtenidas tras la secuenciación.

Estas aplicaciones presentan algunos errores y limitaciones, por la que el doctorando y varios colaboradores han desarrollado la aplicación informática online MARGI-HIV Tropism, que se detallará en el siguiente apartado.

Con los resultados obtenidos tras los diferentes análisis, ya podremos definir nuestra secuencia como CCR5, CXCR4 o dual mixto.

3.4. Desarrollo de la aplicación bioinformática “MARGI-HIV Tropism” para la interpretación genotípica del tropismo viral del VIH-1.

3.4.1. Introducción: ¿por qué se ha desarrollado esta aplicación?

Desde la aprobación por la FDA y la EMEA en 2007 de Maraviroc (Selzenti™ en USA o Celcentri™ en el resto de países, Pfizer™), un nuevo antirretroviral del VIH, que se clasifica dentro de una nueva familia de fármacos: antagonistas del co-receptor de quimiocinas CCR5 (R5). Este fármaco tiene actividad específica frente a variantes R5-trópicas. En caso de que el VIH tenga un tropismo CXCR4 (X4) o dual mixto (R5X4) este fármaco no está recomendado. Por todo esto se originó la necesidad de disponer de ensayos para la determinación del tropismo viral en aquellos pacientes candidatos a iniciar un tratamiento con este fármaco. De este modo, sólo aquellos pacientes portadores de variantes del virus con tropismo R5 se les suministrarán este AR. En los ensayos realizados para la aprobación de Maraviroc, la determinación del tropismo se realizó mediante el ensayo fenotípico Trofile™ (Monogram Biosciences, California, USA). A partir de junio de 2008 se comenzó a utilizar una versión mejorada, ESTA™ (Enhanced Sensitivity Trofile Assay) que ha incrementado considerablemente la sensibilidad del ensayo anterior. Sin embargo, estos ensayos presentan unas limitaciones técnicas y especialmente de logística que dificultan su utilización en la práctica clínica. Otra limitación es el coste de ésta técnica y que se requiere de personal altamente cualificado para llevarla a cabo.

En este contexto se han desarrollado los métodos genotípicos que se basan en la amplificación y análisis de la región V3 de la envoltura del VIH. Estas técnicas se presentan como una herramienta mucho más económica, rápida y accesible de desarrollar en cualquier laboratorio especializado de VIH que cuente con tecnología para realizar este tipo de estudios.

Para realizar el análisis de esta región se han desarrollado algunas reglas y algoritmos genotípicos de interpretación del tropismo que se basan fundamentalmente en las características de la secuencia de aminoácidos de la región V3 de la envoltura viral.

Dos de estos algoritmos más utilizados son *Geno2phenocoreceptor*™, desarrollado conjuntamente entre la Universidad de Colonia y el Instituto Max-Planck de Alemania. El método estadístico que utiliza para hacer sus predicciones es SVM (*Support Vector Machine*). *Geno2pheno* puede realizar las predicciones tanto a partir de la secuencia FASTA de nucleótidos como de aminoácidos de la región V3. La mayoría de estas secuencias son subtipo B, aunque también incluye algunas secuencias de otros subtipos genéticos. El servidor permite seleccionar en cada predicción el grado de sensibilidad para detectar variantes X4, seleccionando el porcentaje de FPR (*False Positive Rate*) en cada predicción. Se puede acceder libremente en <http://coreceptor.bioinf.mpi-inf.mpg.de/>

Otro de los algoritmos más usados es WebPSSMTM, también de acceso libre en <http://indra.mullins.microbiol.washington.edu/webpssm/>. Desarrollado por la Universidad de Washington y realiza sus predicciones a partir de la secuencia de aminoácidos en formato FASTA de la región V3 utilizando el método estadístico *position-specific scoring matrix (PSSM)*

Una versión actualizada de ésta última es FortinbrasPSSMTM, igualmente disponible libremente en <http://fortinbras.us/cgi-bin/fssm/fssm.pl>. Desarrollada por el creador original de *WebPSSM* para la predicción genotípica del tropismo viral en base al *PSSM*. Proporciona las mismas predicciones que *WebPSSM*. Esta herramienta permite que aquellas secuencias de V3 que alberguen mezclas de nucleótidos, el servidor ofrece al usuario la posibilidad de obtener una puntuación para cada una de las combinaciones posibles o bien obtener una puntuación media de todas las combinaciones posibles.

Pese al enorme conocimiento de esta secuencia y la mejora de los distintos algoritmos de interpretación, aún existe una baja sensibilidad para detectar cepas X4 cuando se comparan estos métodos genotípicos antes comentados con TrofileTM. Por ello, varios grupos científicos han conseguido, mediante la combinación de diversos algoritmos, un aumento de la sensibilidad para detectar estas cepas, sin perder especificidad.

3.4.2. Problema técnico planteado.

Sería por lo tanto deseable unificar estos algoritmos con el fin de agilizar el laborioso análisis bioinformático y facilitar de este modo al facultativo o científico encargado de este proceso de interpretación de la secuencia de estudio.

Para ello, la presente aplicación se basa en una herramienta online que permite analizar la secuencia V3 de la proteína gp120 del VIH y obtener simultáneamente los resultados que se obtendrían al realizar el análisis por separado usando las aplicaciones Geno2pheno coreceptor (con un score de falso positivo o FPR, por sus siglas en inglés de 2-5.75% o un FPR de 10%; y WebPSSM usando la matriz x4r5 para subtipo B o la matriz sinsi en caso de subtipos C del VIH.

3.4.3. Descripción detallada de la aplicación.

La presente invención, nombrada “MARGI-HIV tropism” (por sus siglas en inglés Multiple Algorithm Results for Genotyping Interpretation of the HIV tropism) se basa en una base de datos en la que se recogen secuencias proteicas de las región V3 de la proteína gp120 del VIH tipo I. Aproximadamente dos mil secuencias estudiadas se pueden encontrar en la HIV Database de los Álamos, acceso gratuito online (<http://www.hiv.lanl.gov/content/index>), así como en la Genbank Database, con

acceso gratuito online (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/). El resto de secuencias se han obtenido a partir de secuencias obtenidas en los laboratorios de Microbiología Molecular de los hospitales universitarios de Valme (Sevilla) y San Cecilio (Granada). Hasta la última actualización realizada el 06/09/2012, la actual base recoge 11069 secuencias. Esta base de datos así como la aplicación que usa esta base de datos se ha diseñado con pleno cumplimiento de lo dispuesto en las Directrices sobre Buena Práctica Clínica, así como de lo dispuesto en las leyes y normas administrativas de España (incluyendo la Directiva Europea 2001/20/EC y el RD EC 223/2004). Asimismo, respetará los principios éticos establecidos en la Declaración de Helsinki. Esta base de datos no recoge ningún dato personal ni clínico de pacientes, sólo secuencias proteicas.

Estas secuencias se han analizado individualmente por medio del algoritmo de interpretación SVM utilizado por la aplicación Geno2pheno coreceptor. Se han incluido los resultados de % de FPR (ratio de falsos positivos) que se obtienen al analizar la secuencia problema y se ha utilizado la interpretación según el FPR seleccionado previamente para su análisis. Esta base incluye la interpretación del tropismo que se obtiene al seleccionar previamente al análisis un FPR de 2-5.75% y por otro lados los obtenidos tras usar un FPR de 10%. Igualmente se recoge la información que proporciona Geno2pheno sobre la regla 11/25, en la cual si en la posición 11 o 25 de la secuencia V3 hay un residuo de arginina (R) o lisina (K) se indica como tropismo CXCR4.

A su vez, la base recoge el valor o score y la interpretación del tropismo viral obtenido mediante el algoritmo PSSM de la aplicación WebPSSM. Para las secuencias proteicas correspondientes a subtipos C del VIH-1 se ha utilizado la matriz *sinsi*. Para el resto de secuencias de otros subtipos de VIH-1 se ha utilizado la matriz *x4r5* para su análisis.

Esta base de datos es utilizada a través de una interfaz online (www.vih-tropismo.com). El mecanismo de acción de esta herramienta, es el siguiente:

- El usuario debe introducir la secuencia de ADN de la región V3 en la sección indicada como se indica en las figuras 1 y 2.
- La secuencia de estudio se traduce automáticamente a proteína y se comparará, mediante un algoritmo de programación, con todas las secuencias incluidas en la base de datos. El resultado que el usuario obtendrá será el análisis de la secuencia que mayor similitud presenta y que está contenida en esta base de datos con la secuencia de estudio, así como los resultados obtenidos por los algoritmos antes señalados.
- En caso de que la secuencia de ADN incluya mezclas, la aplicación realiza una resolución de estas mezclas y obtiene de igual modo los diferentes análisis de las distintas secuencias obtenidas tras este proceso. Estas mezclas son:

R: A o G
S: G o C
M: A o C
K: G o T
W: A o T
Y: C o T

- El resultado final será similar al ejemplo que se muestra a continuación:
 1. FPR: 38.00%
 2. a) Geno2pheno Motivate: CCR5
 3. b) Geno2pheno European: CCR5
 4. c) Geno2pheno Tropism: CCR5
 5. d) WebPSSM Score: -11.16
 6. e) WebPSSM Tropism: CCR5
 7. f) Predicted genotype: CCR5
- 1. Un % FPR (false positive rate) de la secuencia de estudio comparada con la secuencia consenso usada por Geno2pheno coreceptor.
- 2. Interpretación del tropismo por Geno2pheno coreceptor usando un FPR previo de 2-5.75 % (optimized cutoff base on clinical data from MOTIVATE study).
- 3. Interpretación del tropismo por Geno2pheno coreceptor usando un FPR previo de 10 % (Recommendations from the European Consensus Group on clinical management of HIV-1 tropism testing).
- 4. Interpretación final de Geno2pheno coreceptor (con los dos FPRs antes citados).
- 5. Un score obtenido usando la matriz 4x5 de WebPSSM. (Para los subtipos C de VIH-1 se han analizado las secuencias mediante la matriz sinsi para subtipos C)
- 6. Interpretación del tropismo mediante WebPSSM.
- 7. Un resultado final definido como “Predicted genotype”. Es el resultado obtenido tras usar ambos algoritmos. (Geno2pheno coreceptor y WebPSSM).

```
CTGTAAATGGCAGTCTAGCAGAAGAAGAGGTAGTAATTAGATCTGTCAATTTACGGACAATGCTAAAAACCATAATAGTACA
GCTGAACACATCTGTAGAAATTAATGTACAAGACCCAACAACAATACAAGAAAAAGAATCCGTATCCAGAGAGGACCAGGG
AGAGCATTGTGTTACAATAGGAAAAATAGGAAATATGAGACAAGCACATTGTAACATTAGTAGAGCAAAATGGAATAACACTTT
AAAAACAGATAGCTAGCAAATTAAGAGAAACAATTTGGAAATAATAAAACAATAATCTTTAAGCAATCCTCAGGAGGGGACCCAG
AAATTG
```

Figura 3.2. Secuencia del a región V3 amplificada por los cebadores ES7 y E125 (amarillo) y fragmento que se debe copiar para su posterior análisis en esta herramienta (rojo).

```
TGTACAAGACCCAACAACAATACAAGAAAAAGAATCCGTATCCAGAGAGGACCAGGGAGAGCATTGTGTTACAATAGGAAAA
ATAGGAAATATGAGACAAGCACATTGT
```

Figura 3.3. Ejemplo de secuencia que permite determinar el tropismo viral y que se utiliza en esta aplicación.

4. Resultados.

4.1. Características de la población general de estudio.

Las características de los pacientes se muestran en la tabla 4.1

Tabla 4.1. Características de todos los pacientes recogidos en la base de datos.

Sexo (%)	V: 76.2 ; M: 23.8
Mediana edad (años) [Q1-Q3]	41 [33-46]
Mediana recuento CD4 (cel/mm3) [Q1-Q3]	266 [120-444]
Mediana Logaritmo 10 carga viral basal (copias/mL) [Q1-Q3]	4.54 [3.73-5.11]

<u>Motivo petición</u>	<u>%</u>
no tratados	56.1
naïve	51.5
primoinfección	4.6
tratados	42.8
primer fracaso	12.4
segundo fracaso	7.0
multifracaso	13.3
Otros	10.1
No disponible	1.1

V= Varón. M= Mujer. Q1= Cuartil 1. Q3= Cuartil 3.

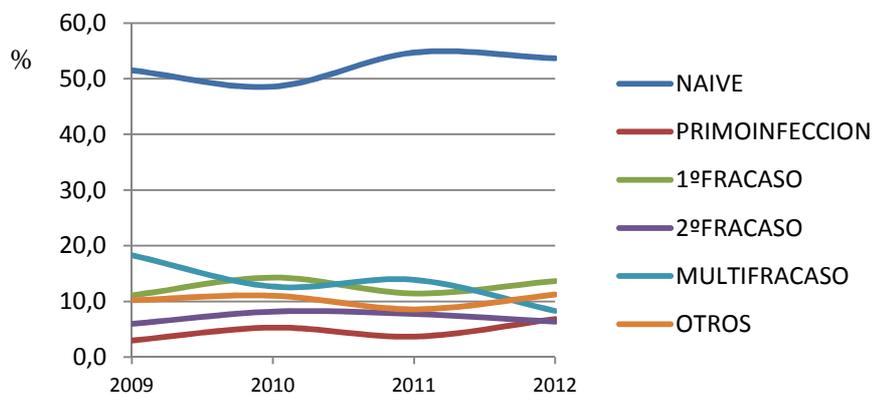


Figura 4.1. Motivo de la petición en el periodo estudiado (2009-2012) expresada en %.

Atendiendo al motivo de la petición de estudios de resistencias, observamos un aumento de pacientes no tratados (Δ 6%) con la consiguiente disminución de pacientes tratados o fracasos (diferir inicio del TAR, aumento de la adherencia, tolerabilidad y eficacia de los tratamientos actuales son algunas de las explicaciones a este fenómeno) (Figura 4.1). Igualmente observamos un aumento de las primoinfecciones desde 2009 a 2012 de un 3.8% ($p=0.127$).

La mediana de edad en pacientes no tratados aumenta ligeramente (desde los 40 años en 2009 a 41 años en 2012, $p=0.615$) mientras que el sexo de los pacientes se mantiene (83% de pacientes masculinos, $p=0.953$). Véase tablas 4.2 y 4.3 e figura 4.2.

En cuanto a los pacientes tratados la mediana de edad ha aumentado desde los 40 años de 2009 a los 42 años en 2012 ($p=0.179$), manteniéndose desde 2010. El porcentaje de pacientes masculinos ha disminuido desde 2009 un 4,1%, $p=0.580$).

Tabla 4.2. Motivos de la petición del estudio de resistencias durante el periodo de estudio (%).

	2009	2010	2011	2012
Naïve	51,5	48,6	54,7	53,7
Primoinfección	3,0	5,3	3,7	6,8
1º Fracaso	11,1	14,3	11,4	13,7
2º Fracaso	6,0	8,2	7,8	6,3
Multifracaso	18,3	12,7	13,9	8,3
Otros	10,2	11,0	8,6	11,2

Tabla 4.3. Porcentaje de pacientes tratados y no tratados durante el periodo de estudio (%).

	2009	2010	2011	2012	p
No tratados	54,5	53,9	58,4	60,5	0,203
Tratados	45,5	46,1	41,6	39,5	

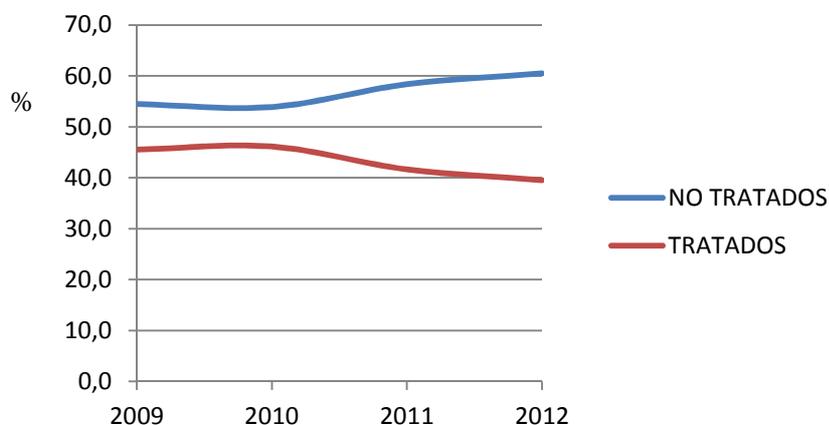


Figura 4.2. Evolución de los pacientes tratados/no tratados en el periodo 2009-2012 (%).

Las características generales correspondientes a los pacientes infectados por subtipos no-B se detallan en la tabla 4.4.

Tabla 4.4. Características de los pacientes infectados por subtipos no-B.

Sexo (%)	V: 70.0; M: 30.0
Mediana edad (años) [Q1-Q3]	38 [30-45]
Mediana recuento CD4 (cel/mm3) [Q1-Q3]	309 [143-437]
Mediana Logaritmo carga viral basal (copias/mL) [Q1-Q3]	4.44 [3.91-5.20]

Motivo petición (%)

no tratados	85.7
naïve	78.6
primoinfección	7.1
tratados	14.3
primer fracaso	7.1
segundo fracaso	1.4
multifracaso	4.3
Otros	1.4

Grupo de riesgo (%)

ADVP	5.7
Heterosexual	50.0
Homosexual	27.1
ADVP+Homosexual	0.0
Hemoderivados	1.4
Vertical	2.9
Desconocido	12.9

Coinfección (%)

VHA	7.1
VHB	5.7
VHC	14.3

Otras infecciones (%)

Citomegalovirus	15.7
Citomegalovirus + sífilis	2.9
Citomegalovirus + HPV + clamidias	1.4
Citomegalovirus + Virus Epstein Barr	1.4
Virus Epstein Barr + Toxoplasmosis	1.4
Sífilis	1.4
Toxoplasmosis	1.4

Nota: V: varón; M: mujer; Q1: cuartil 1; Q3: cuartil 3.

Tabla 4.5. Pautas de tratamiento utilizadas en los pacientes VIH-1 subtipo no B.

ITIAN: 64.3%
 AZT: 7.1% ddI: 2.9% d4T: 0.0% 3TC: 14.3% FTC: 55.7% ABC: 14.3% TDF: 55.7%

ITINAN: 45.7%
 NVP: 0.0% EFV: 42.9% ETV: 5.7% RPV: 2.9%

IP: 28.6%
 IDV: 0.0% NFV: 0.0% SQV: 0.0% LPV 7.1% ATZ 7.1% DRV: 14.3%

InInt (RAL): 10.0%

ITIAN+ITINAN: 32.9%
ITIAN+IP: 15.7%
ITIAN+InInt: 2.9%
ITIAN+ITINAN+IP: 5.7%
ITIAN+ITINAN+IP+InInt: 7.1%
Monoterapia: 4.3%
 DRV/r: 2.9%
 LPV/r: 1.4%

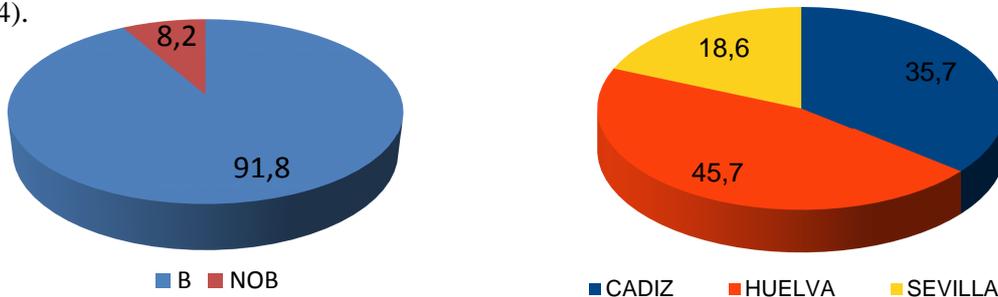
Adherencia al tratamiento.

Buena: 57.1%
 Regular: 8.6%
 Perdida de seguimiento: 8.6%
 Sin ARV: 25.7%

4.1.1. Distribución de subtipos no B en nuestra población.

El porcentaje de subtipos no B encontrados en nuestra área de estudio fue del 8.2% (Figura 4.3). La distribución por ciudades de estudio de los pacientes se describe en la imagen 4.4 en donde se concluye que las ciudades con mayor representación de subtipos no B son Huelva y Cádiz, principalmente por el volumen de población inmigrante en estas zonas

(Figura 4.4).



Figuras 4.3 y 4.4. Porcentaje de subtipos B y no B en la zona de estudio (Izquierda). Distribución de los subtipos no B entre las tres ciudades de estudio indicados como porcentaje (Derecha).

En cuanto a la distribución de subtipos no B analizadas en este estudio, predominan los subtipos F1, CRF02_AG, A1 y C, representando entre ellos algo más del 75% de los subtipos no B de nuestra área (Figura 4.5). En cuanto al origen de estos pacientes, la mayoría son pacientes europeos (78.6%) seguido de africanos (17.1%). Sudamericanos y el Caribe se encontraron en menor proporción (2.9% y 1.4%, respectivamente). Entre pacientes europeos, los subtipos con mayor frecuencia fueron F1 (37.7%), A1 (20.8%) y CRF02_AG (18.9%). El subtipo con mayor frecuencia entre pacientes africanos fue CRF02_AG (33.3%). Los subtipos encontrados en pacientes sudamericanos y del caribe fueron: A1 y CRF12_BF, y CRF14_BG, respectivamente.

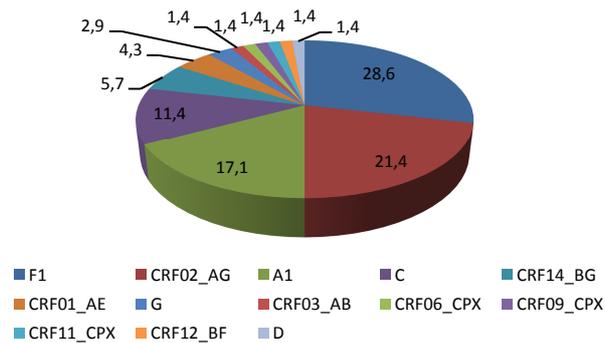


Figura 4.5. Distribución de los 70 subtipos VIH-1 no B analizados.

4.2. Estudio del recuento de CD4 y logCV de VIH en los pacientes naïve incluidos en el estudio.

Se observa una tendencia a la baja entre los grupos de pacientes con una supresión inmune moderada y severa, aumentando el % de pacientes con un recuento linfocitario superior a 500 CD4/ml ($p=0.013$). Esto indica un diagnóstico precoz de la infección por VIH con lo cual médico-paciente pueden decidir si optan por iniciar tratamiento o diferirlo (considerando exclusivamente el recuento CD4). (Tabla 4.6 e Figura 4.6).

Tabla 4.6. Porcentaje del recuento de CD4 entre los pacientes naïve incluidos en el estudio.

Nota: CD4 entre 499-200 considerado como supresión inmune moderada, <200 CD4: supresión inmune severa.

CD4 NAIVE %	2009	2010	2011	2012	GLOBAL	p
>=500	10,6	18,4	22,0	25,8	19,4	0,013
499-200	47,0	46,1	48,4	38,2	44,5	n.s
<200	42,4	35,5	29,6	36,0	36,1	n.s

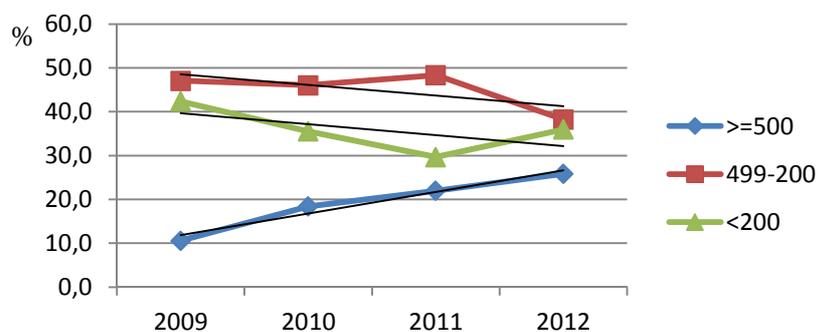


Figura 4.6. Recuento CD4 entre los pacientes naïve durante los cuatro años de estudio. Se incluye la línea de tendencia en cada grupo.

Por otro lado, se observa una ligera subida del número de pacientes con CV>100.000 copias, llegando a representar el 40% de la población naïve en 2012 (Tabla 4.7. y Figura 4.7.). Por otro lado, disminuyen ligeramente los grupos de pacientes que tenían entre 100.000 y 1000 copias/ml, no llegando a ser estadísticamente significativo. Si se aprecia un aumento del número de pacientes con carga viral <1000 copias desde el año 2009 al 2012 (Δ 3.2%, $p<0.001$). Una explicación a estos datos sería el aumento en el diagnóstico en fases tempranas de la infección (etapa ventana con CV<1000 copias o en fase de control inmune o crónica de la infección).

Tabla 4.7. Porcentaje de la carga viral (copias/ml) entre los pacientes naïve incluidos en el estudio.

CV_NAIVE_%	2009	2010	2011	2012	GLOBAL	p
>100000	38,7	33,6	37,3	40,0	37,4	n.s
100000-10000	46,5	49,6	41,0	43,2	45,1	n.s
10000-1000	14,0	13,7	18,7	12,8	14,8	n.s
<1000	0,8	3,1	3,0	4,0	2,7	<0.001

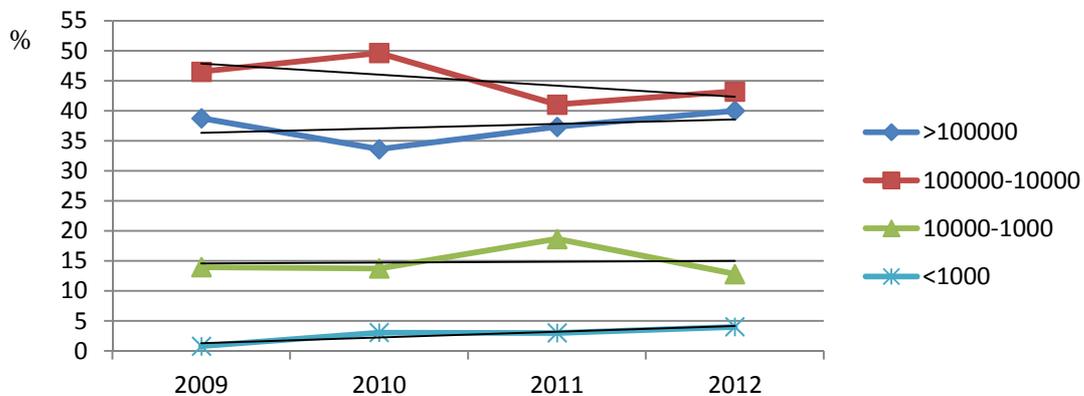


Figura 4.7. Representación del % de la carga viral de VIH (copias/ml) de pacientes naïve incluidos en el estudio.

Nota: Añadida la línea de tendencia en cada grupo.

4.3. Estudio de las mutaciones asociadas a resistencia a antirretrovirales del VIH. Comparación en pacientes naïve (resistencias primarias) y pacientes tratados durante los años 2009-2012.

A continuación se muestran el número de resistencias y actividades disminuidas por año y familia antirretroviral a partir de las secuencias incluidas en el estudio.

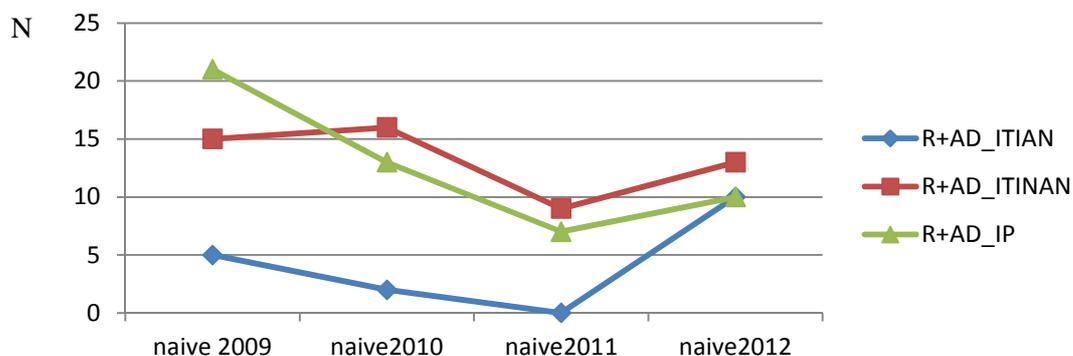


Figura 4.8. Número total de resistencias y actividades disminuidas a fármacos de ITIAN, ITINAN e IPs en los cuatro años de estudio entre los pacientes naïve. Nota: R (resistencia), AD (actividad disminuida).

Entre los pacientes naïve, la tendencia del número de mutaciones de resistencia o que afectaran a la actividad de algún antirretroviral de alguna de las tres familias (ITIAN, ITINAN, IP) estaba disminuyendo hasta el año 2011, a partir del cual han ido aumentando.

Entre pacientes con subtipo no B, encontramos las siguientes mutaciones primarias en la retrotranscriptasa: K103N (8.3%), V106I (6.7%) y M41L, K65R, D67N, V106M y M184V, con una frecuencia de 3.3% cada una. En la proteasa, L10V con una frecuencia del 43.3%, era la mutación más representativa.

En términos de % total de resistencias a algún fármaco, los datos se resumen en la siguiente tabla.

Tabla 4.8. Porcentajes de resistencia entre las distintas familias de ARV entre pacientes naïve.

Año	Pacientes naïve (N=525)	Alguna resistencia (%)	Resistencia ITIAN (%)	Resistencia ITINAN	Resistencia IP
2009	128	12.5	1.6	5.5	8.6
2010	132	13.6	0.75	6.0	7.5
2011	142	4.9	0.0	2.8	2.1
2012	123	8.1	1.6	4.9	2.4

La presencia de un 8.1% de cepas de pacientes naïve con alguna mutación de resistencia (resistencias primarias) es similar a los datos recientemente publicados en la Guía 2013 de GeSIDA y otras publicaciones europeas.

Entre los pacientes tratados (Figura 4.9), observamos un marcado descenso de cepas resistentes en las tres familias, llegando a ser estadísticamente significativo en las familias de los ITIANs e IPs. Entre los motivos de este fenómeno se destacarían, por un lado, el aumento de la adherencia al tratamiento, por otro, la sustitución de antiguos antirretrovirales por otros de la misma familia que poseen barreras genéticas más altas. Ejemplos de esto último serían el cambio del uso de AZT, d4T y ddI por ABC y TDF en el caso de ITIAN; NVP y EFV por ETV y RPV en los ITINAN y en el caso de los IPs del cambio de SQV, FPV y NFV por ATV, TPV, LPV y DRV.

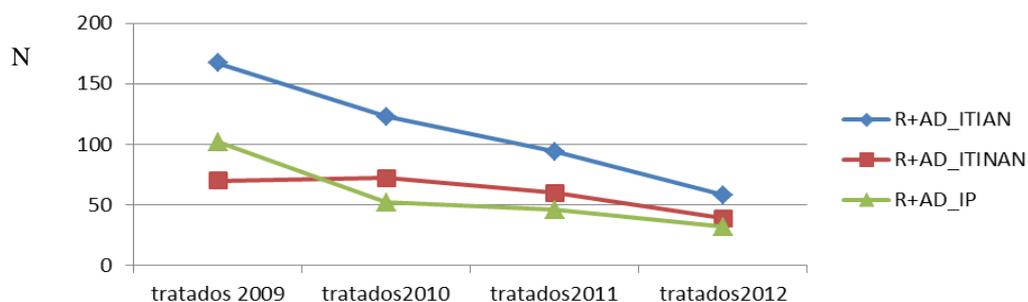


Figura 4.9. Número total de resistencias y actividades disminuidas a fármacos de ITIAN, ITINAN e IPs en los cuatro años de estudio entre los pacientes tratados. Nota: R (resistencia), AD (actividad disminuida).

4.4. Mutaciones asociadas a resistencia y/o disminución de la actividad del TAR. Comparación entre subtipos B y no B de la población de estudio.

A continuación se describen por familia de fármacos, aquellas mutaciones que afectan a la actividad de los antirretrovirales encontradas con una frecuencia superior al 1% entre las secuencias de todos los pacientes analizados en la fase de estudio.

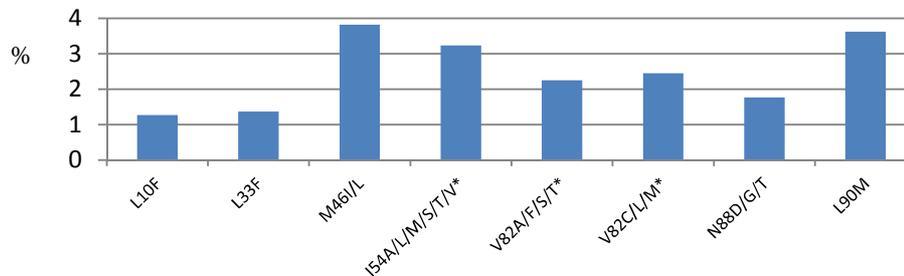


Figura 4.10. Mutaciones asociadas a resistencia a IPs que presentan una frecuencia superior al 1% entre todas las secuencias analizadas en los periodos 2009-2012. Nota: * mutaciones que por sí afectan a las actividad del fármaco (las indicadas sólo afectan al FPV).

Sólo las mutaciones recogidas en la Figura 4.10 se encontraron con una frecuencia superior al 1% y ninguna de ellas compromete en gran medida a los principales IPs que se utilizan en la actualidad. Estos datos están en la línea de lo que describen guías y publicaciones nacionales.

Entre las mutaciones analizadas con frecuencia superior al 1% de la población de estudio, L33F, M46I/L y N88D/G/T se encontraron con mayor frecuencia entre los subtipos no B pero sin llegar a ser estadísticamente significativo (1.29% vs 2.25%; 3.75% vs 4.49% y 1.61% vs 3.37%, respectivamente). Entre las mutaciones con frecuencia menor al 1% en la población general, las siguientes mutaciones estaban en mayor frecuencia entre los subtipos no B con respecto a subtipos B: V11I, L24I, D30N y N88S. Ninguna de ellas compromete seriamente la actividad de fármacos de esta familia.

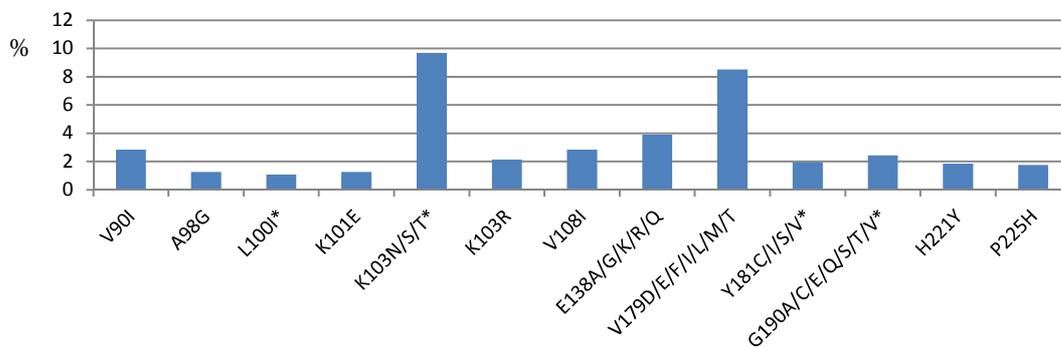


Figura 4.11. Mutaciones asociadas a resistencia a ITINANs que presentan una frecuencia superior al 1% entre todas las secuencias analizadas en los periodos 2009-2012. Nota: * mutaciones que por sí afectan a la actividad del fármaco (L100I, K103N/S/T y G190A/C/E/Q/S/T/V con NVP y EFV e Y181I/V en el caso de RPV).

En la figura 4.11 se recogen las mutaciones asociadas a resistencia a la familia de los ITINANs. De ellas destacan la conocida K103N que por sí afectan a la actividad de NVP y EFV, por otro lado la mutación en la posición V179 que aunque presenta un bajo grado de cambio en la sensibilidad, afecta a los cuatro fármacos de la familia. Esta mutación es más frecuente entre los subtipos no B de nuestra población con respecto a subtipos B (6.86% vs 25.84%, $p < 0.001$). Entre las mutaciones menores al 1% sólo la mutación V106A/M se encuentra con mayor frecuencia entre subtipos no B.

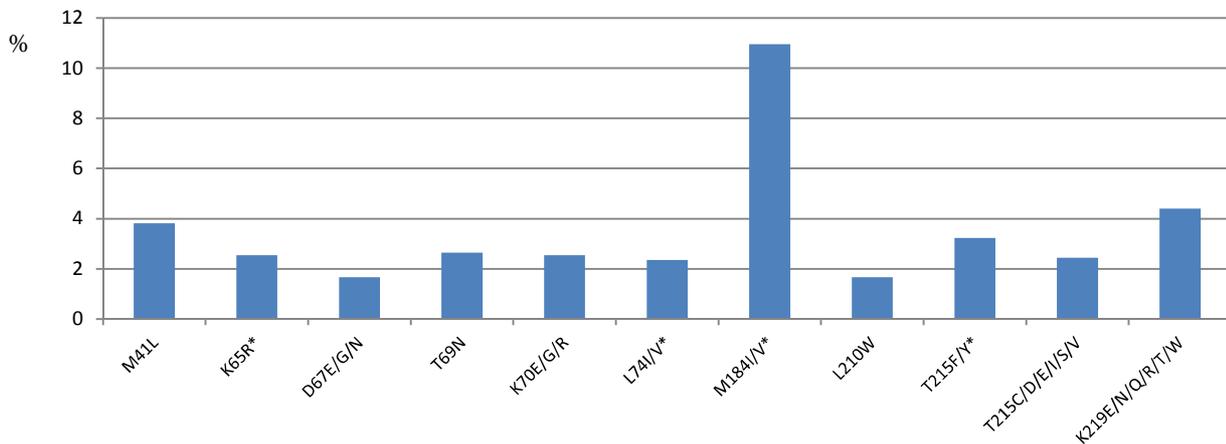


Figura 4.12. Mutaciones asociadas a resistencia a ITIANs que presentan una frecuencia superior al 1% entre todas las secuencias analizadas en los periodos 2009-2012. Nota: * mutaciones que por sí afectan a la actividad del fármaco.

Entre las mutaciones de la familia de los ITIANs (Figura 4.12), destaca la mutación M184I/V con una frecuencia superior al 10% en nuestra población. Esta mutación es más frecuente entre subtipos B que entre los no B de nuestra población (11.36% vs 6.74%, $p < 0.001$). Este dato se explica fácilmente por el mayor porcentaje de pacientes naïve con subtipo no B. En el caso de L210W y D67E/G/N son más frecuentes entre subtipos no B, igual que la sustitución en la posición V75 (mutación inferior al 1%).

4.4.1 Análisis de efectividad (definido como CV<50 copias o indetectable) de los ARVs usados según el subtipo infectante.

Este estudio se realizó en los subtipos A1, C, CRF02_AG y F1 por tener un mayor número de pacientes que permitirían obtener un resultado más significativo.

1. **Subtipo A1.** Incluidos en este subanálisis un total de 12 pacientes (tabla 4.9).

Tabla 4.9. Datos demográficos de los pacientes incluidos con subtipo A1.

Código	HOSPITAL	AÑO	SEXO	EDAD	NACIONALIDAD	PAIS_INF	FACT_RIESGO	MOTIVO_PET	ADHERENCIA	COINFECCION	OTRAS_INF
CAD2	PUERTAMAR	2009	H	46	ESPAÑA	ESPAÑA	HOMOSEXUAL	NAIVE	REGULAR	NO	NO
CAD3	PUERTAMAR	2009	H	36	ESPAÑA	ESPAÑA	HOMOSEXUAL	NAIVE	BUENA	NO	NO
CAD4	PUERTAMAR	2010	H	54	ESPAÑA	ESPAÑA	HOMOSEXUAL	NAIVE	PERDIDA_SEG	NO	NO
CAD6	PUERTAMAR	2010	H	48	ESPAÑA	ESPAÑA	UDVP	NAIVE	EXITUS	NO	NO
CAD9	PUERTAMAR	2011	H	58	ESPAÑA	ESPAÑA	HETEROSEXUAL	NAIVE	BUENA	NO	NO
JER1	JEREZ	2009	H	41	ESPAÑA	ESPAÑA	HOMOSEXUAL	PRIMOINFECCION	BUENA	NO	CMV
JER3	JEREZ	2010	H	32	BOLIVIA	ESPAÑA	HOMOSEXUAL	NAIVE	PERDIDA_SEG	VHA	NO
JER4	JEREZ	2010	H	45	ESPAÑA	ESPAÑA	HOMOSEXUAL	NAIVE	BUENA	NO	CMV,SIFILIS
JER6	JEREZ	2011	H	45	ESPAÑA	ESPAÑA	DESCONOCIDO	NAIVE	BUENA	VHA	SIFILIS
HUE24	INFANTA	2011	H	26	ESPAÑA	ESPAÑA	HOMOSEXUAL	NAIVE	BUENA	NO	NO
VAL1	VALME	2010	H	32	ESPAÑA	ESPAÑA	HETEROSEXUAL	PRIMER FRACASO	BUENA	NO	NO
VAL3	VALME	2011	H	25	ESPAÑA	ESPAÑA	HOMOSEXUAL	NAIVE	PERDIDA_SEG	NO	NO

En la figura 4.13 se incluye la evolución de las CV de los 8 pacientes a lo largo de su seguimiento en sus respectivas consultas (excluidos las pérdidas de seguimiento).

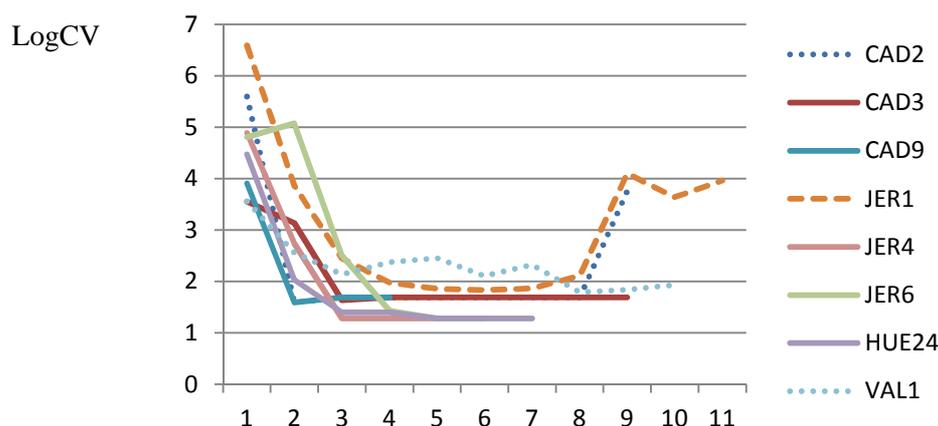


Figura 4.13. LogCV en las distintas determinaciones de pacientes con subtipo A1.

De los 8 pacientes incluidos, 5 consiguieron carga viral indetectable estable durante las sucesivas consultas, todos ellos declararon una total adherencia al tratamiento. Tres de ellos comenzaron (y continúan) con EFV/FTC/TDF (Atripla), uno comenzó (y continúa) con FTC/TDF/LPV/r, y el último de ellos comenzó con FTC/TDF/LPV/r y cambió a monoterapia con LPV/r.

Los 3 pacientes con subtipo A1 que no consiguieron una carga viral indetectable incluían los siguientes regímenes:

1. Los tratamientos previos fueron: EFV/FTC/TDF seguido de ABC/FTC/ETV, DRV_r/ETV/RAL, DRV/FTC/TDF para finalizar con monoterapia de DRV/r. En ningún momento el paciente

consiguió CV<50 copias/ml. El paciente, con obesidad tipo I, indicaba una buena adherencia. No seleccionó ninguna mutación de resistencia a lo largo del estudio.

2. Comenzó con EFV/3TC/TDF y cambió a ABC/AZT/DRV. Mala adherencia (<60%) que seleccionó la mutación K103N.
3. Comenzó con EFV/FTC/TDF y cambió a FTC/TDF/DRVr y posteriormente a RPV/FTC/TDF. Buena adherencia. No seleccionó mutaciones de resistencia a lo largo del estudio.

Estos pacientes tenían un recuento CD4 inferior a 200 CD4/ml (rango: 11-139) al inicio del tratamiento (inmunosupresión severa) y dos de ellos presentaban una CV>100.000 copias/ml. Los otros cinco pacientes que consiguieron carga viral indetectable comenzaron el tratamiento con recuento CD4 >380 (mediana de 419), mientras que la CV inicial no superó en ningún caso las 77.000 copias/ml (rango: 3.545-77.000, mediana de 29.691 copias/ml).

2. **Subtipos C.** Incluidos 8 pacientes (tabla 4.10).

Tabla 4.10. Datos demográficos de los pacientes incluidos con subtipo C.

Código	HOSPITAL	AÑO	SEXO	EDAD	NACIONALIDAD	PAIS_INF	FACT_RIESGO	MOTIVO_PET	ADHERENCIA	COINFECCION	OTRAS_INF
CAD7	PUERTAMAR	2010	M	50	ESPAÑA	ESPAÑA	HETEROSEXUAL	NAIVE	EXITUS	NO	NO
JER16	JEREZ	2012	H	45	ESPAÑA	ESPAÑA	HETEROSEXUAL	NAIVE	NO TTO	NO	NO
HUE23	JRI	2009	H	23	GUINEA	GUINEA	HETEROSEXUAL	NAIVE	PERDIDA_SEG	NO	NO
VAL4	VALME	2012	H	50	ESPAÑA	MOZAMBIQUE	DESCONOCIDO	NAIVE	BUENA	VHC	NO
VAL5	OSUNA	2010	M	54	PORTUGAL	PORTUGAL	HETEROSEXUAL	PRIMOINFECCION	BUENA	NO	NO
VAL6	VALME	2012	H	32	ESPAÑA	ESPAÑA	DESCONOCIDO	NAIVE	BUENA	NO	NO
VAL13	VALME	2012	H	48	ESPAÑA	ESPAÑA	HOMOSEXUAL	PRIMOINFECCION	NO TTO	NO	EBV,TOXO
OSU1	OSUNA	2011	H	46	PORTUGAL	PORTUGAL	HETEROSEXUAL	NAIVE	BUENA	NO	NO

En la figura 4.14 se incluye la evolución de las CV de los 8 pacientes a lo largo de su seguimiento en sus respectivas consultas (excluidos las pérdidas de seguimiento).

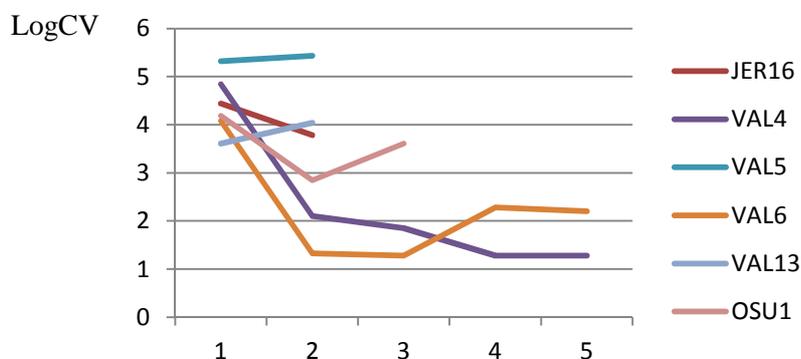


Figura 4.14. LogCV en las distintas determinaciones de pacientes con subtipo C.

Dos pacientes no se incluyeron en este análisis por pérdida de seguimiento (uno por traslado, el otro por exitus en 2010 por una Leuco-encefalopatía multifocal progresiva). Tres pacientes sólo tuvieron dos determinaciones de la carga viral en el momento del presente estudio, por lo que no podemos concluir nada de ellos. De ellos dos pacientes difirieron el inicio de tratamiento.

Sólo tres pacientes tenían 3 o más determinaciones del recuento CD4 y CV. Dos de ellos no consiguieron CV indetectable. Ambos pacientes comenzaron el TAR con EFV/FTC/TDF (Atripla) y sus CV iniciales en el momento inicial de tratamiento eran similares (12000 y 15300 respectivamente), así como el recuento CD4 (300 y 320). El paciente OSU1 cambió su TAR a MRV/DRVr y posteriormente MRV/DRV/FTC/TDF sin conseguir carga viral indetectable. Ninguno de ellos seleccionó mutaciones de resistencia.

Sólo un paciente consiguió carga viral indetectable. Este paciente comenzó un TAR compuesto por EFV/FTC/TDF (Atripla). Este paciente comenzó el TAR con CV=66.900 copias/ml y recuento CD4 de 23 cel/mm. Se trataba de un paciente coinfectado con VHC con una buena adherencia.

Con estos pocos pacientes y número de determinaciones de CV y CD4 no podemos realizar un estudio más exhaustivo.

3. Subtipos CRF02_AG: Incluidos 15 pacientes (tabla 4.11).

Tabla 4.11. Datos demográficos de los pacientes incluidos con subtipo CRF02_AG.

Código	HOSPITAL	AÑO	SEXO	EDAD	NACIONALIDAD	PAIS_INF	FACT_RIESGO	MOTIVO_PET	ADHERENCIA	COINFECCION	OTRAS_INF
CAD5	PUERTAMAR	2010	M	17	ESPAÑA	ESPAÑA	HETEROSEXUAL	PRIMER FRACASO	PERDIDA_SEG	NO	NO
JER2	JEREZ	2010	H	36	NIGERIA	NIGERIA	HETEROSEXUAL	NAIVE	PERDIDA_SEG	NO	NO
HUE1	INFANTA	2009	H	31	ESPAÑA	ESPAÑA	HOMOSEXUAL	NAIVE	BUENA	VHA	CMV
HUE3	INFANTA	2010	H	29	ESPAÑA	ESPAÑA	HOMOSEXUAL	NAIVE	BUENA	NO	CMV
HUE4	INFANTA	2012	H	33	SENEGAL	SENEGAL	HETEROSEXUAL	NAIVE	BUENA	NO	NO
HUE9	INFANTA	2010	M	41	ESPAÑA	ESPAÑA	HETEROSEXUAL	NAIVE	BUENA	VHC-VPH	CT/CMV
HUE10	INFANTA	2011	M	43	RUMANIA	RUMANIA	HETEROSEXUAL	NAIVE	REGULAR	NO	NO
HUE13	INFANTA	2012	H	43	GHANA	GHANA	HETEROSEXUAL	NAIVE	BUENA	VHC	NO
HUE17	JRJ	2009	H	49	ESPAÑA	ESPAÑA	HETEROSEXUAL	NAIVE	BUENA	NO	NO
HUE19	JRJ	2009	H	48	ESPAÑA	ESPAÑA	DESCONOCIDO	NAIVE	PERDIDA_SEG	NO	NO
HUE20	JRJ	2009	H	38	GUINEA	GUINEA	DESCONOCIDO	NAIVE	PERDIDA_SEG	NO	NO
HUE29	INFANTA	2010	M	39	CAMERUN	CAMERUN	HETEROSEXUAL	NAIVE	BUENA	VHC	NO
VAL9	VALME	2011	H	46	ESPAÑA	ESPAÑA	HETEROSEXUAL	NAIVE	BUENA	NO	NO
VAL10	VALME	2012	M	40	ESPAÑA	ESPAÑA	HETEROSEXUAL	NAIVE	BUENA	NO	NO
VAL12	VALME	2012	H	45	ESPAÑA	ESPAÑA	HETEROSEXUAL	NAIVE	BUENA	NO	NO

En figura 4.15 se incluye la evolución de las CV de los 8 pacientes a lo largo de su seguimiento en sus respectivas consultas (excluidos las pérdidas de seguimiento y pacientes con menos de dos determinaciones de carga viral).

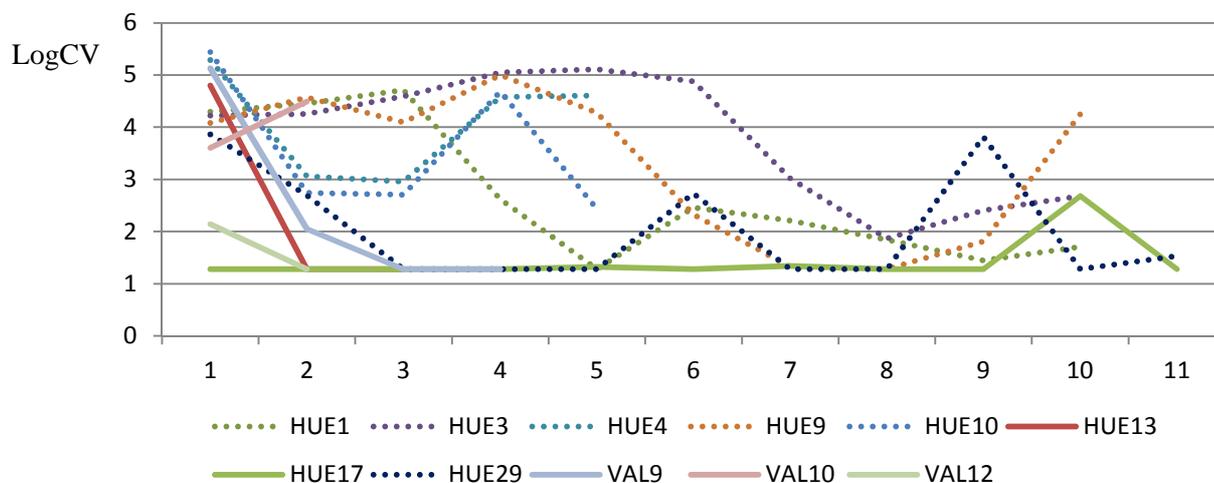


Figura 4.15. LogCV en las distintas determinaciones de pacientes con subtipo CRF02_AG.

En este grupo el factor de riesgo mayoritario fue el heterosexual (11/15). Hubo cuatro pérdidas de seguimiento. Del resto de pacientes, 4 de ellos consiguieron CV indetectable, de los cuales tenían como TAR: EFV/FTC/TDF (Atripla) y uno de ellos comenzó con FTC/TDF/RAL (presentó varios blips a lo largo del estudio, quizás porque el estudio de resistencia a mutaciones de la integrasa resultó como actividad disminuida para raltegravir). En cuanto a CV, los tres pacientes que recibieron Atripla comenzaron con una CV inicial inferior a 10000 copias y CD4 (entre 154 y 404), todos con adherencia del 100%. El paciente que inició con el otro tratamiento (FTC/TDF/RAL) tenía una CV de 63000 copias (4.800) y CD4 igual a 2 cel/mm. Ninguno de estos pacientes seleccionó mutaciones de resistencia a lo largo del estudio.

Los pacientes con fracaso virológico comenzaron su TAR con EFV/FTC/TDF (4 pacientes), un paciente con 3TC/AZT/LPVr (posterior cambio a DRV/ETV/RAL) y otro con FTC/TDF/ATVr. Un paciente no comenzó TAR. Todos los pacientes con fracaso con Atripla presentaban una CV con un rango de 52000 y 276000 copias. Los otros dos tratamientos comenzaron con una CV inicial de 7288 (3.863) y 12000 (4.079). Ambos pacientes eran coinfectados por VHC. Ninguno de estos pacientes tenía o seleccionó ninguna mutación de resistencia a lo largo del estudio.

Con cargas virales altas (en este estudio a partir de 52.000 copias) Atripla parece no ser un tratamiento adecuado para pacientes portadores de subtipos CRF02_AG. Los tratamientos con 3TC/AZT/LPVr y FTC/TDF/ATVr tampoco fueron efectivos, pero sólo hubo un paciente de cada con este régimen. Sin embargo, Atripla parece ser efectivo en este grupo de pacientes si la carga viral es inferior a 10.000 copias, así como FTC/TDF/RAL como terapia de inicio.

4. Subtipos F1. Incluidos 20 pacientes.

Tabla 4.12. Datos demográficos de los pacientes incluidos con subtipo F1.

Código	HOSPITAL	AÑO	SEXO	EDAD	NACIONALIDAD	PAIS_INF	FACT_RIESGO	SUBTIPO	MOTIVO_PET	ADHERENCIA	COINFECCION	OTRAS_INF
JER5	JEREZ	2010	M	41	ESPAÑA	ESPAÑA	HETEROSEXUAL	F1	NAIVE	ABANDONO	VHA	CMV
JER8	JEREZ	2011	H	22	RUMANIA	RUMANIA	VERTICAL	F1	PRIMER FRACASO	PERDIDA_SEG	NO	NO
JER12	JEREZ	2012	H	29	ESPAÑA	ESPAÑA	HOMOSEXUAL	F1	NAIVE	SIN TTO	NO	CMV,VEB
JER14	JEREZ	2012	H	37	ESPAÑA	ESPAÑA	HOMOSEXUAL	F1	PRIMOINFECCION	BUENA	NO	NO
JER15	JEREZ	2012	H	38	ESPAÑA	ESPAÑA	HOMOSEXUAL	F1	NAIVE	SIN TTO	NO	NO
JER17	JEREZ	2012	H	29	ESPAÑA	ESPAÑA	HOMOSEXUAL	F1	NAIVE	BUENA	NO	NO
HUE5	INFANTA	2011	H	47	POLONIA	POLONIA	HETEROSEXUAL	F1	MULTIFRACASO	BUENA	VHC	CMV
HUE6	INFANTA	2010	M	26	RUMANIA	RUMANIA	HETEROSEXUAL	F1	NAIVE	BUENA	VHB	CMV
HUE7	INFANTA	2010	M	25	RUMANIA	RUMANIA	VERTICAL	F1	SEGUNDO FRACASO	BUENA	NO	CMV
HUE8	INFANTA	2011	H	35	ESPAÑA	ESPAÑA	HOMOSEXUAL	F1	NAIVE	PERDIDA_SEG	NO	CMV
HUE11	INFANTA	2010	H	28	RUMANIA	RUMANIA	HETEROSEXUAL	F1	NAIVE	BUENA	NO	NO
HUE14	INFANTA	2012	H	26	ESPAÑA	ESPAÑA	HETEROSEXUAL	F1	NAIVE	SIN TTO	NO	NO
HUE21	JRJ	2009	M	26	RUMANIA	RUMANIA	HETEROSEXUAL	F1	NAIVE	BUENA	NO	NO
HUE22	JRJ	2009	H	28	RUMANIA	RUMANIA	HETEROSEXUAL	F1	NAIVE	BUENA	VHB	CMV
HUE25	INFANTA	2010	M	52	ESPAÑA	ESPAÑA	HEMO	F1	MULTIFRACASO	BUENA	NO	NO
HUE28	INFANTA	2011	H	31	ESPAÑA	ESPAÑA	DESCONOCIDO	F1	NAIVE	PERDIDA_SEG	NO	NO
HUE30	INFANTA	2010	M	6	RUMANIA	RUMANIA	DESCONOCIDO	F1	PRIMER FRACASO	PERDIDA_SEG	NO	NO
HUE36	INFANTA	2011	M	39	RUMANIA	RUMANIA	HOMOSEXUAL	F1	NAIVE	SIN TTO	VHC	NO
VAL7	VALME	2010	H	28	RUSIA	RUSIA	ADPV	F1	NAIVE	PERDIDA_SEG	VHC	TOXO
VAL8	VALME	2012	H	40	ESPAÑA	ESPAÑA	HOMOSEXUAL	F1	OTROS	BUENA	NO	NO

En este grupo hay 5 pérdidas de seguimiento, 4 pacientes que no iniciaron tratamiento y un abandono. Los diez pacientes restantes presentaban una buena adherencia.

Cuatro pacientes consiguieron CV indetectable empleando como TAR: EFV/FTC/3TC, RPV/FTC/TDF, DRV/ETV/RAL y 3TC/ABC/EFV/RAL, respectivamente.

Entre los pacientes que no consiguieron una carga viral indetectable, no encontramos diferencias en la CV basal, recuento CD4, tratamientos o mutaciones asociadas a resistencia que los diferencie con los pacientes que si consiguieron la indetectabilidad. Entre dichas mutaciones encontramos un paciente que seleccionó K103N, M184V y P225H, mientras que otro seleccionó M41L, D67N, M184V, L210W y T215Y. El resto de pacientes no presentaban mutaciones mayoritarias asociadas a resistencia.

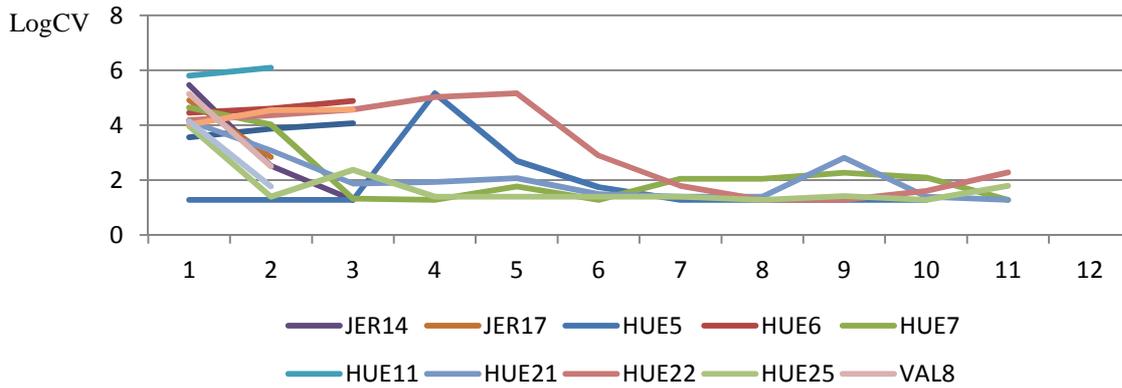


Figura 4.16. LogCV en las distintas determinaciones de pacientes con subtipo F1.

4.4.2. Respuesta virológica en subtipos no B de nuestra área.

Entre los pacientes con subtipo no B incluidos en el presente estudio, 17 pacientes tenían sólo una determinación de carga viral realizada en el momento del análisis (pérdida de seguimiento o últimos pacientes de 2012 con sólo una visita). Del resto de pacientes (con dos o más determinaciones), 17 pacientes consiguieron respuesta virológica (Figura 4.17), lo que supone que sólo un 32% de estos pacientes consiguen una carga viral indetectable (24% si consideramos todos los subtipos no B incluidos en el estudio).

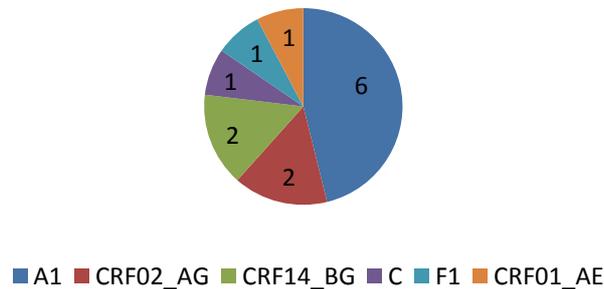


Figura 4.17. Número de pacientes que consiguieron respuesta virológica y subtipos.

4.5. Estudio de polimorfismos en la proteasa y retrotranscriptasa en subtipos no B de VIH-1.

Se han incluido un total de 1022 secuencias y analizado los subtipos no B con mayor número de secuencias detectadas a lo largo del estudio, es decir, la de los subtipos A1, C, CRF02_AG, F1 y CRF14_BG. En **negrita** se resaltan los polimorfismos que se encontraron en el 100% de las secuencias analizadas.

a) Subtipo A1.

Se han incluido 18 secuencias de este subtipo, 11 de las cuales eran de pacientes naïve en el momento de la petición. A continuación se describen los polimorfismos encontrados según el aa y posición en la cepa de referencia y el aa encontrado, así como el % de secuencias de dicho subtipo que la presentaban en la proteasa viral y la retrotranscriptasa.

Proteasa

Aa wild type	L	I	I	G	E	M	N	R	R	D	H	K	L
Posición	10	13	15	16	35	36	37	41	57	60	69	70	89
Aa mutación	V	V	V	E	D	I	D	K	K	E	K	R	M
%	89	94	67	39	100	100	89	100	100	89	100	89	94

Si atendemos al listado de mutaciones publicado en la guía del IAS-USA 2013, si se recogen estos polimorfismos como mutaciones asociadas a resistencia a IPs: L10V (ATZ, FPV, LPV y TPV), G16E (ATZ), K20R (ATZ y LPV), M36I (ATZ, TPV), D60E (ATZ), H69K y (TPV). Según este listado y los polimorfismos presentes en este subtipo, el IP que no se recomendaría su uso sería atazanavir. Estas mutaciones no se recogen en la Guía RIS 2013.

Retrotranscriptasa

Aa wild type	V	K	I	K	Q	D	V	Q	T	Q	R	V
Posición	60	122	135	173	174	177	179	197	200	207	211	245
Aa mutación	I	E	T	A/I	K	E	E	I	A	A	S	E
%	77	89	94	39/39	89	94	89	83	77	83	83	61

V179E (presente en el 89% de las secuencias analizadas), se encuadra en el grupo 1 de resistencias (Guía RIS 2013) afectando a la actividad de NVP, EFV y ETR. En la guía IAS-USA 2013 no se recoge ninguna de las anteriores.

b) Subtipo C

De este subtipo se han analizado un total de 12 secuencias con los siguientes resultados en proteasa y retrotranscriptasa.

Proteasa.

Aa wild type	T	I	L	K	E	M	R	H	L	I
Posición	12	15	19	20	35	36	41	69	89	93
Aa mutación	S	V	I	R	D	I/V	K	K	M	L
%	58	67	50	33	33	58	83	100	83	83

Ningún polimorfismo asociado a resistencia según guía RIS 2013. En la IAS se recogen como mutaciones K20R (ATZ y LPV), M36I (ATZ, TPV), H69K (TPV), L89M (TPV) e I93L (ATZ). Con estas mutaciones, para este subtipo no sería recomendable el uso de atazanavir y tipranavir.

Retrotranscriptasa.

Aa wild type	T	E	S	K	D	K	Q	V	T	Q	R	F	V
Posición	39	40	48	122	123	173	174	177	200	207	211	214	245
Aa mutación	E	D	T	E	S	A	K	E	A	E/A	K	L	Q/A
%	92	33	75	92	67	67	50	75	100	58/25	83	50	83/17

Ningún polimorfismo asociado a resistencia recogido en RIS o IAS 2013.

c) Subtipo F1.

De este subtipo se han analizado un total de 17 secuencias con los siguientes resultados.

Proteasa.

Aa wild type	L	I	I	G	K	E	M	R	R	Q	L	E	I	L
Posición	10	13	15	16	20	35	36	41	57	61	63	65	72	89
Aa mutación	V	V	V	E	R	D	D	K	K	N	T	D	T/V	M
%	59	47	76	53	41	94	94	100	100	41	59	71	47/24	65

En la guía IAS se recogen L10V (ATZ, LPV y TPV), G16E (ATZ), K20R (ATZ y LPV) y L89M (TPV). Con estos polimorfismos los fármacos que más se ven comprometidos serían atazanavir, lopinavir y tipranavir.

Retrotranscriptasa

Aa wild type	E	V	D	I	S	K	Q	T	Q	R	V
Posición	40	60	123	135	162	173	174	200	207	211	245
Aa mutación	D	I	E	L/V-T	C/H	T/A-V	K	A/Q-I	A-D-E-K	K	Q
%	41	47	82	82/18	64/36	53/47	100	65/29	100	100	94

Ningún polimorfismo asociado a resistencia.

d) CRF02 AG

De este subtipo se han analizado un total de 17 secuencias con los siguientes resultados.

Proteasa

Aa wild type	I	K	K	M	R	V	H	L
Posición	13	14	20	36	41	60	69	89
Aa mutación	V/G	R	I	I	K	I	K/R	M
%	94/6	59	94	100	76	47	94/6	100

Ningún polimorfismo asociado a resistencia según RIS, mientras que IAS recoge K20R (ATZ), M36I (ATZ, TPV), H69K/R (TPV) y L89M (TPV). En este subtipo los fármacos más afectados serían atazanavir y tipranavir).

Retrotranscriptasa

Aa wild type	K	I	S	K	Q	D	I	T	Q	R	V
Posición	122	135	162	173	174	177	178	200	207	211	245
Aa mutación	E	V/K-T-L	A	T/A	K/A-E-D-R-P	E	M	A/E	E/A-D-K	K/TE	Q/E-K
%	35	35/29	100	71/18	59/29	94	47	76/18	59/18	59/18	71/12

Ningún polimorfismo asociado a resistencia.

e) **CRF14_BG**

De este subtipo se han analizado un total de 6 secuencias con los siguientes resultados.

Proteasa

Aa wild type	I	K	K	M	R	H	V	L
Posición	13	14	20	36	41	69	82	89
Aa mutación	V	R	I	I	K	K	I	M
%	100							

IAS recoge K20I (ATZ) y V82I (ATZ) como mutaciones. En este subtipo se vería disminuida la efectividad de atazanavir.

Retrotranscriptasa

Aa wild type	K	V	A	K	Q	D	T	V
Posición	43	60	98	122	174	177	200	245
Aa mutación	R	A	S	E	K/E	E	A	Q/T
%	50	67	67	67	83-17	83	83	83-17

Ningún polimorfismo asociado a resistencia.

4.5.1. Estudio de polimorfismos en proteasa y retrotranscriptasa únicos o mayoritarios de subtipos no B.

1. Polimorfismos sólo encontrados en la proteasa de subtipos no B.

Tabla 4.13. Listado de polimorfismos encontrados sólo en subtipos no B.

Polimorfismo	No B (n seq)	No B (%)	Subtipo
L10R	1	1,1	CRF02_AG
V11F	1	1,1	CRF02_AG
I13G	1	1,1	CRF02_AG
K14I	1	1,1	C
L19P	6	6,9	CRF02_AG (4), F1, CRF06_cpx
L23P	1	1,1	CRF02_AG
E34D	1	1,1	CRF02_AG
K45Q	1	1,1	CRF14_BG
C67E	4	4,6	G, CRF11_cpx(2), CRF14_BG
C67N	1	1,1	G
H69R	1	1,1	CRF02_AG
N83K	1	1,1	CRF14_BG
N88S	1	1,1	F1

Nota: incluidas en el análisis 87 secuencias de subtipos no B.

Sólo los polimorfismos L10R (reduce actividad de FPV, LPV y SQV) y N88S (reduce actividad ATZ) se recogen en la guía IAS-USA 2013.

2. Polimorfismos sólo encontrados en la retrotranscriptasa de subtipo no B.

Tabla 4.14. Listado de polimorfismos encontrados sólo en RT de subtipos no B.

Polimorfismo	No B (n seq)	No B (%)	Subtipo
T39G	2	2,3	CRF02_AG
T39L	2	2,3	CRF02_AG, CRF14_BG
T39M	1	1,1	F1
E40H	1	1,1	CRF02_AG
E42V	1	1,1	CRF01_AE
E44R	1	1,1	F1
N54K	1	1,1	A1
D67S	1	1,1	F1
S68T	1	1,1	CRF02_AG
V75I	1	1,1	F1
V75T	1	1,1	C
L80T	1	1,1	CRF02_AG
V90G	1	1,1	CRF02_AG
P97A	1	1,1	CRF02_AG
L100F	1	1,1	CRF02_AG
D113N	1	1,1	CRF01_AE
A114V	1	1,1	CRF02_AG
S134R	1	1,1	CRF02_AG
T139S	1	1,1	D
Q145C	1	1,1	C
Q151H	1	1,1	CRF11_cpx
Q161H	1	1,1	CRF11_cpx
T165A	1	1,1	C
E169R	1	1,1	CRF02_AG
K173L	5	5,7	A1(2), CRF01_AE(3)
K173V	5	5,7	F1(2), CRF14_BG(3)
Q174D	1	1,1	CRF02_AG
I178R	1	1,1	C
D186Y	1	1,1	F1
L187S	1	1,1	CRF02_AG
V189E	1	1,1	F1
S191A	1	1,1	F1
I195Q	3	3,4	F1 (3)
G196M	1	1,1	C
H198N	1	1,1	F1
T200Q	4	4,6	F1 (4)
K201Q	1	1,1	CRF11_cpx
E203A	1	1,1	CRF11_cpx
E204M	1	1,1	C
L228Q	2	2,3	F1 (2)
E233D	1	1,1	A1
L234P	1	1,1	A1
P236H	1	1,1	CRF11_cpx
Q242P	1	1,1	A1
P243H	2	2,3	F1, CRF11_cpx
V245D	1	1,1	CRF01_AE

Nota: incluidas en el análisis 87 secuencias de subtipos no B.

No hay descrito ningún polimorfismo entre los encontrados que se incluya como mutación asociado a resistencia. No podemos descartar que alguno por sí y el conjunto de alguno de ellos provoquen una disminución de la actividad o incluso resistencia a algún fármaco de la familia de los ITINAN o ITIAN.

3. Polimorfismos mayoritarios de subtipo no B en proteasa.

Tabla 4.15. Polimorfismos con mayor frecuencia en subtipo no B comparados con subtipos B. Nota: sólo se incluyen aquellos con una frecuencia mayor al 25% en subtipos no B.

Polimorfismo	B (%) N=935	No B (%) N=87
L10V	4,4	39,1
I13V	18,4	69,0
K14R	11,8	25,3
L15V	16,4	48,3
G16E	7,8	26,4
K20I	0,2	29,9
E35D	31,8	66,7
M36I	25,7	92,0
N37D	13,2	25,3
R41K	21,6	89,7
R57K	9,4	46,0
D60E	9,4	25,3
H69K	0,7	74,7
L89M	2,1	86,2

4. Polimorfismos mayoritarios de subtipo no B en retrotranscriptasa.

Tabla 4.16. Polimorfismos con mayor frecuencia en subtipo no B comparados con subtipos B en la retrotranscriptasa. Nota: sólo se incluyen aquellos con una frecuencia mayor al 20% en subtipos no B.

Polimorfismo	B (%) N=935	No B (%) N=87
V60I	23,3	52,9
K122E	34,9	57,5
D123E	23,1	27,6
I135T	30,1	35,6
K173A	0,2	29,9
K173T	0,3	34,5
Q174K	1,8	70,1
V177E	21,3	70,1
V179I	3,0	24,1
T200A	22,4	73,6
Q207A	1,7	36,8
Q207E	15,8	31,0
R211K	47,9	55,2
V245Q	1,7	58,6

Ninguno de estos polimorfismos se asocia a resistencia.

4.6. Análisis de clústers de subtipos no B.

1. Subtipo A1.

El análisis de las secuencias de las cepas con subtipo A1 reveló la existencia de un clúster formado por 8 de los 10 pacientes incluidos con este subtipo (Figura 4.18).

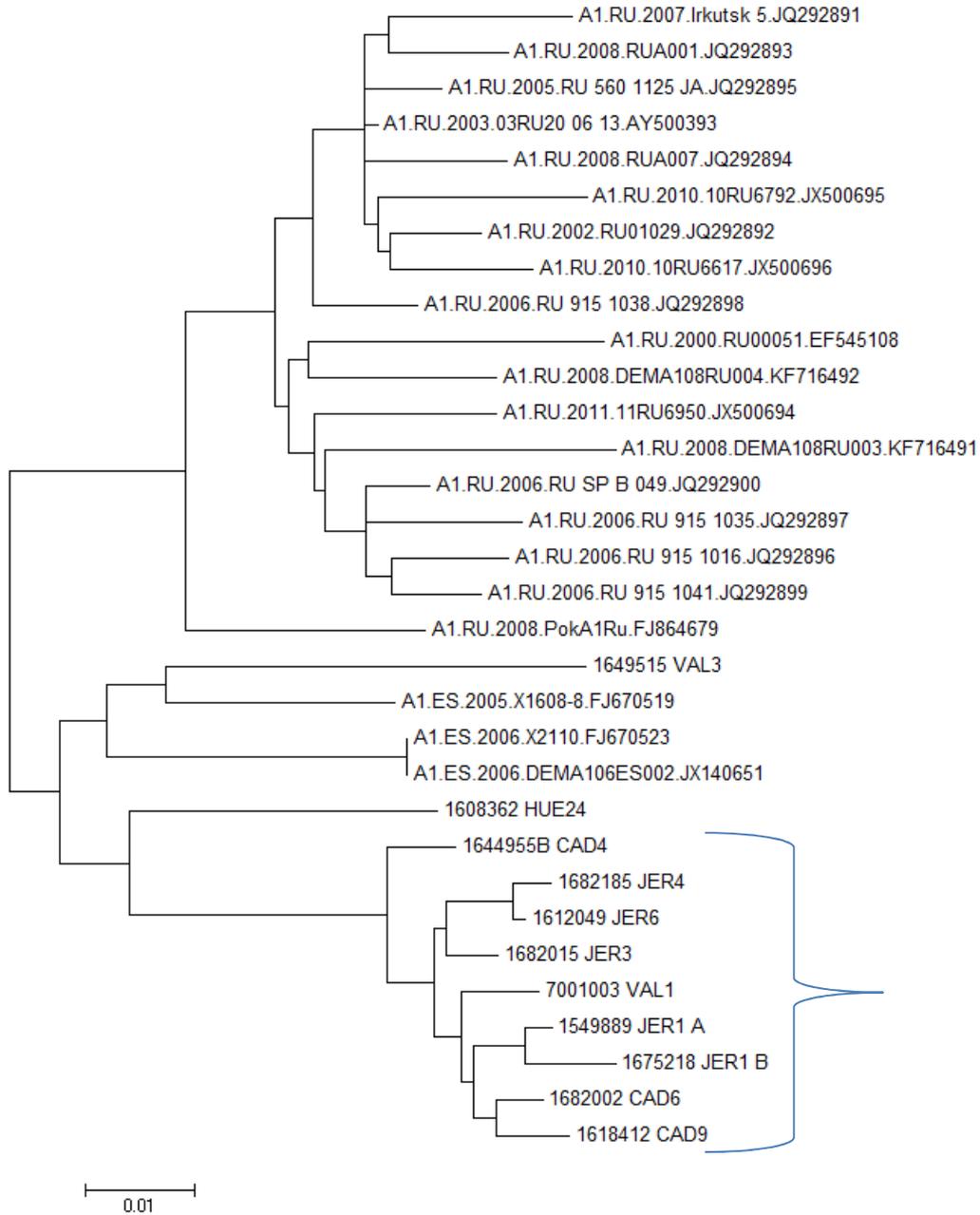


Figura 4.18. Análisis de clústers de subtipos A1. Se indica con el corchete el clúster encontrado.

2. Subtipo C.

El análisis de estas secuencias reveló que no existe ningún clúster definido para los pacientes con subtipo C en nuestra área de estudio (Figura 4.19).

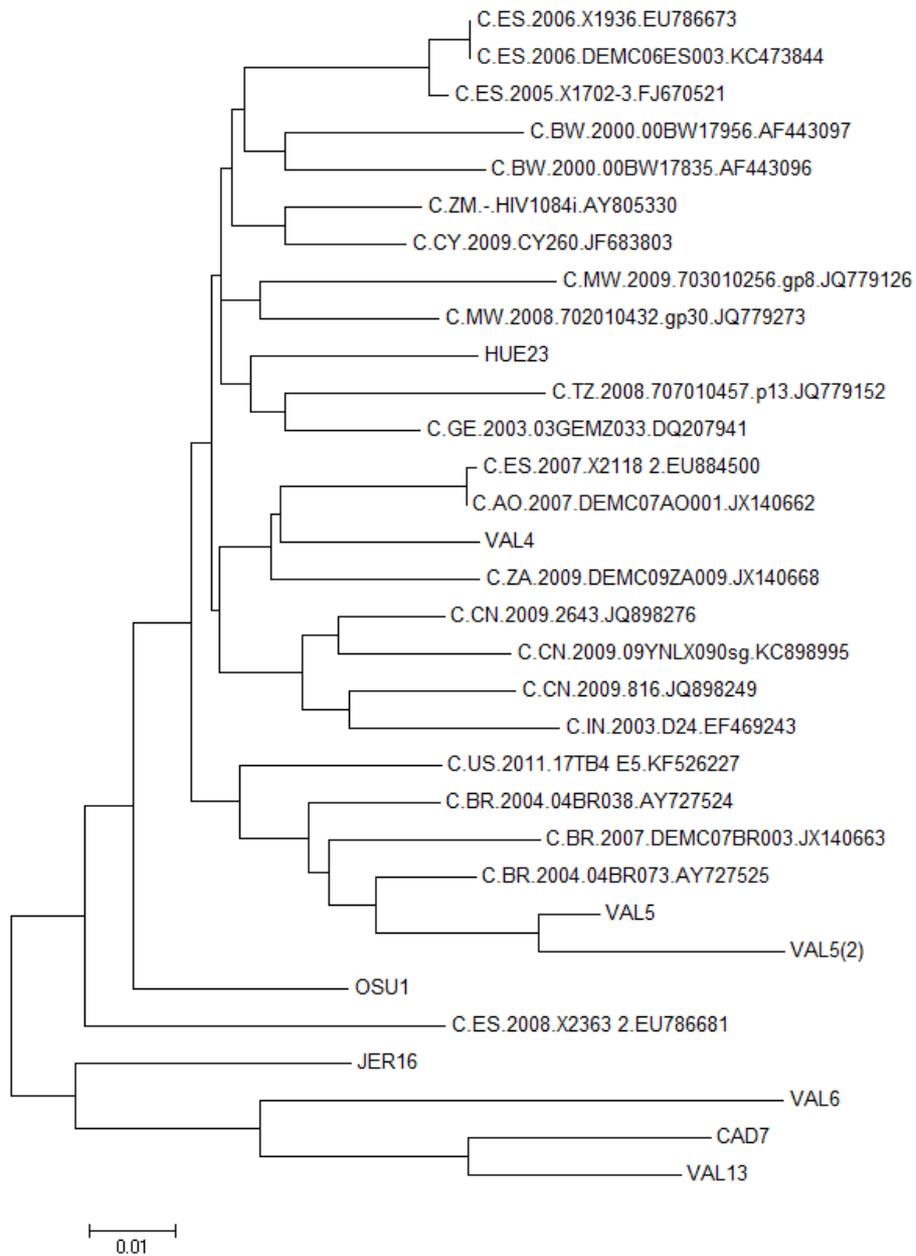


Figura 4.19. Análisis de clústers de subtipos C.

3. Subtipo CRF02_AG.

El análisis reveló que no existía ningún clúster definido para las cepas del subtipo CRF02_AG presentes en nuestra área de estudio (Figura 4.20).

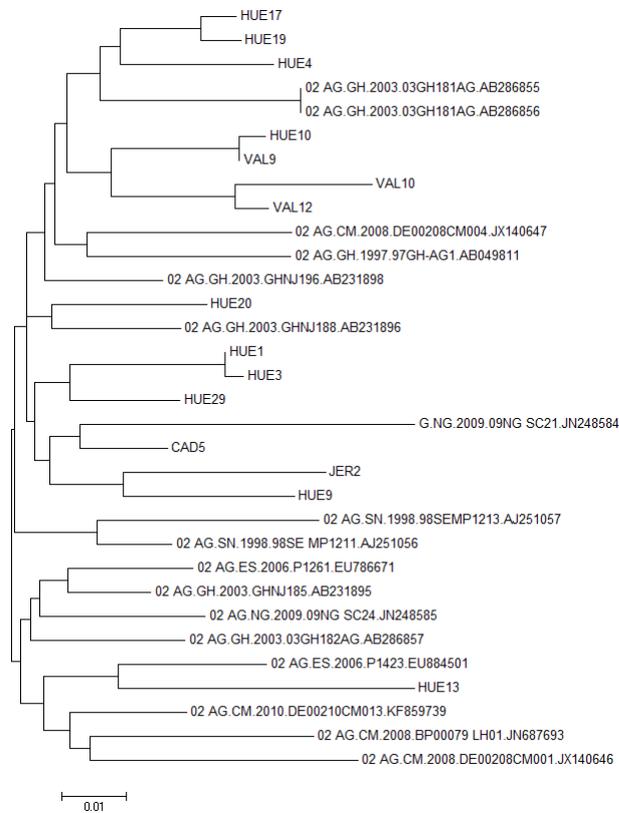


Figura 4.20. Análisis de clústers de subtipos CRF02_AG.

4. Subtipo CRF14_BG.

El análisis de estas secuencias reveló que no existe ningún clúster definido para estos pacientes (Figura 4.21).

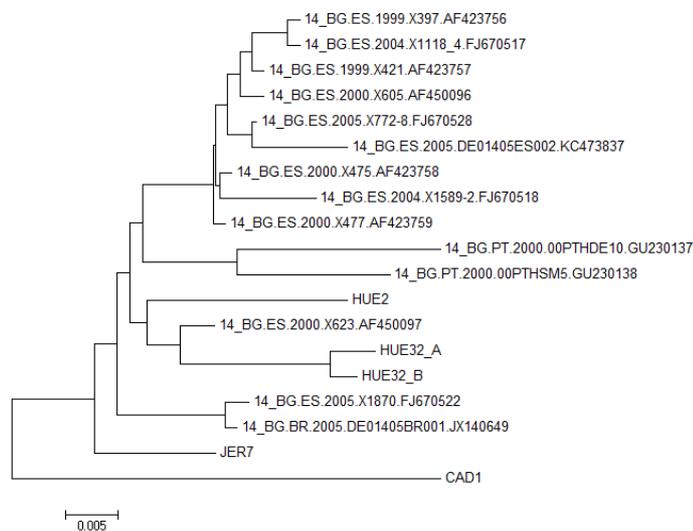


Figura 4.21. Análisis de clústers de subtipos CRF14_BG.

5. Subtipo F1.

El análisis de las secuencias de las cepas con subtipo F1 reveló la existencia de dos clústers formado por 4 y 3 pacientes cada uno, respectivamente (Figura 4.22). El clúster formado por 4 pacientes corresponde a individuos de una misma familia de Huelva de origen rumano.

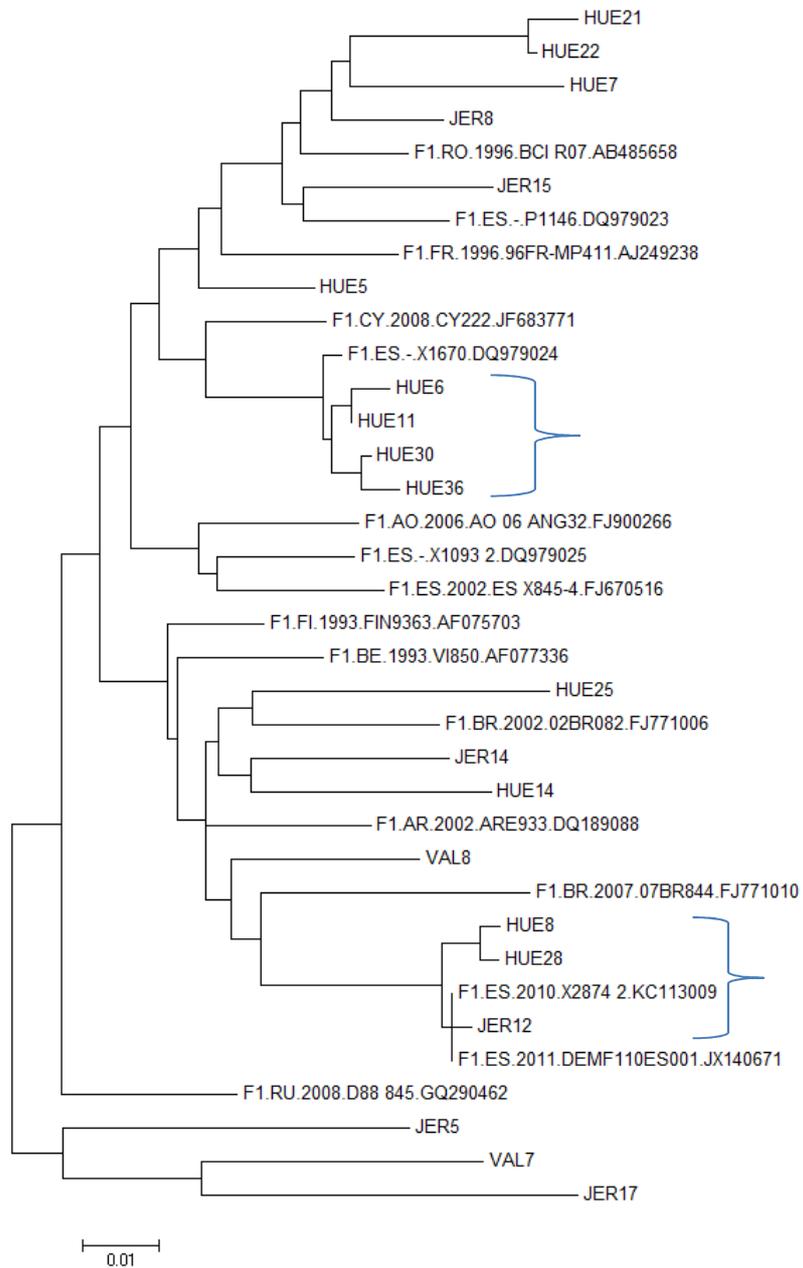


Figura 4.22. Análisis de clústers de subtipos F1. Se indica con el corchete los clúster encontrados.

4.7. Tropismo viral mediante la secuenciación de la región V3 de subtipos no B.

Esta determinación se realizó con éxito a 42 sueros de los 70 posibles (60%). Los sueros que no se testaron eran de 2009 y 2010, son previos al inicio de la determinación de esta prueba.

Entre los sueros que se obtuvo el tropismo viral, 35/42 (83%) tenían un tropismo CCR5, mientras que 7/42 (17%) tenían tropismo X4 o dual mixto. Las características de estos pacientes eran las siguientes:

Tabla 4.17: Características de los pacientes con tropismo X4.

Sexo	Edad	Motivo petición	Subtipo
Varón	50	Naïve	C
Varón	22	Primer fracaso	F1
Varón	46	Naïve	CRF02_AG
Varón	29	Naïve	CRF02_AG
Varón	43	Naïve	CRF02_AG
Varón	38	Naïve	CRF06_cpx
Varón	35	Naïve	CRF09_cpx

Siguiendo la regla 11/25 para determinar una secuencia como X4, en estas secuencias encontramos que en la posición 11 se encontró el aa R en un 25% de las secuencias. En la posición 25 encontramos el aa K en un 44% de las secuencias. Simultáneamente no se encontró en ninguna secuencia. El resto de secuencias (31%) se determinaron como X4 en base a otros criterios seguidos por los algoritmos propios de geno2pheno coreceptor o a score de WebPSSM (Figuras 4.23 y 4.24). En la figura 4.24 se recogen la frecuencia de los aa de la secuencia de los subtipos no B con tropismo CCR5.

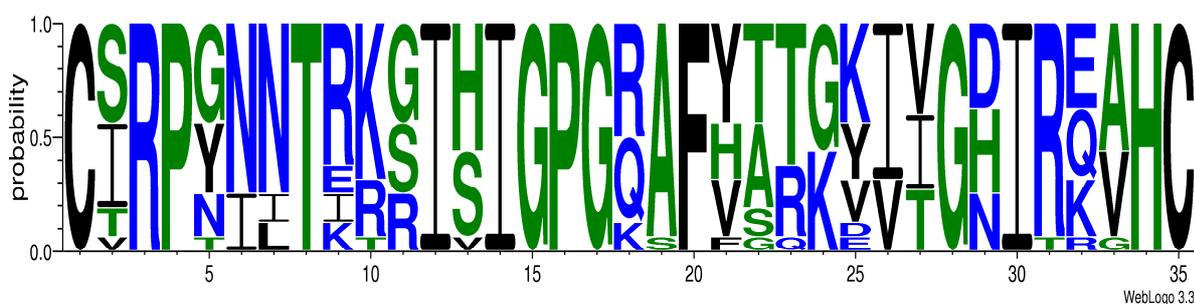


Figura 4.23. Secuencias analizadas por WebLogo 3.3 con las secuencias de subtipos no B con tropismo X4. Se muestran los aa y frecuencia en cada posición.

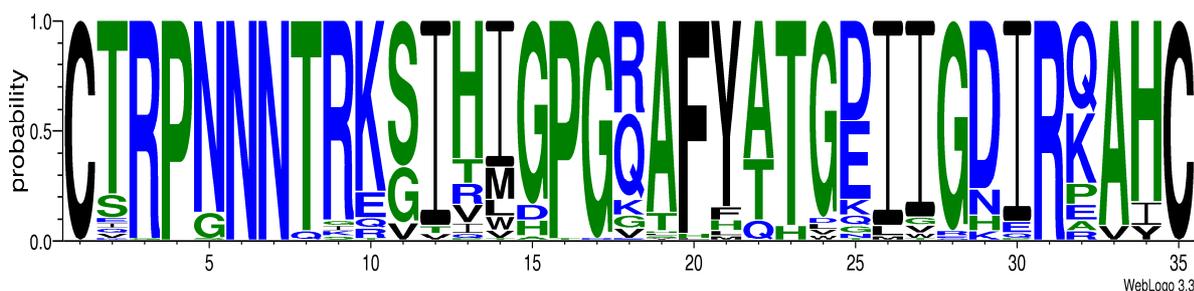


Figura 4.24. Secuencias analizadas por WebLogo 3.3 con las secuencias de subtipos no B con tropismo CCR5.

Si comparamos entre subtipo B y no B, hay mayor frecuencia de tropismo X4 entre los subtipos B (25.6% vs 10%). Este dato se debe a que entre los subtipos no B con determinación de tropismo realizado, sólo un 14% eran pacientes naïve, la mayoría recién infectados. Sin embargo, al analizar los pacientes naïve, entre subtipos B es ligeramente más frecuente el tropismo X4 frente a los subtipo no B (13.8% vs 10%).

En cuanto a la longitud de la secuencia, el 25.9% de las secuencias presentaba alguna delección de 1 o 2 aa (posiciones 14 y/o 24). Entre subtipos B encontramos alguna delección en el 33% de las secuencias analizadas.

4.7.1. Prevalencia de polimorfismos asociados a disminución de la actividad de maraviroc.

Las polimorfismos con mayor prevalencia fueron 20F (96.4%), 22A (71.5%), 11S (68.2%), 13H (64.3%), 25D (36.9%) y 22T (28.0%). Estos polimorfismos se presentaban con frecuencias distintas entre los subtipos B y no-B (tabla 4.18). El polimorfismo 22T tenía mayor frecuencia en el B que en los no B, sin embargo, 11S, 13H, 22A y 25D fueron más frecuentes en los subtipos no B que en el B. También se observó que algunos de los polimorfismos menos frecuentes (19S, 20L, 26V y 11S+26V) eran más prevalentes en el subtipo B. El resto de polimorfismos estudiados presentaban una prevalencia similar en ambos grupos.

Tabla 4.18. Prevalencia de los polimorfismos asociados a disminución de la actividad de maraviroc.

Mutación	Subtipos B	Subtipos no B
	Frecuencia (%)	Frecuencia (%)
4L	0	0
11S	66,2	71,8
11R	0	0
12V	0,8	1,7
13H	59,6	73,6
16A	0	0
18G	1,7	0
18DEL	1,6	0
19S	3,9	0
20F	95,4	98,2
20L	3,4	1,7
20W	0	0
21I	0	0
21T(In vitro)	0	0
22A	67,2	78,4
22T	29,9	21,7
24T	1,6	0
25D	29,9	51,7
26V	4,8	0
28V(In vitro)	0	0

31V	0,9	0
11S+26V	3,8	0
18G+22T	0	8,2
19S+26V	0,9	0
20F+21I	0	0
20F+25D+26V	0,9	0
G15_P16INSA	0	0
N24_I25INSI	0	0
G15_P16INSG+25D	0	0

Nota: Estas secuencias correspondían a 89 pacientes con subtipo B y 24 con subtipos no-B. Realizando una expansión de la secuencia degenerada, obtuvimos un total de 187 secuencias incluidas en este análisis.

Los polimorfismos 11S, 13H, 20F, 22A/T y 25D presentaban la mayor prevalencia en nuestra zona de estudio, mientras que 11R y 19S, asociados con peor respuesta a maraviroc, sólo estaban presentes en subtipos B y con una baja prevalencia (0% y 3,9% respectivamente). Los polimorfismos que, in vitro, producen resistencia (21T y 28V) no se encontraron en nuestra población.

4.7.2. Discordancias entre algoritmos de interpretación genotípica del tropismo de VIH-1 en secuencias con inserciones o deleciones en la región V3: MARGI-HIV Tropism.

Hoy día, son dos los algoritmos genotípicos más usados para la interpretación, geno2pheno coreceptor (G2p) y webPSSM (PSSM), pero estudios previos han indicado que existen problemas en la interpretación cuando se trata de secuencias con un tamaño diferente a la secuencia consenso (35 aminoácidos).

En estudios previos realizados por este grupo, se estimó que la concordancia entre herramientas fue de 86%, sin embargo, para secuencias con deleciones e inserciones la concordancia disminuye hasta el 83,9% y 81% respectivamente. Para secuencias con inserciones la aplicación más adecuada para determinar el tropismo genotípico es G2p, ya que PSSM no alineaba bien las secuencias y podría dar un resultado erróneo. Para secuencias con deleciones recomendamos el uso de G2p para evitar los posibles errores de alineamiento de PSSM o la verificación del alineamiento correcto de la secuencia al utilizar PSSM.

Por estos motivos se comenzó crear una herramienta que ayudase y facilitara la determinación genotípica del tropismo viral del VIH. Para ello se desarrolló una aplicación informática en la que se obtienen simultáneamente las interpretaciones de tropismo viral realizadas por geno2pheno coreceptor (www.geno2pheno.org) y WebPSSM (www.ubik.microbiol.washington.edu/computing/pssm).

La aplicación, con acceso gratuito, se encuentra alojada en www.vih-tropismo.com. El resultado se consigue al introducir una secuencia de ADN correspondiente a la región V3, la cual es traducida a

secuencia de aminoácidos para posteriormente compararla con secuencias registradas y analizadas en nuestra base de datos previamente elaborada y analizada por ambas aplicaciones (Figura 4.25).

Con esta herramienta se han simplificado y unificado las herramientas bioinformáticas utilizadas para la determinación del tropismo del VIH. Además, se realiza simultáneamente la expansión de la secuencia degenerada obtenida para poder analizarla totalmente por G2p, que actualmente solo da el resultado del promedio de la secuencia introducida. Por otro lado, los alineamientos erróneos de WebPSSM con secuencias de longitud distinta a 35aa han sido resueltos.

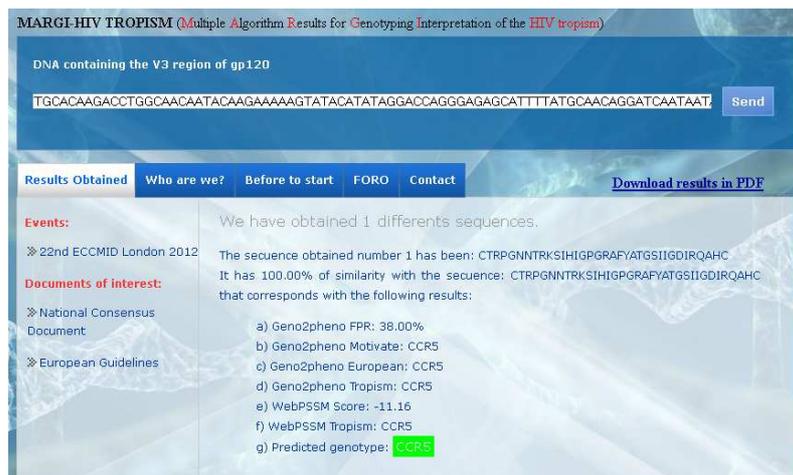


Figura 4.25. Resultado obtenidos tras analizar una secuencia de interés con MARGI-HIV Tropism.

4.8. Estudio de mutaciones de resistencia a la integrasa viral de VIH-1 subtipos no B.

Este estudio se realizó a un total de 41 muestras (59%) por no disponer de muestra o extraído del resto. De estas muestras, en ocho no se consiguió amplificar producto (seis de ellas presentaban una carga viral por debajo de 8000 copias en el momento del estudio, mientras que todas las que amplificaron tenían una carga viral superior a esta cifra). Todos los pacientes incluidos eran pacientes naïve para inhibidores de la integrasa. Los resultados de sensibilidad (analizados según geno2pheno integrase) de las muestras de pacientes amplificadas se expresan a continuación:

- RAL sensible / EVG sensible: 28 pacientes.
- RAL sensible / EVG con actividad disminuida: 4 pacientes (CRF01_AE, CRF02_AG y F1[2]). Siguiendo la Guía RIS 2013, 3 de estos pacientes presentarían resistencia a EVG.
- RAL con actividad disminuida / EVG sensible: 1 paciente CRF02_AG.
- DGV sensible: 33 pacientes (100%).

Entre los pacientes naïve a cualquier TAR (28) se encontró mutaciones que provocaran la disminución de la actividad o resistencia a alguno de los inhibidores de la integrasa en el 15.1%.

4.8.1 Análisis de polimorfismos de la secuencia de la integrasa viral en subtipos no B.

Al disponer de pocas secuencias se analizaron todas las secuencias en bloque (subtipo no B). Entre los polimorfismos con mayor frecuencia se encontraron los siguientes: L101I (60%), T112V (40%), G123S (92%), T125A (75%) y R127K (60%). De ellas, L101I se asocia (in vitro) a resistencia a dolutegravir (Grupo 1 dentro de la guía RIS 2013). El resto de polimorfismos y su frecuencia se muestran en la figura 4.26.

Las mutaciones que más afectan a la actividad de RAL (Y143C/R, Q148H/K/R y N155H) no se encontraron entre las secuencias analizadas. Entre las mutaciones descritas para EVG, T66A/K/I, E92Q, Q148H/K/R y N155H no se encontraron, mientras que E92V, P145S y S147G se encontraron en tres pacientes distintos (2 subtipos F1 y un subtipo C). Las mutaciones descritas que confieren resistencia a DTG, Q148H/K/R, T66K, L74I, E138A/K/T y G140A/C/S) no se encontraron en nuestra población a excepción de L74I, que por sí sola no afecta a la actividad de este fármaco. Dicha mutación se encontró en dos pacientes con subtipo CRF02_AG.

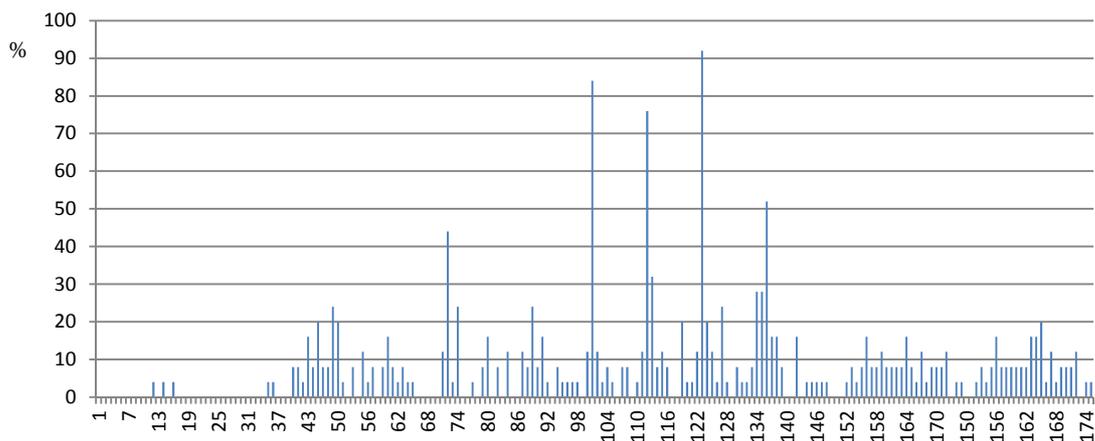


Figura 4.26. Frecuencias (%) de sustituciones en cada codón de la integrasa amplificado (codones 12-175).

5. Discusión.

5.1. Características de la población general del estudio. Distribución de subtipos no B en nuestra población.

La vigilancia epidemiológica de la infección por el VIH y los eventos de SIDA es una herramienta indispensable para conocer la magnitud de esta enfermedad en nuestro entorno. Para ello es necesario conocer tanto las características demográficas, socioeconómicas, culturales, como las características bioquímicas-microbiológicas del virus infectante y clínicas de estos pacientes. Estudios más específicos, y objeto de esta tesis, ha sido caracterizar la población de nuestra área centrándonos en los pacientes con subtipo no B, y el impacto que puede esto tener en la epidemiología y la clínica.

Este registro es importante para aclarar la situación local dentro del plano regional, nacional y europeo, debido a las diferencias que puedan encontrarse, no sólo a niveles nacionales sino también regionales. A nivel europeo, en el reciente estudio de *Abecasis et al. 2013*, entre países miembros se encuentra una gran disparidad entre porcentajes de subtipos no B. En un extremo se encuentra Portugal con algo más del 60% (en su mayoría subtipo C y varios CRFs) y en el otro encontraríamos Polonia con menos del 5% de subtipos no B. España se encuadraría en tercer puesto con aproximadamente un 8% (destacando que el estudio se basa en datos de pacientes analizados en el periodo 2002-2005) y aumentado en posteriores estudios hasta el 12% (datos cohorte CoRIS 2012) en el que CRF02_AG sería el subtipo no B más representativo (38%).

Dentro de España, la mayor incidencia de nuevos casos de VIH lo encontramos en las comunidades de Madrid, Baleares, País Vasco y Cataluña. Andalucía se sitúa en un puesto intermedio con una incidencia menor que el conjunto nacional pero destacan provincias como Málaga, Cádiz, Huelva y Almería, que se encuentran en valores similares que las anteriores comunidades citadas. Más concretamente, las tasas más altas registradas corresponden a los distritos de Málaga con un 5.57, seguido del Poniente de Almería con un 4.65 y Granada con 4.53 (tasas por mil) (*Plan Andaluz frente al VIH/SIDA y otras ITS 2010-2015*).

En Andalucía, los análisis más recientes se encuentran recogidos, por un lado, en el estudio de *de Felipe et al. 2011*, donde se resume, en pacientes inmigrantes atendidos en el área hospitalaria del Hospital Universitario Virgen del Rocío (Sevilla) en el periodo 2000-2010, que la mayoría eran portadores del subtipo CRF02_AG. Por otro lado, en una tesis donde se recogen los datos de Andalucía oriental (*Carlos-Chillerón, Granada 2007*) encontramos una prevalencia de subtipos no B del 8.1% (datos de 1999-2006) donde de nuevo el subtipo más representativo era CRF02_AG (33%) seguido de CRF01_AE y G (13.4% respectivamente). En otra tesis donde se recogen los datos del área de Málaga (*Mora-Navas, Málaga 2013*) durante el periodo de 2004-2010 la prevalencia de subtipos no B ascendía al 16% siendo, de nuevo, el subtipo CRF02_AG (41.2%) el más prevalente, seguidos de CRF01_AE y F1 (10.4%, respectivamente).

En nuestra área de estudio encontramos una prevalencia de subtipos no B del 8.2%, destacando que en este escenario el subtipo más prevalente es el subtipo F1 (28.6%), seguido de CRF02_AG (21.4%), A1 (17.1%) y C (11.4%). Por lo tanto, en nuestra área encontramos que no existe un subtipo dominante, existiendo hasta 4 subtipos que se encuentran co-circulando y por primera vez encontramos que no es el subtipo CRF02_AG el que predomina sobre los demás, como ocurre en muchas zonas de España. Este dato viene dado por las características de la población inmigrante que podemos encontrar en cada una de las anteriores zonas de estudio antes citadas (dándose en Cádiz y Huelva el 81% de los casos de subtipos no B de nuestra área). Estos datos son relevantes en cuanto a la epidemiología del VIH-1 en Andalucía, especialmente en la zona occidental, hasta ahora con escasos datos.

Un punto a destacar de nuestros resultados, es la descripción por primera vez en Andalucía de 4 pacientes (Cádiz y Huelva) con subtipo CRF14_BG. Se trataba de un paciente de origen cubano (infectado en Cuba) y tres pacientes españoles (infectados en España). Este subtipo, descrito por primera vez en España en 2001 (*Thomson et al. 2001*) está aumentando su incidencia dentro de nuestro país.

Otros subtipos poco frecuentes en otros entornos, pero encontrados y descritos en esta tesis fueron: CRF03_AB (varón de origen ruso e infectado en Rusia, Valme), CRF06_cpx (varón argelino e infectado en Argelia, Jerez), CRF09_cpx (varón de Senegal, Jerez), CRF11_cpx (mujer de Rumanía, Huelva) y CRF12_BF (varón de Brasil, Huelva). Los dos subtipos G correspondían a dos mujeres de origen nigeriano (Cádiz y Huelva, respectivamente) mientras que el subtipo D era un varón de Uganda (Huelva).

Al analizar la población general de nuestro estudio, incluyendo los pacientes atendidos en los Hospitales de Cádiz (H. Puerta del Mar y Jerez), Huelva (H. Infanta Elena y Juan Ramón Jiménez), Osuna (H. de la Merced) y Sevilla (H. de Valme) durante el periodo comprendido entre 2009-2012, donde se han estudiado un total de 855 pacientes infectados con VIH-1. La mayoría de ellos eran varones (76.2%) y una mediana de edad de 41 años (4-5 años mayor que la población de estudio de Málaga y Andalucía oriental). La mediana del recuento de linfocitos CD4 fue de 266 células/mm³. Este valor medio de la población es bastante inferior a la población descrita en otras áreas (340 células/mm³). Estos datos revelan un diagnóstico tardío en muchos de los pacientes de nuestra cohorte y/o la dificultad de recuperar un nivel óptimo de CD4 entre pacientes tratados. El valor del logaritmo medio de la carga viral (4.54) es similar en las tres áreas de Andalucía.

En nuestra área, el 56.1% de la población general analizada eran pacientes naïve, donde observamos un incremento del 6% entre pacientes no tratados con respecto a datos de 2009 (p=0.203). Como se comentaba en el apartado de resultados, este dato se puede ver desde dos puntos de vista: aumento de nuevos pacientes diagnosticados por infección con VIH, es decir, un aumento del número de nuevas infecciones (según el boletín de la ECDC, European Centre for Disease Prevention and Control,

aumentaron en Europa las infecciones por VIH un 8% en 2012 con respecto a 2011), unido a una mejora en la eficacia en diagnóstico VIH). El aumento de las primoinfecciones a lo largo del periodo de estudio (3.6 %, $p=0.127$) refuerza el dato de aumento de nuevas infecciones VIH en nuestra área. Por otro lado, la disminución de pacientes tratados o fracasos se podría explicar por un aumento de la adherencia de los nuevos regímenes antivirales, eficacia del tratamiento, disminución de toxicidad, etc.

Si revisamos estos mismos datos entre los pacientes con subtipos no B de nuestro estudio, continúan siendo los varones el grupo mayoritario (70%), pero la mediana de edad desciende a los 38 años, describiendo un grupo más joven que la población media. En cuanto al recuento de linfocitos CD4, es superior al global (309 vs 266) y unos valores de carga viral similar. En este grupo el porcentaje de pacientes no tratados asciende al 85.7%.

En este subgrupo si disponemos de más datos, entre ellos los factores de riesgo, destacando que el 50% de los pacientes infectados eran heterosexuales frente a un 27.1% de homosexuales. Otros datos a destacar son la presencia de coinfecciones, entre la que destaca la coinfección VIH-hepatitis C en el 14.3% de ellos. Por otro lado, en el momento del estudio fueron positivos para citomegalovirus el 21.4% de estos pacientes.

Entre las nacionalidades de los distintos pacientes con subtipo no B incluidos, el 54.3% (38 pacientes) tenían nacionalidad española. La distribución de estos subtipos fue: A1 (11 pacientes, 29%), F1 (10 pacientes, 26%), CRF02_AG (9 pacientes, 24%), C (5 pacientes, 13%) y CRF14_BG (3 pacientes, 8%). Aunque la distribución de estos subtipos se ha diversificado, el subtipo A1 es originario del este de África, Rusia y Europa del Este. F1 se originaría en Sudamérica, mientras que el subtipo C se distribuye por África, China y Europa del Este. El subtipo CRF02_AG es mayoritario de países de África Central y Este, mientras que el subtipo CRF14_BG se originaría en Portugal, pasaría rápidamente a España primero y por Europa a continuación.

Las pautas de tratamiento y protocolo de acción con estos subtipos en estos pacientes son equiparables a pacientes con subtipo B donde el uso de ITIAN se impone al de ITINAN, siendo la combinación de fármacos de ambas familias la opción preferida en estos pacientes. La adherencia en estos pacientes es buena en el 57.1% de los casos, mientras que la cuarta parte de estos pacientes habían diferido el inicio del tratamiento en el cierre del análisis del presente estudio.

5.2. Estudio del recuento de CD4 y logCV de VIH en los pacientes naïve incluidos en el estudio.

El objetivo de este subanálisis fue evaluar el grado de supresión inmunológica (analizando el recuento de linfocitos CD4 entre nuestros pacientes naïve como indicador del retraso del diagnóstico del VIH). Nuestros datos indican, que pese a que hay un claro aumento de pacientes con recuento mayor o

igual a 500 CD4/mm^3 ($p=0.013$) a lo largo del periodo de estudio, no llegan a ser el 26% de los pacientes naïve de nuestro área. Por tanto, el 74% de los pacientes diagnosticados en 2012 presentaban una supresión inmunológica moderada o severa..

Los pacientes diagnosticados tardíamente presentan mayor morbimortalidad, requieren más recursos que los que se identifican pronto y causan más episodios de transmisión. Como se discute en *Oliva et al, 2014*, el porcentaje de pacientes sin información sobre CD4 es mayor en UDI y pacientes subsaharianos. Estos datos demuestran que se requieren más esfuerzos para adelantar el diagnóstico de la infección así como la prevención de la infección por VIH.

Por otro lado, se analizó la carga viral de los pacientes naïve en el momento del primer estudio de resistencias con intención de comenzar tratamiento antirretroviral. Observamos un aumento progresivo (no llegando a ser estadísticamente significativo) de aquellos pacientes con carga viral mayor a 100.000 copias llegando en 2012 a representar el 40% de la población diagnosticada. Este valor es importante para conocer el porcentaje de pacientes que no podrían optar, al menos de inicio, a algunos de los nuevos tratamientos, como es el caso de Eviplera.

El caso opuesto, aquellos pacientes con carga viral inferior a 1000 copias, también ha aumentado durante el periodo de estudio ($p<0.001$) lo que podría explicarse por el aumento de primoinfecciones detectadas (etapas tempranas de la infección y periodo ventana), aunque no podemos descartar que se trate de pacientes en fase crónica de la infección y control inmune.

5.3. Estudio de las mutaciones asociadas a resistencia a antirretrovirales del VIH. Comparación en pacientes naïve (resistencias primarias) y pacientes tratados durante los años 2009-2012. Análisis de efectividad de los ARVs usados según subtipo infectante. Respuesta virológica en subtipos no B de nuestra área.

El estudio de resistencias primarias entre pacientes naïve es un dato relevante porque con él, en los últimos años, se está analizando la transmisión de cepas de VIH con resistencia a alguno de los antirretrovirales empleados en nuestro entorno. Varios estudios habrían demostrado que la prevalencia de mutaciones asociadas a resistencia transmitidas a estos pacientes se habría estabilizado e incluso descendido (*Yebra et al. 2010*) fijándose en España una prevalencia del 10.6%. En nuestra área de estudio hemos encontrado que en 2012 el 8.1% de nuestros pacientes naïve presentaba alguna resistencia a algún antirretroviral (1.6% a ITIAN, 4.9% a ITINAN y 2.4% a IPs).

Se encontró una tendencia al alza en las resistencias a estos fármacos y datos analizados de 2013 (no incluidos en esta tesis) confirmando un aumento del número de resistencias primarias a ITIAN e ITINAN, pero no así a IPs (posiblemente por el uso limitado de esta familia), llegando a una prevalencia

global del 13.1%. Estos datos son similares a los obtenidos recientemente por Mora-Navas en la región de Málaga y confirman un aumento de resistencias primarias en nuestro entorno, al igual que recogen estudios internacionales recientes (*Gagliardo et al. 2014*).

En cuanto al análisis de resistencias y actividad disminuida provocada por mutaciones asociadas a resistencia entre pacientes tratados de nuestra área de estudio, encontramos una disminución en el número de casos desde 2009 hasta 2012. El descenso está claramente marcado en el caso de las familias de ITIANs e IPs. Estos datos se producen de forma casi generalizada en nuestro país debido, principalmente, al cambio de antiguos antirretrovirales, con una baja barrera genética, por algunos con barrera media-alta.

No debemos olvidar que actualmente seguimos usando fármacos con baja barrera en primera línea como son EFV, 3TC y FTC. Por otro lado, el aumento de adherencia al tratamiento, situadas en casi el 100% en algunos casos, ha conseguido minimizar la aparición de estas mutaciones.

En función de los datos obtenidos, parece evidente la necesidad de la realización de estudios de resistencia genotípica a pacientes naïve acorde a los datos de prevalencia de resistencia primaria (al menos en la región de la retrotranscriptasa) dado que la elección de las guías españolas en el uso de regímenes de inicio incluye ITIANs. En esta familia, las mutaciones que con mayor frecuencia encontramos en nuestra serie son la mutación K103N y las sustituciones en la posición V179 seguidas a distancia por E138K/Q. La primera produce resistencia cruzada a NVP y EFV mientras que las otras dos comprometen la sensibilidad de ETV y RPV (aumentando su uso en rescate y primera línea, respectivamente, por su elevada barrera genética y menos efectos adversos). Estos datos son similares a los de cohortes nacionales recientemente publicadas (*Romero et al. 2011* y *Monge et al. 2012*).

Entre las mutaciones asociadas a resistencia a la familia de ITIANs destaca la mutación M184V, con una prevalencia cercana al 11% (afecta a la sensibilidad de 3TC y FTC), seguida por la mutación M41L y las sustituciones en las posiciones T215 y K219 (4%). Todas ellas afectarían a la sensibilidad de TDF.

Ninguna de las mutaciones asociadas a resistencia a IPs, alcanzan una prevalencia superior al 4%. Entre las más frecuentes encontramos M46I/L y L90M, así como las sustituciones en las posiciones I54 y V82. Ninguna de ellas compromete seriamente la sensibilidad de los fármacos de esta familia por lo que por sí solas no representan un riesgo de comprometer el uso de esta familia antirretroviral.

Cuando se analiza la prevalencia de estas mutaciones entre subtipos B y no B encontramos que existen algunos polimorfismos naturales, como pueden ser V11L, L24I, D30N y N88S en la región que codifica la proteasa viral, pero ninguno de ellos, “per se” o combinados entre sí comprometerían la actividad de algún fármaco de esta familia entre subtipos no B.

En cuanto a mutaciones relacionadas con la familia de los ITINANs encontramos que la mutación K103N era más frecuente entre los subtipos no B de nuestra serie ($p < 0.001$), más concretamente encontrándose en 4 pacientes con subtipo A1, dos pacientes con subtipo F1 y en los subtipos C, CRF01_AE y CRF14_BG, en un paciente respectivamente. En este caso, y dado que no hay descrito que esta mutación sea seleccionada positivamente en ninguno de los subtipos (puros o recombinantes), concluimos que este resultado viene dado por el limitado número de casos y la adherencia incompleta en varios de estos pacientes (3 de ellos comenzaron con Atripla). Otra mutación asociada con algunos subtipos no B, pero que se encuentra en una prevalencia inferior al 1%, es la mutación V106M que afecta a la actividad de NVP y EFV. Esta mutación se encontró en dos pacientes varones españoles, homosexuales, naïve y con subtipo F1, sin que hubiera ninguna relación epidemiológica entre ambos. La mutación Y181I/C, mutación frecuente en varios estudios previos (*Mora-Navas, 2013* y *Monge et al. 2012*), sólo se encontró en un único paciente con subtipo no B (CRF06_cpx).

Entre las mutaciones descritas para la familia de los ITIANs, las sustituciones en D67 y V75, así como L210W las encontramos con mayor frecuencia entre subtipos no B y sus frecuencias se encontraron al igual que en estudios previos (*Wensing et al. 2005*). En este estudio, M184I/V se asociaba a subtipos B con fracaso virológico ($p < 0.001$), mientras que en pacientes con subtipos no B (mayoría pacientes naïve) esta mutación se encontraba en baja frecuencia, principalmente porque provoca una disminución del fitness viral y revierte rápidamente. Entre nuestros pacientes no B, se encontró esta mutación en dos subtipos F1 (uno varón, español, infectado por uso de hemoderivados y multifracaso; el otro varón, rumano, homosexual y naïve) y un paciente naïve con subtipo CRF06_cpx.

5.4. Mutaciones asociadas a resistencia y/o disminución de la actividad del TAR. Comparación entre subtipos B y no B de la población de estudio. Análisis de efectividad (definido como CV < 50 copias o indetectable) de los ARVs usados según el subtipo infectante. Respuesta virológica en subtipos no B de nuestra área.

Este análisis se realizó entre aquellos subtipos de los que se disponía de un mayor número de pacientes que permitieron obtener unos resultados más significativos, como fueron los subtipos A1 (12 pacientes), C (8 pacientes), CRF02_AG (15 pacientes), F1 (20 pacientes).

Entre los pacientes con subtipo A1, se excluyeron 3 pacientes por pérdida de seguimiento (2 españoles y un boliviano) y un exitus (paciente varón, español y UDVP). Entre los otros 8 pacientes con datos del seguimiento, el 62.5% (5 pacientes) alcanzaron una CV indetectable, todos con adherencia completa al tratamiento (3 de ellos con EFV/FTC/TDF; los otros dos FTC/TDF/LPV/r pasando uno a monoterapia con LPV/r). Estos pacientes comenzaron su tratamiento con un recuento de linfocitos CD4 por encima de 380 células/ml y una carga viral no superior a 77.000 copias. Entre los pacientes que fracasaron, hay factores comunes entre ellos, como es iniciar tratamiento con EFV/FTC/TDF (dos de ellos

declararon buena adherencia) y en esos momentos presentaron una inmunosupresión severa (recuento CD4 inferior a 200 células/ml) mientras que dos de ellos tenían una carga viral superior a 100.000 copias.

El número final limitado en esta serie no permite realizar un análisis estadístico más exhaustivo, por lo que será necesario realizar más estudios para comprobar si el recuento linfocitario inicial en estos pacientes con subtipo A1 es determinante para conseguir una carga viral indetectable cuando se usa EFV/FTC/TDF como terapia de inicio o, por el contrario, será necesario iniciar con otra combinación terapéutica (véanse tabla 4.9 y figura 4.13, pág 70).

Entre los pacientes con subtipo C, seis de los ocho pacientes tuvieron seguimiento en sus respectivas consultas. De estos, tres pacientes disponían de pocas determinaciones de carga viral en el momento del presente análisis y dos de ellos, además optaron por diferir el tratamiento. Dado el limitado número de casos con más de 3 determinaciones de CD4 y CV en el momento de estudio, solo podemos definir el porcentaje de que consiguió una carga viral indetectable: 12.5% (1 paciente con EFV/FTC/TDF) (véanse tabla 4.10 y figura 4.14, pág 71).

Entre los pacientes con subtipo CRF02_AG (15 pacientes), un 93% (14/15) eran pacientes naïve, el 60% con nacionalidad española, 40% de ellos mujeres y la mayoría de ellos heterosexuales (73%). Se incluyeron un total de 8 pacientes en este sub-estudio que permitió deducir que en pacientes con CV superiores a 52.000 copias en el momento del inicio. Atripla no parece ser la mejor opción terapéutica para estos pacientes al no conseguirse la indetectabilidad del VIH, sin embargo, en aquellos con CV inferior a 10.000 copias si consiguieron la indetectabilidad, al igual que FTC/TDF/RAL usado de inicio. No se encontró relación con el recuento de CD4 en el momento de inicio del tratamiento (véanse tabla 4.11 y figura 4.15, pág 72 y 73).

Las características de los 20 pacientes con subtipo F1 eran: 65% varones, el 50% era población con nacionalidad no española, con mayoría de rumanos y equidad entre pacientes homosexuales y heterosexuales. El 65% eran pacientes naïve en el momento de la petición de estudio de resistencias inicial en este estudio. A pesar del número de pacientes, 10 pacientes se excluyeron del análisis: 5 pacientes por pérdida de seguimiento, uno por abandono voluntario de tratamiento y 4 pacientes por no iniciar tratamiento. Con el resto de pacientes (10), no encontramos diferencias destacables en la CV basal, recuento CD4, tratamiento de inicio o presencia de mutaciones asociadas a resistencia que justificaran el fracaso virológico. Sólo 4 pacientes (20%), consiguieron la indetectabilidad, cada uno con un tratamiento distinto (véanse tabla 4.12 y figura 4.16, pág 74 y 75).

Resumiendo, sólo el 37% de los pacientes no B de nuestra serie, con datos suficientes de seguimiento, consiguieron la indetectabilidad. Si consideramos todos los subtipos no B incluidos en el estudio, este porcentaje de éxito desciende hasta el 24%. Este dato dista mucho del porcentaje medio

obtenido en la población VIH atendida, por ejemplo en el H. de Valme, donde el éxito virológico se encuentra entre el 80-90%.

Necesitamos, por tanto, evaluar cómo mejorar este porcentaje, primero aumentando el número de pacientes con un seguimiento adecuado y mejorando la adherencia al TAR en este grupo y por último, en la medida de lo posible, adecuar el tratamiento, a priori más adecuado en función del subtipo, carga viral y recuento de linfocitos CD4, que en algunos casos puede resultar clave para conseguir la indetectabilidad.

5.5. Estudio de polimorfismos en la proteasa y la retrotranscriptasa de subtipos no B.

El análisis de polimorfismos realizado a las secuencias de estudio entre subtipos no B mostró la existencia de polimorfismos naturales ya descritos previamente, algunos de los cuales pueden afectar a la sensibilidad de algunos de los TAR usados. Por ejemplo, en el subtipo A1 encontramos que la mutación V179E se encontraba en la mayoría de las secuencias analizadas de este subtipo y que está recogida en la Guía RIS 2013 dentro del grupo 1 de mutaciones de resistencia que afectan a la sensibilidad a NVP, EFV y ETR. Teniendo en cuenta que la terapia de inicio más usada actualmente incluye EFV, debemos considerar que este polimorfismo afecta a la sensibilidad de este fármaco. En la proteasa, sin embargo, algunos polimorfismos encontrados (L10V, G16E, K20R, M36I, D60E y H69K) sólo son recogidos en la guía IAS-USA 2013 y afectarían parcialmente a la sensibilidad a ATZ, LPV y TPV.

En subtipos C, se encontraron pocos polimorfismos presentes en el 100% de las secuencias estudiadas, como puede ser H69K en la proteasa (afectaría a la sensibilidad a TPV según la *Guía IAS-USA 2013*). En la retrotranscriptasa se encontraron T200A y V245A/Q, pero no asociados a resistencia en ninguna de las guías estudiadas, aunque cuestionadas en estudios previos (*Yu et al. 2009* y *Li et al. 2013*).

Los subtipos F1 y CRF02_AG comparten muchos polimorfismos en la región de la proteasa comunes con A1, que igualmente comprometerían la sensibilidad a ATZ, LPV y TPV, mientras que para los subtipos CRF14_BG, los polimorfismos registrados sólo afectarían a la sensibilidad de atazanavir. En este último subtipo, todos estos polimorfismos fueron ya analizados previamente entre pacientes diagnosticados en Galicia (*Pérez-Álvarez et al. 2003*) sin encontrarse evidencias de resistencia. En esta serie incluimos como polimorfismos no descritos en este estudio K20I y V82I (véanse tablas 4.13 a 4.16, páginas 78 a 80).

En esta tesis recogemos aquellos polimorfismos presentes únicamente entre los subtipos no B de nuestra área con el fin de ampliar el conocimiento que estas mutaciones. Hoy día la mayoría de ellas carecen de valor por sí mismas en la disminución de sensibilidad, pero no podemos descartar que el acúmulo de estas mutaciones en estos subtipos pueda disminuir progresivamente la sensibilidad de los ARVs usados, como ocurre con las TAMs.

Por otro lado, se analizaron aquellos polimorfismos que se encontraron en mayor frecuencia entre subtipos no B en comparación con los subtipos B. Como se ha comentado previamente, algunos de estos polimorfismos si están descrito que puedan asociarse a resistencia en estos subtipos (Guía RIS 2013), pero el grado en el que puedan contribuir a originar la resistencia a algún ARV sigue sin estar bien definido. En esta misma Guía, en la región de la retrotranscriptasa, sólo se contemplan V90I, A98S y V179I. Los dos primeros presentaban una baja frecuencia, mientras que V179I se encontró en el 24% de los subtipos no B analizados por lo que habría que considerar la presencia de este polimorfismo y el posible descenso de sensibilidad que pueda provocar.

Otros polimorfismos como Q174K, V177E y T200A se encontraban en frecuencias superiores al 70% entre las secuencias analizadas de estos subtipos. En algunos estudios previos (*Pérez-Álvarez et al. 2003*, *Doualla-Bell et al. 2004* y *Li et al. 2013*) se cuestiona la posibilidad de que la proximidad de estos polimorfismos a la posición 184 pueda influir en cierto grado a favorecer la selección de la mutación M184V.

Este estudio cuenta con la limitación de la técnica de secuenciación empleada (15-20%), donde las mutaciones minoritarias, por debajo de este límite de detección, pueden no detectarse. Es por ello que, se necesitarían estudios con técnicas más sensibles, como la pirosecuenciación, que permitirán definir con mayor precisión aquellos polimorfismos y mutaciones que se encuentren en menor frecuencia.

5.6. Análisis de clústers de subtipos no B.

El análisis filogenético de secuencias es una de las herramientas moleculares más usada hoy día por su fiabilidad y cantidad de información que proporciona acerca de patrones globales y/o regionales, en nuestro caso de la propagación de la infección por subtipos no B de VIH en nuestra área de estudio. Para este análisis, hemos utilizado las regiones amplificadas del gen *pol* en las muestras de estudio y se compararon con las secuencias recogidas en la base de datos de los Álamos (<http://www.hiv.lanl.gov>). Los subtipos que se analizaron fueron, por tener un mayor número de casos bien documentados, de los subtipos A1, C, CRF02_AG y F1.

El análisis filogenético de secuencias entre subtipos A1 de nuestra área (figura 4.18, pág 81) reveló la presencia de un cluster formado por 8 de los 10 pacientes incluidos. Estos pacientes pertenecían las áreas sanitarias de Cádiz (3 pacientes), Jerez (4) y Valme (1), siete españoles y un paciente de origen boliviano (todos infectados en España). En estudios posteriores al realizado en esta tesis, donde se incluyeron todos los subtipos agrupados en la base de los Álamos, se observa que este cluster se relacionaba estrechamente con las cepas AF484512 y KF716475, aisladas originariamente en Uganda y

Kenia, respectivamente. Estos datos indicarían un caso índice no localizado de origen africano de este cluster.

En cuanto al subtipo F1 se detectaron dos clústers (figura 4.20, pág 83). Uno de ellos, formado por cuatro miembros de una familia rumana de Huelva (dos varones adultos, una mujer y una niña de 8 años). Este cluster está estrechamente relacionado con la cepa DQ979024, aislada originariamente entre pacientes de origen rumano en España (ISCI, España). El otro de los clústers analizados, incluye tres pacientes varones españoles y homosexuales del área sanitaria de Huelva (2) y Jerez, que se relacionó estrechamente con la cepa KC113009, aislada originariamente de una paciente española en España (ISCI, Madrid). Este análisis indica dos orígenes distintos de la infección por subtipo F1 en nuestra área, una originada por cepas F1 procedente de Rumanía, la otra por cepas F1 circulantes entre pacientes españoles originado en España.

En cuanto al resto de subtipos analizados (C, CRF02_AG y CRF14_BG), no se encontró ninguna relación a nivel de clústers entre ellos.

5.7. Tropismo viral mediante la secuenciación de la región V3 de subtipos no B. Prevalencia de polimorfismos asociados a disminución de la actividad de maraviroc. Discordancias entre algoritmos de interpretación genotípica del tropismo de VIH-1 en secuencias con inserciones o deleciones en la región V3: MARGI-HIV Tropism.

Como ya es conocido, la determinación del tropismo viral, ya sea mediante herramientas genotípicas o fenotípicas, es el primer paso para conocer si un paciente puede ser candidato al uso de maraviroc.

Debemos tener en cuenta las limitaciones que tienen las técnicas genotípicas, y en concreto la utilizada para la realización de este estudio, en referencia al porcentaje de poblaciones minoritarias detectadas (puede ser fundamental para la detección de cepas X4 en bajos niveles) (*García et al. 2011* y *Knapp et al. 2013*). En nuestra serie, sólo el 17% (7 pacientes) de los pacientes analizados con subtipos no B presentaron un tropismo X4 o dual mixto. De ellos, 6 eran pacientes varones naïve, y cinco de ellos eran portadores de cepas recombinantes (3 pacientes CRF02_AG, 1 paciente CRF06_cpx y un CRF09_cpx). Según publicaciones recientes, la tasa de X4 entre subtipos CRF02_AG podría estar sobrevalorado cuando utilizamos herramientas genotípicas como es nuestro caso, mostrando una vez más las limitaciones que presentan las herramientas bioinformáticas utilizadas, especialmente con subtipo no B (*Mulinge et al. 2013*).

Si atendemos a la regla 11/25 (esta regla se basa en la observación de que aquellos cepas aisladas que presenten aminoácidos básicos como la arginina (R) o la lisina (K) en las posiciones 11 y/o 25 se

asocian con un fenotipo X4-trópico), encontramos: por un lado, el aminoácido R, en la posición 11, se encuentra en el 25% de estas secuencias; por otro lado, el aminoácido K en la posición 25 lo encontramos en el 44% de las secuencias analizadas. Entre subtipos no B no se encontró simultáneamente estos dos aminoácidos en dichas posiciones (si ocurre en algunas secuencias X4 en subtipos B analizados). En pacientes naïve era ligeramente mayor el porcentaje de X4 en subtipos B con respecto a subtipos no B (13.8 vs 10%).

Un dato a tener en cuenta a raíz del análisis realizado, en lo que se refiere a las secuencias analizadas del subtipo CRF14_BG en nuestra zona, es que todas tenían tropismo CCR5, entrando en discordancia con lo que se ha publicado previamente donde se describía como mayoritario el tropismo CXCR4 entre estos subtipos (*Pérez-Álvarez et al. 2014*).

Si analizamos los polimorfismos descritos previamente asociados a la disminución de la actividad de maraviroc, tanto in vitro como in vivo (Seclén et al. 2010), encontramos que los polimorfismos 13H, 20F, 22A y 25D se dan con mayor frecuencia entre subtipos no B de nuestra serie. La asociación descrita de los polimorfismos 18G y 22T, sólo se encontró entre subtipos no B (8.2%). Estos datos confirman la baja prevalencia de estas mutaciones en nuestra área de estudio y la escasa consecuencia en la sensibilidad a maraviroc.

De los polimorfismos que se han asociado a fallo virológico a maraviroc (4L, 11R y 19S), sólo se encontró el 19S entre subtipos B con una baja frecuencia (3.9%). Los polimorfismos 21T y 28V, asociados a resistencia en cepas in vitro, no se encontraron entre nuestras cepas analizadas.

Dado que el resto de polimorfismos no están bien ponderados y no se ha definido el grado de resistencia que pueden originar, por si mismas o el conjunto de alguna de ellas, los datos recogidos en esta tesis pueden ayudar como base de las prevalencias que existen en nuestra área y durante el periodo 2009-2012, momento en el que el uso de maraviroc comenzó a utilizarse cada vez más entre nuestros pacientes.

La interpretación del tropismo de una cepa VIH a partir de una secuencia FASTA obtenida tras su secuenciación, continúa siendo una tarea complicada. Como se recogen en algunas guías o documentos consenso (*Vandekerckhove et al. 2011*) en donde se recomiendan el uso individual o combinado de herramientas bioinformáticas, con o sin expandir la secuencia, puede suponer una dificultad añadida a la hora de realizar esta determinación.

En estudios previos pudimos analizar la concordancia (86%) entre las herramientas más usadas para este fin, geno2pheno coreceptor y WebPSSM, así como el problema que presentaban ambas aplicaciones cuando existían deleciones o inserciones en la secuencia de estudio (provocaba un descenso de concordancia entre algoritmos 83.9% y 81%, respectivamente) (*Parra-Sánchez et al. 2012*). Este

problema, sumado a que G2p no permite la expansión de la secuencia de estudio y WebPSSM comete errores a la hora de expandirlas, condujo a nuestro grupo a desarrollar una aplicación que combinara ambas herramientas y obtener el resultado combinado por ambas en un único análisis.

Este fue el origen de la aplicación bioinformática MARGI-HIV Tropism, y que hoy día, con más de 500 visitas desde 28 países, continua aumentando su base de datos para optimizar el análisis.

5.8. Estudio de mutaciones de resistencia a la integrasa viral de VIH-1 en subtipos no B. Análisis de polimorfismos.

Los inhibidores de la integrasa son una de las últimas familias de antiretrovirales incorporados al arsenal terapéutico contra el VIH con un alto grado de efectividad en el descenso de la carga viral en los pacientes. El problema que presenta esta familia se encuentra en la rápida selección de mutaciones de resistencia y la resistencia cruzada que presentan los dos fármacos actualmente comercializados (RAL y EVG). Algunas de estas mutaciones sólo conferirían un bajo nivel de resistencia cruzada con el fármaco de nueva generación que próximamente estará comercializado en nuestro país (dolutegravir, DTG, Tivicay, ViiV Healthcare) pero habrá que prestar una mayor atención a la selección de mutaciones en la posición Q148 que disminuyen la sensibilidad a estos tres fármacos simultáneamente (*Mesplède et al. 2012*).

Hasta ahora el uso de inhibidores de la integrasa estaba bastante limitado, especialmente por su precio y prácticamente eran utilizados en el rescate de pacientes con un TAR limitado. La disponibilidad de nuevos fármacos y el abaratamiento de estos ha supuesto que se vuelva a considerar su uso, incluso en terapias de inicio, por lo que será necesario realizar un estudio de resistencias a inhibidores de la integrasa tanto en pacientes naïve (a inhibidores de la integrasa) para conocer la prevalencia de mutaciones primarias en la integrasa, como en aquellos pacientes que cuenten con un inhibidor de la integrasa y que no hayan conseguido la indetectabilidad.

En esta tesis recogemos la prevalencia de polimorfismos encontrados en la región de la integrasa entre subtipos no B de nuestra área, así como la tasa de resistencia a dichos fármacos en este grupo. Ambos datos eran desconocidos hasta ahora.

En la serie de datos analizados tuvimos la limitación ya que sólo pudimos amplificar el 59% de las muestras disponibles y entre ellos todos eran pacientes naïve para integrasa. Entre ellos, encontramos 4 pacientes (CRF01_AE, CRF02_AG y dos F1) con actividad disminuida a EVG; y un paciente CRF02_AG con actividad disminuida a RAL. Todas las cepas analizadas presentaban sensibilidad a DGV. Estos datos indican que entre subtipos no B de nuestra área, el 15.1% de ellos presentaban disminución de la actividad a algún fármaco de esta familia, principalmente a EVG. Este porcentaje es similar a los datos publicados

recientemente en una cohorte de más de 3000 pacientes en EEUU con una tasa de resistencia a RAL y/o EVG de un 15.6% (*Hurt et al. 2014*).

Entre los polimorfismos analizados en la integrasa viral de subtipos no B, los más frecuentes fueron L101I, T112V, G123S, T125A y R127K, donde sólo L101I se asociaba (in vitro) a resistencia a DTG. Las mutaciones mayoritarias que más afectan a la actividad de RAL y EVG no se encontraron entre los pacientes analizados, por lo que la prevalencia de resistencias primarias de estas mutaciones en subtipos B es inexistente y es consistente con datos recientemente publicados (*Dimonte et al. 2013* y *Gutiérrez et al. 2013*).

El resto de polimorfismos tendremos que tenerlos en cuenta como en otras familias y comprobar si la combinación de algunos de ellos puede alterar la sensibilidad a estos fármacos, aunque estudios fenotípicos usando RAL y DGV con cepas de pacientes no B indicaron que el alto número de polimorfismos encontrados no alteraban la sensibilidad de estos fármacos (*Charpentier et al. 2013*).

En estudios posteriores de *Wares et al. 2014* analizan la combinación del polimorfismo M50I en combinación con R263K indicando que aumentan el grado de resistencia en esta familia, pero no restaura la capacidad replicativa del virus. Al igual que en este estudio, nuestra prevalencia del polimorfismo M50I es de 15.2% y se convierte en un polimorfismo a incluir en los informes de resistencia a la integrasa viral.

Como en otras familias de fármacos, es necesario conocer la prevalencia de los distintos polimorfismos entre subtipos B y no B circulantes que se encuentren en un área de interés debido a la nueva información que puede ofrecer sobre la forma en que afectarían por si mismos o en combinación la actividad de los InhIn actuales y los próximos en estar disponibles.

6. Conclusiones.

6. Conclusiones.

1. El porcentaje de pacientes no tratados ha aumentado progresivamente en el periodo de estudio hasta alcanzar el 60.5% en 2012. Lo mismo ocurre para infecciones recientes o primoinfecciones, alcanzando un 6.8% al final del estudio.
2. Existen diferencias entre la población general y población con subtipos no B de nuestra área: la población no B es más joven (3 años menos), mayoritariamente naïve (85.7%), con un recuento de linfocitos CD4 superior (309 vs 266) y el factor de riesgo mayoritario es la heterosexualidad (50%). Estos datos pueden ser consecuencia del alto porcentaje de pacientes inmigrantes dentro de este grupo.
3. La prevalencia de pacientes infectados con VIH subtipo no B de nuestra área de estudio es 8.2%. A diferencia de otras áreas estudiadas en Andalucía, el subtipo no B mayoritario fue F1 (28.6%) y no CRF02_AG (21.4%).
4. Hemos detectado por primera vez en Andalucía la introducción del subtipo CRF14_BG originario de Portugal.
5. A pesar del aumento del recuento de linfocitos CD4 en pacientes VIH recién diagnosticados, el 74% de éstos en 2012 presentaban una supresión inmunológica moderada o severa.
6. La tasa de resistencias primarias en el último año de estudio fue del 8.1%, pero la tasa de resistencias en ITIAN e ITINAN comenzaron a aumentar en 2012 entre pacientes naïve.
7. Las mutaciones y/o polimorfismos que se asociaban más frecuentemente a subtipos no B no conferían resistencia por sí mismas, salvo si se presentan en combinación, que podrían disminuir la sensibilidad al TAR.
8. La combinación EFV/FTC/TDF puede no ser la adecuada con cargas virales altas (superior a 77.000 copias y $CD4 < 340$ cel/mm) por disminución de la efectividad del TAR en pacientes no B con subtipos A1. Lo mismo ocurriría en pacientes infectados con cepas del subtipo CRF02_AG con cargas virales superiores a 52.000 copias.
9. Sólo el 24% de los pacientes no B consiguió una carga viral indetectable de VIH (éxito del tratamiento antirretroviral), dato que dista mucho del % obtenido en el área de Valme (80-90%), confirmando que los protocolos establecidos para esta población no son efectivos.

10. En el análisis filogenético de subtipos no B, encontramos un clúster formado por 8 pacientes con subtipo A1 que sugiere una vía de origen africano y dos clústers formados por pacientes con subtipo F1 que indicaban una vía de origen rumana y otra española.

11. La aplicación MARGI-HIV Tropism facilita el análisis del tropismo viral y corrige posibles errores cometidos por otras herramientas bioinformáticas.

12. El 15.1% de los pacientes con subtipo no B analizados presentaban actividad disminuida a algún inhibidor de la integrasa, especialmente a elvitegravir. Los polimorfismos con mayor frecuencia en la región de la integrasa de subtipos no B fueron: L101I (60%), T112V (40%), G123S (92%), T125A (75%) y R127K (60%).

7. Referencias.

7. Referencias utilizadas (por orden alfabético).

Abecasis AB, Grossman Z, Struck D, Vandamme AM, Camacho A, Torti C, et al. Antiretroviral therapy including tenofovir HIV-1 patients treated with combination of reverse transcriptase mutation K65R in HIV-1 subtype is an independent predictor. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57:1053-1060.

Abecasis AB, Wensing AM, Paraskevis D, Vercauteren J, Theys K, Van de Vijver DA, et al. HIV-1 subtype distribution and its demographic determinants in newly diagnosed patients in Europe suggest highly compartmentalized epidemics. *Retrovirology.* 2013;10:7-20.

Agace WW, Amara A, Roberts AI, Pablos JL, Thelen S, Ugucioni M, et al. Constitutive expression of stromal derived factor-1 by mucosal epithelia and its role in HIV transmission and propagation. *Curr Biol.* 2000;10:325-328.

Aghokeng AF, Ewane L, Awazi B, Nanfack A, Delaporte E, Peeters M et al. Evaluation of four simple/rapid assays and two fourth-generation ELISAs for the identification of HIV infection on a serum panel representing the HIV-1 group M genetic diversity in Cameroon. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2004;37:1632-1640.

Aghokeng AF, Ayouba A, Mpoudi-Ngole E, Loul S, Liegeois F, Delaporte E et al. Extensive survey on the prevalence and genetic diversity of SIVs in primate bushmeat provides insights into risks for potential new cross-species transmissions. *Infect Genet Evol.* 2010;10:386-396.

Alcamí J, Coiras M. Inmunopatogenia de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2011;29:216-226.

Alcamí J, Laín de Lera T, Folgueira L, Pedraza MA, Jacqué JM, Bachelerie F, et al. Absolute dependence on kB responsive elements for initiation and Tat-mediated amplification of HIV transcription in blood CD4 T lymphocytes. *EMBO Journal.* 1995;14:1552-1560.

Alcamí, J. Avances en la inmunopatología de la infección por el VIH. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2004;22:486-496.

Amendola A, Bordi L, Angeletti C, Visco-Comandini U, Abbate I, Cappiello G et al. Underevaluation of HIV-1 plasma viral load by a commercially available assay in a cluster of patients infected with HIV-1 A/G circulating recombinant form (CRF02). *J Acquir Immune Defic Syndr.* 1999;31:488-494.

Anta L, Blanco JL, Llibre JM, García F, Pérez-Elías, Aguilera A et al. Resistance to the most recent protease and non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors across HIV-1 non-B subtypes. *J Antimicrob Chemother.* 2013;68:1994-2002.

Arrizabalaga J, Rodríguez-Alcántara F, Castañer JL, Ocampo A, Podzamczar D, Pulido F et al. Prevalence of HLA-B*5701 in HIV-infected patients in Spain (results of the EPI Study). *HIV Clin Trials.* 2009;10:48-51.

Ayouba A, Maucière P, Martin PM, Cunin P, Mfoupouendoun J, Njinku B et al. HIV-1 group O infection in Cameroon, 1986 to 1998. *Emerg Infect Dis.* 2001;7:466-467.

Barré-Sinoussi F, Cherman JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). *Science.* 1983;220:868-871.

Baryshev PB, Bogachev VV, Gashnikova NM. The HIV-1 genetic diversity in Russia: CRF63_02A1, a new HIV-1 genetic variant spreading in Siberia. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2013. [Epub ahead of print]. PMID:24279614.

Braun P, Wiesmann F. Phenotypic assays for the determination of coreceptor tropism HIV-1 infected individuals. *Eur J Med Res.* 2007;12:463-472.

Brenchley JM, Schacker TW, Ruff LE et al. CD4+ T cell depletion during all stages of HIV disease occurs predominantly in the gastrointestinal tract. *J Exp Med.* 2004;200:749-759.

Brenner BG. Resistance and viral subtypes: how important are the differences and why do they occur? *Curr Opin HIV AIDS.* 2007;2:94-102.

Briones C, Soriano V, González-Lahoz J. VI Curso de Biología Molecular para Clínicos. Publicaciones Permanyer. ISBN: 849342840X. 2005.

Calmy A, Pascual F, Ford N. HIV drug resistance. *N Engl J Med.* 2004;50:2720-2721.

- Cane P, Chrystie I, Dunn D, Evans B, Geretti AM, Green H, et al. Time trends in primary resistance to HIV drugs in the United Kingdom: multicentre observational study. *BMJ*. 2005; 331:1368.
- Carlos-Chillerón S. Tesis doctoral. Interpretación de la resistencia genotípica del virus de la inmunodeficiencia humana. Relación con el subtipo infectante. Granada 2007.
- Castro-Nallar E, Pérez-Losada M, Burton GF, Crandall KA. The evolution of HIV: inferences using phylogenetics. *Mol Phylogenet Evol*. 2012;62:777-792.
- Charpentier C, Bertine M, Visseaux B, Leleu J, Larrouy L, Peytavin G et al. In vitro phenotypic susceptibility of HIV-1 'non-B' integrase inhibitors naive clinical isolates to dolutegravir and raltegravir. *AIDS*. 2013;27:2959–2963.
- Chomont N, El-Far M, Ancuta P, Trautmann L, Procopio FA, Yassine-Diab B, et al. HIV reservoir size and persistence are driven by T cell survival and homeostatic proliferation. *Nat Med*. 2009;15:893-900.
- Chow WZ, Al-Darraj H, Lee YM, Takebe Y, Kamarulzaman A, Tee KK. Genome sequences of a novel HIV-1 CRF53_01B identified in Malaysia. *J Virol*. 2012;86:11398-11399.
- Chueca N, Garrido C, Alvarez M, Poveda E, de Dios Luna L, Zahonero N et al. Improvement in the determination of HIV-1 tropism using the V3 gene sequence and a combination of bioinformatics tools. *J Med Virol* 2009; 81:763-767.
- Chun TW, Stuyver L, Mizell SB, Ehler LA, Mican JA, Baseler M, et al. Presence of an inducible HIV-1 latent reservoir during highly active antiretroviral therapy. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997;94:13193-13197.
- Clavel F, Guetard D, Brun-Vézinet F, Chamaret S, Rey MA, Santos-Ferreira MO, et al. Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science*. 1986;223:343-346.
- Clavel F, Hance AJ. HIV drug resistance. *N Engl J Med*. 2004;350:1023-1035.
- Coffin JM. HIV population dynamics in vivo: implications for genetic variation, pathogenesis, and therapy. *Science*. 1995;267:483-489.
- Coiras M, López-Huertas MR, Pérez-Olmeda M, Alcamí J. Understanding HIV-1 latency provides clues for the eradication of long-term reservoirs. *Nat Rev Microbiol*. 2009;7:798-812.
- Cooper DA, Heera J, Goodrich J, Tawadrous M, Saag M, Dejesus E, et al. Maraviroc versus efavirenz, both in combination with zidovudine-lamivudine, for the treatment of antiretroviral-naive subjects with CCR5-tropic HIV-1 infection. *J Infect Dis*. 2010;15:803-813.
- Cullen BR. HIV-1 auxiliary proteins: making connections in a dying cell. *Cell*. 1998;93:685-692.
- Davis DA, Soule EE, Davidoff KS, Daniels SI, Naiman NE, Yarchoan R. Activity of human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitors against the initial autocleavage in Gag-Pol polyprotein processing. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56:3620-3628.
- De Clercq E. The design of drugs for HIV and HCV. *Nat Rev Drug Discov*. 2007;6:1001-1018.
- De Clercq E. Where rilpivirine meets with tenofovir, the start of a new anti-HIV drug combination era. *Biochem Pharmacol*. 2012;84:241-248.
- De Jesus E, Rockstroh JK, Henry K, Molina JM, Gathe J, Ramanathan S, et al. Co-formulated elvitegravir, cobicistat, emtricitabine, and tenofovir disoproxil fumarate versus ritonavir-boosted atazanavir plus co-formulated emtricitabine and tenofovir disoproxil fumarate for initial treatment of HIV-1 infection: a randomised, double-blind, phase 3, non-inferiority trial. *The Lancet*. 2012;379:2429-2438.
- de Mendoza C, Garrido C, Rodriguez C, Aguilera A, Gutierrez F, LaPaz M et al. Trends in HIV-1 non-B subtypes and drug resistance among Individuals with primary HIV infection in Spain since year 1997. *Antivir Ther*. 2011;16:A158.
- de Mendoza C, Rodríguez C, Colomina J, Tuset C, García F, Eiros JM et al. Resistance to nonnucleoside reverse-transcriptase inhibitors and prevalence of HIV type 1 non-B subtypes are increasing among persons with recent infection in Spain. *Clin Infect Dis*. 2005;41:1350-1354.
- Delgado R. Características virológicas del VIH. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2011;29:58-65.

Descamps D, Damond F, Matheron S, Collin G, Campa P, Delarue S, et al. High frequency of selection of K65R and Q151M mutations in HIV-2 infected patients receiving nucleoside reverse transcriptase inhibitors containing regimen. *J Med Virol*. 2004;74:197-201.

Diallo K, Gotte M, Wainberg MA. Molecular impact of the M184V mutation in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003;47:3377-3383.

Documento de consenso de Gesida/Plan Nacional sobre el Sida respecto al tratamiento antirretroviral en adultos infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana. 2013.

Documento de consenso para el seguimiento de la infección por VIH en relación con la reproducción, embarazo, parto y profilaxis de la transmisión vertical del niño expuesto. Grupo de expertos de la Secretaría del Plan Nacional sobre el Sida (SPNS), Grupo de Estudio de Sida GeSIDA/Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia (SEGO) y Sociedad Española de Infectología Pediátrica (SEIP). 2013.

Domingo E, Mas A, Yuste E, Pariente N, Sierra S, Gutierrez-Riva M, et al. Virus population dynamics, fitness variations and the control of viral disease: an update. *Prog Drug Res*. 2001;57:77-115.

Domingo E, Menendez-Arias L, Holland JJ. RNA virus fitness. *Rev Med Virol*. 1997;7:87-96.

Doualla-Bell F, Gaseitsiwe S, Ndungú T, Modukanele M, Peter T, Novitsky V et al. Mutations and polymorphisms associated with antiretroviral drugs in HIV-1C-infected African patients. *Antivir Chem Chemother*. 2004;15:189-200.

Douglas JL, Gustin JK, Viswanathan K, Mansouri M, Moses AV, Früh K. The great escape: viral strategies to counter BST-2/tetherin. *PLoS Pathog*. 2010;6:e1000913.

Doyle T, Smith C, Vitiello P, Cambiano V, Johnson M, Owen A et al. Plasma HIV-1 RNA detection below 50 copies/mL and risk of virologic rebound in patients receiving highly active antiretroviral therapy. *Clin Infect Dis*. 2012;54:729-737.

Dimonte S, Babakir-Mina M, Aquaro S, Perno CF. Natural polymorphisms of HIV-1 subtype-C integrase coding region in a large group of ARV-naïve infected individuals. *Infection*. 2013;41:1097-1102.

Eberle J, Gürtler L. The evolution of drug resistance interpretation algorithms: ANRS, REGA and extension of resistance analysis to HIV-1 Group O and HIV-2. *Intervirology*. 2012;55:128-133.

Emerman M, Malim MH. HIV-1 regulatory/accessory genes: keys to unravelling viral and host cell biology. *Science*. 1998;280:1880-1884.

Eron J, Kumar P, Lazzarin A, Richmond G, Soriano V, Huang J, et al. DTG in subjects with HIV exhibiting RAL resistance: functional monotherapy results of VIKING Study cohort II. 18th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. 2011. February 27-March 2. Boston, MA. Abstract 151LB.

Fang G, Weiser B, Kuiken C, Philpott SM, Rowland-Jones S, Plummer F et al. Recombination following superinfection by HIV-1. *AIDS*. 2004;18:153-159.

Feng Y, Wei H, Hsi JH, Xing H, He X, Liao L, et al. Identification of a novel HIV-1 circulating recombinant Form (CRF65_cpx) comprised of CRF01_AE and subtypes B and C in western Yunnan, China. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2014. [Epub ahead of print].

Foulongne V, Montes B, Didelot-Rousseau MN, Segondy M. Comparison of the LCx human immunodeficiency virus (HIV) RNA quantitative, RealTime HIV, and COBAS AmpliPrep-COBAS TaqMan assays for quantitation of HIV type 1 RNA in plasma. *J Clin Microbiol*. 2006;44:2963-2966.

Gagliardo C, Brozovich A, Birnbaum J, Radix A, Foca M, Nelson J. A multicenter study of initiation of antiretroviral therapy and transmitted drug resistance in antiretroviral-naïve adolescents and young adults with HIV in New York City. *Clin Infect Dis*. 2014. In press.

Gallo RC, Sarin PS, Gelmann EP, Robert-Guroff M, Richardson E, Kalyanaraman VS, et al. Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*. 1983;220:865-867.

García F, Álvarez M, Bernal C, Chueca N, Guillot V. Diagnóstico de laboratorio de la infección por el VIH, del tropismo viral y de las resistencias a los antirretrovirales *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2011;29:297-307.

- García F, Pérez-Cachafeiro S, Guillot V, Alvarez M, Pérez-Romero P, Pérez-Elías MJ et al. Transmission of HIV drug resistance and non-B subtype distribution in the Spanish cohort of antiretroviral treatment naive HIV-infected individuals (CoRIS). *Antiviral Res.* 2011;91:150-153.
- García F, Plana M, Vidal C, Cruceta A, O'Brien WA, Pantaleo G, et al. Dynamics of viral load rebound and immunological changes after stopping effective antiretroviral therapy. *AIDS.* 1999;13:F79–86.
- Gaynor R. Cellular factors involved in the regulation of HIV-1 expression. *AIDS.* 1992;6:347-363.
- Gega A, Kozal MJ. New technology to detect low-level drug-resistant HIV variants. *Future Virol.* 2011;6:17-26.
- Gilbert PB, McKeague IW, Eisen G, Mullins C, Guéye-NDiaye A, Mboup S, Kanki PJ. Comparison of HIV-1 and HIV-2 infectivity from a prospective cohort study in Senegal. *Stat Med.* 2003;22:573-593.
- González N, Bermejo M, Calonge E, Jolly C, Arenzana-Seisdedos F, Pablos JL et al. SDF-1/CXCL12 production by mature dendritic cells inhibits the propagation of X4-tropic HIV-1 isolates at the dendritic cell-T-cell infectious synapse. *J Virol.* 2010;84:4341-4351.
- Gottesman BS, Grosman Z, Lorber M, Itzhak L, Pnina S, Mileguir F et al. Measurement of HIV RNA in patients infected by subtype C by assays optimized for subtype B results in an underestimation of the viral load. *J med virol.* 2004;73:167-171.
- Gottlieb GS, Nickle DC, Jensen MA, Wong KG, Grobler J, Li F et al. Dual HIV-1 infection associated with rapid disease progression. *Lancet.* 2004;363:619-622.
- Green WC. The molecular biology of human immunodeficiency virus type 1 infection. *N Engl J Med.* 1991;324:308-317.
- Gutiérrez C, Hernández-Novoa B, Pérez-Elías MJ, Moreno AM, Holguín A, Drona F, et al. Prevalence of primary resistance mutations to integrase inhibitors in treatment-naïve and -experienced patients infected with B and non-B HIV-1 variants. *HIV Clin Trials.* 2013;14:10-16.
- Han X, An M, Zhang W, Cai W, Chen X, Takebe Y, Shang H. Genome Sequences of a Novel HIV-1 Circulating Recombinant Form, CRF55_01B, Identified in China. *Genome Announc.* 2013;1:e0005-12.
- Hanna GJ, D'Aquila RT. Clinical use of genotypic and phenotypic drug resistance testing to monitor antiretroviral chemotherapy. *Clin Infect Dis.* 2001; 32:774-82.
- Hanna GJ, Johnson VA, Kuritzkes DR. Patterns of resistance mutations selected by treatment of human immunodeficiency virus type 1 infection with zidovudine, didanosine, and nevirapine. *J Infect Dis.* 2000;181:904-911.
- Havlir DV, Bassett R, Levitan D, Gilbert P, Tebas P, Collier AC et al. Prevalence and predictive value of intermittent viremia with combination HIV therapy. *JAMA* 2001;286:171-179.
- Hemelaar J. The origin and diversity of the HIV-1 pandemic. *Trends Mol Med.* 2012;18:182-192.
- Hemelaar J, Gouws E, Ghys PD, Osmanov S. Global trends in molecular epidemiology of HIV-1 during 2000-2007. *AIDS.* 2011;25:679–689.
- Hirsch MS, Günthard HF, Schapiro JM, Brun-Vézinet F, Clotet B, Hammer SM et al. Antiretroviral drug resistance testing in adult HIV-1 infection: 2008 recommendations of an International AIDS Society-USA panel. *Clin Infect Dis.* 2008;47:266-285.
- Hizi A, Tal R, Hughes S. Mutational analysis of the DNA polymerase and ribonuclease H activities of HIV type 2 reverse transcriptase expressed in *Escherichia coli*. *Virology.* 1991;180:339-346.
- Hsi J, Wei H, Xing H, Feng Y, He X, Liao et al. Genome sequence of a novel HIV-1 circulating recombinant form (CRF64_BC) identified from Yunnan, China. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2014. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 24205972.
- Ho D. Viral counts in HIV infection. *Science.* 1996;272:1124-1125.
- Ho DD, Neumann AU, Perelson AS, Chen W, Leonard JM, Markowitz M. Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature.* 1995; 373: 123-126.

- Hurt CB, Sebastian J, Hicks CB, Eron JJ. Resistance to HIV integrase strand transfer inhibitors among clinical specimens in the United States, 2009-2012. *Clin Infect Dis*. 2014;58:423-431.
- Ibe S, Yokomaku Y, Shiino T, Tanaka R, Hattori J, Fujisaki S et al. HIV-2 CRF01_AB: first circulating recombinant form of HIV-2. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2010;54:241-247.
- Johnson VA, Brun-Vézinet F, Clotet B, Günthard HF, Kuritzkes DR, Pillay D, et al. Update of the drug resistance mutations in HIV-1: December 2010. *Top HIV Med*. 2010;18:156-163.
- Johnson VA, Calvez V, Günthard HF, Paredes R, Pillay D, Shafer RW et al. Update of the drug resistance mutations in HIV-1: March 2013. *Top Antivir Med*. 2013; 21:6-14.
- Jourdain G, Wagner TA, Ngo-Giang-Huong N, et al. Association between detection of HIV-1 DNA resistance mutations by a sensitive assay at initiation of antiretroviral therapy and virologic failure. *Clin Infect Dis*. 2010; 50:1397-1404.
- Kantor R. Impact of HIV-1 pol diversity on drug resistance and its clinical implications. *Curr Opin Infect Dis*. 2006;19:594-606.
- Knapp DJ, McGovern RA, Dong W, Poon AF, Swenson LC, Zhong X, et al. Factors influencing the sensitivity and specificity of conventional sequencing in human immunodeficiency virus type 1 tropism testing. *J Clin Microbiol*. 2013;51:444-451.
- Kourí V, Alemán Y, Pérez L, Pérez J, Fonseca C, Correa C, et al. High frequency of antiviral drug resistance and non-B subtypes in HIV-1 patients failing antiviral therapy in Cuba. *J Clin Virol*. 2012;55:348-355.
- Lal RB, Chakrabarti S, Yang C. Impact of genetic diversity of HIV-1 on diagnosis, antiretroviral therapy & vaccine development. *Indian J Med Res*. 2005;121:287-314.
- Lapadat-Tapolsky M, De Rocquign H, Van Gent D. Interactions between HIV-1 nucleocapsid protein and viral DNA may have important functions in the viral life cycle. *Nucleic Acids Res*. 1993;21:831-839.
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, et al. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*. 2007;23:2947-2948.
- Lee CG, Gottesman MM, Cardarelli CO, Ramachandra M, Jeang KT, Ambudkar SV, et al. HIV-1 protease inhibitor are substrates for the MDR1 multidrug transporter. *Biochemistry*. 1998;37:3594-3601.
- Lee PK, Kieffer TL, Siliciano RF, Nettles RE. HIV-1 viral load blips are of limited clinical significance. *J Antimicrob Chemother*. 2006;57:803-805.
- Li JZ, Paredes R, Ribaud HJ, Svarovskaia ES, Metzner KJ, Kozal MJ, Hullsiek KH et al. Low-frequency HIV-1 drug resistance mutations and risk of NNRTI-based antiretroviral treatment failure: a systematic review and pooled analysis. *JAMA* 2011; 305:1327-1335.
- Li Z, Huang Y, Ouyang Y, Xing H, Liao L, Jiang S et al. Mutation covariation of HIV-1 CRF07_BC reverse transcriptase during antiretroviral therapy. *J Antimicrob Chemother* 2013; 68:2521-2524.
- López-Aldeguer J, Aguirrebengoa K, Arribas JR, Esté JA, Kindelán JM. Nuevas dianas y nuevos fármacos en el tratamiento de la infección por el VIH. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2005;23:25-32.
- Loveday C. Nucleoside reverse transcriptase inhibitor resistance. *J AIDS*. 2001;26:10-24.
- Macias J, Palomares JC, Mira JA, Torres MJ, Garcia-Garcia JA, Rodriguez JM et al. Transient rebounds of HIV plasma viremia are associated with the emergence of drug resistance mutations in patients on highly active antiretroviral therapy. *J Infect*. 2005;51:195-200.
- Mahalingham AK, Axelsson L, Ekegren JK, Wanneberg B, Kihlström J, Unge T, et al. HIV-1 protease inhibitors with a transition-state mimic comprising a tertiary alcohol: improved antiviral activity in cells. *J Med Chem*. 2010;53:607-615.
- Martínez-Picado J, Ruiz L, Clotet B. The HIV&Hepatitis C drug resistance and PK Guide. Current antiretroviral drugs: approved and in development. Ediciones Gráficas Rey, SL. 2010. ISBN: 9788469471494.

- Mellors JW, Rinaldo CR Jr, Gupta P, White RM, Todd JA, Kingsley LA. Prognosis in HIV-1 infection predicted by the quantity of virus in plasma. *Science*. 1996;272:1167-1170.
- Menendez Arias L. Molecular basis of human immunodeficiency virus type 1 drug resistance: Overview and recent developments. *Antivir Res*. 2013; 98:93–120.
- Mesplede T, Quashie P, Osman N, Han Y, Singhroy D, Sabbah A et al. Subtype-specific effects of the H51Y and R263K mutations selected in vitro with dolutegravir on integrase activity and viral fitness. 20th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. Atlanta (EEUU). 3-6 Marzo 2013. P624.
- Mesplède T, Quashie P, Wainberg MA. Resistance to HIV integrase inhibitors. *Curr Opin HIV AIDS*. 2012;7:401–408.
- Miedema F. T cell dynamics and protective immunity in HIV infection: a brief history of ideas. *Curr Opin HIV AIDS*. 2006;1:1-2.
- Miller CJ, Li Q, Abel K, Kim EY, Ma ZM, Wietgreffe S, et al. Propagation and dissemination of infection after vaginal transmission of simian immunodeficiency virus. *J Virol*. 2005;79:9217–9227.
- Miller V, Larder BA. Mutational patterns in the HIV genome and cross-resistance following nucleoside and nucleotide analogue drug exposure. *Antivir Ther*. 2001;6:25-44.
- Monge S, Guillot V, Alvarez M, Peña A, Viciano P, García-Bujalance S, et al. Analysis of transmitted drug resistance in Spain in the years 2007–2010 documents a decline in mutations to the non-nucleoside drug class. *Clin Microbiol Infect*. 2012;18:485-490.
- Monge S, Guillot V, Alvarez M, Viciano I, Delgado R, LA Paz, et al. Transmisión de cepas con mutaciones de resistencia en los pacientes naïve en CoRIS. Actualización 2011. IV Congreso nacional GESIDA, Toledo 27-30 de noviembre 2012. P083.
- Mora-Navas L. Prevalencia de mutaciones de resistencia primaria y subtipos no B en una cohorte de pacientes diagnosticados de infección por el virus de la inmunodeficiencia humana tipo I en el área de Málaga. Análisis, evolución y factores asociados (2004-2010). Tesis Doctoral. Málaga 2013.
- Mulinge M, Lemaire M, Servais JY, Rybicki A, Struck D, da Silva ES, et al. HIV-1 tropism determination using a phenotypic Env recombinant viral assay highlights overestimation of CXCR4-usage by genotypic prediction algorithms for CRF01_AE and CRF02_AG. *PLoS One*. 2013;8:e60566.
- Neil SJ, Zang T, Bieniasz PD. Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu. *Nature*. 2008;451:425-30.
- Ng KT, Ong LY, Takebe Y, Kamarulzaman A, Tee KK. Genome sequence of a novel HIV-1 circulating recombinant form 54_01B from Malaysia. *J Virol*. 2012;86:11405-11406.
- Novak RM, Chen L, MacArthur RD, Baxter JD, Huppler HK, Peng G, et al. Prevalence of antiretroviral drug resistance mutations in chronically HIV infected, treatment-naïve patients: implications for routine resistance screening before initiation of antiretroviral therapy. *Clin Infect Dis*. 2005; 40:468-474.
- Ohtaka H, Freire E. Adaptive inhibitors of the HIV-1 protease. *Prog Biophys Mol Biol*. 2005;88:193-208.
- Oliva J, Malo C, Fernández A, Izquierdo A, Marcos H, Cevallos C, et al. Linkage to care among new human immunodeficiency virus diagnoses in Spain. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2014;32:170-173.
- Palacios R, Viciano I, Pérez de Pedro I, de la Torre J, Ropero F, Fernández S, et al. Prevalencia de mutaciones de resistencia primaria en los nuevos diagnósticos de infección por el VIH en la provincia de Málaga. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2008; 26:141-145.
- Palmer S, Maldarelli F, Wiegand A, Bernstein B, Hanna GJ, Brun SC, et al. Low-level viremia persists for at least 7 years in patients on suppressive antiretroviral therapy. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008;105:3879-3884.
- Panel on antiretroviral guidelines for adults and adolescents. Guidelines for the use of antiretroviral agents in HIV-1-infected adults and adolescents. Department of Health and Human Services. Disponible en: <http://aidsinfo.nih.gov/contentfiles/lvguidelines/AdultandAdolescentGL.pdf> (accedido el 21.01.2014).

- Paraskevis D, Pybus O, Magiorkinis G, Hatzakis A, Wensing AM, van de Vijver DA, et al. Tracing the HIV-1 subtype B mobility in Europe: a phylogeographic Approach. *Retrovirology*. 2009;6:49-60.
- Parra-Sánchez M, Luna-Peláez N, Martín-Mazuelos E, Palomares JC. Prevalencia de polimorfismos asociados a disminución de la actividad de Maraviroc. XVI Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Bilbao 9–11 de Mayo de 2012. Presentación poster-oral.
- Parra-Sánchez M, Luna-Peláez N, Zakariya-Yousef I, Martín-Mazuelos E y Palomares JC. Estudio de las discordancias entre algoritmos de interpretación genotípica del tropismo de VIH-1 en secuencias con inserciones o deleciones en la región V3. XVI Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Bilbao 9–11 de Mayo de 2012. Presentación poster-oral.
- Parra-Sánchez M, Zakariya-Yousef I, Córdoba J, Ferrero I, Martín-Mazuelos E, Palomares JC. Bioinformatic application to facilitate the genotypic determination of HIV-1 tropism. 22nd ECCMID (European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases). Londres 31 Marzo-03 Abril 2012. Presentación poster.
- Pata JD, Stirtan WG, Goldstein SW, Steitz TA. Structure of HIV-1 reverse transcriptase bound to an inhibitor active against mutant reverse transcriptases resistant to other nonnucleoside inhibitors. *PNAS*. 2004;101:10548–10553.
- Paxton W, Connor RI, Landau NR. Incorporation of Vpr into human immunodeficiency virus type 1 virions: requirement for the p6 region of gag and mutational analysis. *J Virol*. 1993; 67: 7229-7237.
- Pérez-Alvarez L, Carmona R, Muñoz M, Delgado E, Thomson MM, Contreras G et al. High incidence of non-B and recombinant HIV-1 strains in newly diagnosed patients in Galicia, Spain: study of genotypic resistance. *Antivir Ther*. 2003;8:355-360.
- Pérez-Álvarez L, Delgado E, Vega Y, Montero V, Cuevas T, Fernández-García A et al. Predominance of CXCR4 tropism in HIV-1 CRF14_BG strains from newly diagnosed infections. *J Antimicrob Chemother*. 2014;69:246-253.
- Pineda-Peña AC, Rodrigues-Faria N, Imbrechts S, Libin P, Barroso-Abecasis A, Deforche K et al. Automated subtyping of HIV-1 genetic sequences for clinical and surveillance purposes: Performance evaluation of the new REGA version 3 and seven other tools. *Infect Genet Evol*. 2013;19:337-348.
- Plantier JC, Leoz M, Dickerson JE, De Oliveira F, Cordonnier F, Lemee V et al. A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. *Nat Med*. 2009;15:871–872.
- Poulsen AG, Aaby P, Gottschau A, Kvinesdal BB, Dias F, Mølbak K et al. HIV-2 infection in Bissau, West Africa, 1987–1989: incidence, prevalence, and routes of transmission. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1993; 6: 941-948.
- Pozniak A, Mingrone H, Shuldyakov A, Brites C, Andrade J, Hagins D et al. Dolutegravir vs raltegravir in ART-experienced, integrase-naïve subjects: 24-week interim results from SAILING (ING111762). 20th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI). Atlanta (EEUU). 3-6 Marzo 2013. Poster 179LB
- Reeves J, Doms R. Human immunodeficiency virus type 2. *J Gen Virol*. 2002;83:1253-1265.
- Rivas P, Holguín A, Ramírez de Arellano E, Muñoz-Almagro C, Delgado R, Ortiz de Lejarazu R et al. Tratamiento antirretroviral según tipos y subtipos del virus de la inmunodeficiencia humana. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2006;24:29-33.
- Rodríguez-Rodríguez M, Zamora C. Plan andaluz frente al VIH/SIDA y otras ITS 2010-2015. Consejería de Salud. 2010. Disponible en: http://www.juntadeandalucia.es/export/drupaljda/plan_sida_.pdf. Acceso: 13/02/2014.
- Romero A, Sued O, Puig T, Esteve A, Pumarola A, Casabona J et al. Prevalence of transmitted antiretroviral resistance and distribution of HIV-1 subtypes among patients with recent infection in Catalonia (Spain) between 2003 and 2005. *Enf Infecc Microbiol Clin*. 2011;29:482-489.
- Roquebert B, Damond F, Collin G et al. HIV-2 integrase gene polymorphism and phenotypic susceptibility of HIV-2 clinical isolates to the integrase inhibitors raltegravir and elvitegravir in vitro. *J Antimicrob Chemother*. 2008;62:914-920.
- Roques P, Robertson DL, Souquière S, Apetrei C, Nerrienet E, Barré-Sinoussi F et al. Phylogenetic characteristics of three new HIV-1 N strains and implications for the origin of group N. *AIDS*. 2004;18:1371–1381.

- Sánchez-Oñoro M, López MJ, Santana MA, Andes JM, Campelo FA. Resistencias primarias a los fármacos antirretrovirales en los pacientes diagnosticados de infección por el VIH en Gran Canaria entre los años 2002-2005. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2007;25:437-440.
- Santos AF, Soares MA. HIV Genetic diversity and drug resistance. *Viruses*. 2010;2:503-531.
- Sastri J, Campbell EM. Recent insights into the mechanism and consequences of TRIM5a retroviral restriction. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2011;27:231-238.
- Sauter D, Hué S, Petit SJ, Plantier JC, Towers GJ, Kirchhoff F. HIV-1 Group P is unable to antagonize human tetherin by Vpu, Env or Nef. *Retrovirology*. 2011;8:103-112.
- Schmit JC, Cogniaux J, Hermans P, Van Vaecck C, Sprecher S, Van Remoortel B et al. Multiple drug resistance to nucleoside analogues and nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors in an efficiently replicating human immunodeficiency virus type 1 patient strain. *J Infect Dis*. 1996;174:962-968.
- Schumacher W, Frick E, Kauselmann M, Maier-Hoyle V, van der Vliet R, Babiak R. Fully automated quantification of human immunodeficiency virus (HIV) type 1 RNA in human plasma by the COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan system. *J Clin Virol*. 2007;38:304-312.
- Schwartz O, Marechal V, Danos O, Heard JM. Human immunodeficiency virus type 1 Nef increases the efficiency of reverse transcription in the infected cell. *J Virol*. 1995;69:4053-4059.
- Scott W. The enzymatic basis for thymidine analogue resistance in HIV-1. *AIDS Reviews*. 2001;3:194-200.
- Seclén E, González MM, Lapaz M, Rodríguez C, del Romero J, Aguilera A et al. Primary resistance to maraviroc in a large set of R5-V3 viral sequences from HIV-1-infected patients. *J Antimicrob Chemother*. 2010;65:2502-2504.
- Sievers F, Wilm A, Dineen DG, Gibson TJ, Karplus K, Li W et al. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol Syst Biol*. 2011;7:539.
- Simon F, Mauclère P, Roques P, Loussert-Ajaka I, Müller-Trutwin MC, Saragosti S et al. Identification of a new human immunodeficiency virus type 1 distinct from group M and group O. *Nat Med*. 1998;4:1032-1037.
- Sluis-Cremer N, Arion D, Kaushik N, Lim H, Parniak MA. Mutational analysis of Lys65 of HIV-1 reverse transcriptase. *Biochem J*. 2000;348:77-82.
- Sommadossi J. Comparison of metabolism and in vitro antiviral activity of stavudine versus other 2',3'-dideoxynucleoside analogues. *J Infect Dis*. 1995;171:88-92.
- Taiwo B, Gallien S, Aga E, Ribaldo H, Haubrich R, Kuritzkes DR et al. Antiretroviral drug resistance in HIV-1-infected patients experiencing persistent low-level viremia during first-line therapy. *J Infect Dis*. 2011;204:515-520.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol Biol Evol*. 2013;30:2725-2729.
- Tang MW, Shafer RW. HIV-1 antiretroviral resistance: scientific principles and clinical applications. *Drugs*. 2012;72:e1-25.
- Thomson MM, Delgado E, Manjon N, Ocampo A, Villahermosa ML, Marino A et al. HIV-1 genetic diversity in Galicia Spain: BG intersubtype recombinant viruses circulating among injecting drug users. *AIDS*. 2001;15:509-516.
- UNAIDS: Core Epidemiology Slides. Septiembre 2013. Disponible en: http://www.unaids.org/en/media/unaids/contentassets/documents/epidemiology/2013/gr2013/201309_epi_core_en.pdf. Acceso: 21/01/2014.
- Vallari A, Holzmayer V, Harris B, Yamaguchi J, Ngansop C, Makamche F et al. Confirmation of putative HIV-1 group P in Cameroon. *J Virol*. 2011;85:1403-1407.
- Van Heuverswyn F, Peeters M. The origins of HIV and implications for the global epidemic. *Curr Infect Dis Rep*. 2007;9:338-346.
- Vandekerckhove LP, Wensing AM, Kaiser R, Brun-Vézinet F, Clotet B, De Luca A et al. European guidelines on the clinical management of HIV-1 tropism testing. *Lancet Infect Dis*. 2011;11:394-407.

- Vanden Haesevelde M, Decourt JL, De Leys RJ, Vanderborght B, van der Groen G, van Heuverswijn H et al. Genomic cloning and complete sequence analysis of a highly divergent African human immunodeficiency virus isolate. *J Virol*. 1994;68:1586-1596.
- Vermeiren H, Van Craenenbroeck E, Alen P, Bacheler L, Picchio G, Lecocq P. Prediction of HIV-1 drug susceptibility phenotype from the viral genotype using linear regression modeling. *J Virol Methods*. 2007;145:47-55.
- Vingerhoets J, Tambuyzer L, Azijn H, Hoogstoel A, Nijs S, Peeters M, et al. Resistance profile of travirine: combined analysis of baseline genotypic and phenotypic data from the randomized, controlled Phase III clinical studies. *AIDS*. 2010;24:503-514.
- Volberding PA, Steven G Deeks. Antiretroviral therapy and management of HIV infection. *Lancet* 2010; 376: 49–62.
- Wang K, Samudrala R, Mittler JE. Antivirogram or PhenoSense: a comparison of their reproducibility and an analysis of their correlation. *Antivir Ther*. 2004;9:703-712.
- Wares M, Mesplède T, Quashie PK, Osman N, Han Y, Wainberg MA. The M50I polymorphic substitution in association with the R263K mutation in HIV-1 subtype B integrase increases drug resistance but does not restore viral replicative fitness. *Retrovirology*. 2014;11:7.
- Wei X, Decker JM, Wang S, Hui H, Kappes JC, Wu X, et al. Antibody neutralization and escape by HIV-1. *Nature*. 2003;422:307-312.
- Wensing AM, van de Vijver DA, Angarano G, Asjo B, Balotta C, Boeri E, et al. Prevalence of drug-resistant HIV-1 variants in untreated individuals in Europe: implications for clinical management. *J Infect Dis*. 2005;192:958-966.
- Yebra G, Mulder M, Romero J, Rodríguez C, Holguín A. HIV-1 non-B subtypes: High transmitted NNRTI-resistance in Spain and impaired genotypic resistance interpretation due to variability. *Antiviral Res*. 2010;85:409–417.
- Yebra G, Holguín A. Epidemiología de la transmisión del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 resistente a antirretrovirales en pacientes naïve en España. *Med Clin*. 2010;135:561-567.
- Yebra G, de Mulder M, Martín L, Pérez-Cachafeiro S, Rodríguez C, Labarga P et al. Sensitivity of seven HIV subtyping tools differs among subtypes/recombinants in the Spanish cohort of naïve HIV-infected patients (CoRIS). *Antiviral Res*. 2011;89:19-25.
- Yebra G, de Mulder M, Martín L, Rodríguez C, Labarga P, Viciano I, et al. Most HIV type 1 non-B infections in the Spanish cohort of antiretroviral treatment-naïve HIV-infected patients (CoRIS) are due to recombinant viruses. *J Clin Microbiol*. 2012;50:407-415.
- Yu G, Li Y, Li J, Diao L, Yan X, Lin P, et al. Genetic diversity and drug resistance of HIV type 1 circulating recombinant Form_{BC} among drug users in Guangdong Province. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2009;25:869-875.
- Zack JA, Arrigo SJ, Weitsman SR, Go AS, Haislip A, Chen IS. HIV-1 entry into quiescent primary lymphocytes: molecular analysis reveals a labile, latent viral structure. *Cell*. 1990;61:213-22.