

UNIVERSIDAD DE GRANADA
Departamento de Microbiología



TESIS DOCTORAL

**MODELOS DE INTERPRETACIÓN DE LA RESISTENCIA DEL VIRUS
DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA A LOS FARMACOS
ANTIRRETROVIRALES. VALORACION DE LA CAPACIDAD
PREDICTORA DE LA RESPUESTA VIROLOGICA**

María del Carmen Casañas Carrillo
Granada 2008

La ***Dra. Dña. María Carmen Maroto Vela***, Profesora Catedrática del Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada y Jefe de Servicio de Microbiología del Hospital Universitario San Cecilio de Granada, el ***Dr. D. Federico García García***, Facultativo Especialista del Área de Biología Molecular del Servicio de de Microbiología del Hospital Universitario San Cecilio de Granada y el ***Dr. D. Jose Hernández Quero***, Jefe de Servicio de Medicina Interna del Hospital Universitario San Cecilio de Granada,

Certifican:

Que la Tesis Doctoral que presenta la Licenciada ***María del Carmen Casañas Carrillo***, “**MODELOS DE INTERPRETACIÓN DE LA RESISTENCIA DEL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA A LOS FARMACOS ANTIRRETROVIRALES. VALORACION DE LA CAPACIDAD PREDICTORA DE LA RESPUESTA VIROLOGICA**”, ha sido realizada bajo nuestra dirección, habiendo sido revisada y estando conformes con su presentación para obtener el grado de Doctor, siempre que así lo considere el tribunal que designe la Universidad de Granada.

Granada, 6 de marzo de 2008

Fdo.: María del Carmen Maroto Vela

Fdo.: José Hernández Quero

Fdo.: Federico García García

ÍNDICE

1. Introducción.....	1
1.1. Antecedentes históricos	3
1.2. Características generales del VIH.....	4
1.2.1. Taxonomía.....	4
1.2.2. Estructura del VIH-1.....	4
1.2.3. Ciclo biológico del VIH-1	8
1.3. Evolución de los parámetros virológicos e inmunológicos de los pacientes infectados por el VIH-1.	12
1.4. Variabilidad genética	14
1.4.1. Tasa de mutación	14
1.4.2. Cinética de replicación.....	15
1.4.3. Concepto de cuasiespecie.....	16
1.4.4. Eficacia biológica o <i>fitness</i> viral	17
1.5. Diversidad genética del VIH.....	19
1.5.1. Clasificación del VIH	19
1.5.1.1. Tipos	19
1.5.1.2. Grupos y subtipos	19
1.5.1.3. Formas circulantes recombinantes (CRFs).....	20
1.5.2. Distribución geográfica del VIH.....	23
1.5.3. Implicaciones clínicas y epidemiológicas de los subtipos del VIH	26
1.6. Fármacos antirretrovirales.....	27
1.6.1. Inhibidores de la transcriptasa inversa.....	29
1.6.1.1. Inhibidores de la RT análogos de nucleósidos / nucleótidos (ITIAN).....	30
1.6.1.2. Inhibidores de la RT no análogos de nucleótidos (ITINAN)	32
1.6.2. Inhibidores de la proteasa.....	32
1.6.3. Inhibidores de la entrada y la fusión	34
1.6.4. Inhibidores de la integrasa.....	35
1.6.5. Nuevos fármacos antirretrovirales en desarrollo.....	35
1.6.6. Formulaciones con combinaciones de antirretrovirales	36
1.7. Fracaso terapéutico.....	38

1.8. Resistencia del VIH-1 a los fármacos antirretrovirales	39
1.8.1. Dinámica de generación de resistencias	39
1.8.2. Mecanismos de resistencia.....	41
1.8.2.1. Mecanismos moleculares de resistencia a inhibidores de la RT análogos de nucleósidos y nucleótidos.....	44
1.8.2.2. Mecanismos moleculares de resistencia a inhibidores de la RT no análogos de nucleósidos/nucleótidos.....	47
1.8.2.3. Mecanismos moleculares de resistencia a inhibidores de la proteasa	47
1.8.2.4. Mecanismos moleculares de resistencia a inhibidores de la entrada y la fusión	49
1.8.2.5. Mecanismos de resistencia a nivel celular	52
1.9. Métodos de laboratorio para la detección de resistencias.....	52
1.9.1. Métodos genotípicos.....	53
1.9.2. Métodos fenotípicos.....	55
1.10. Indicaciones clínicas de las pruebas de resistencia	58
1.11. Interpretación del genotipo de resistencia.....	62
1.11.1. Metodología para el desarrollo de nuevas reglas de interpretación del genotipo	65
1.11.2. Discrepancias entre distintos sistemas de interpretación.	68
1.11.3. Validación clínica	69
1.11.4. <i>Fuzzy rules</i>	70
1.11.5. Redes neuronales (<i>Neural networks</i>)	72
1.11.6. Cohortes de resistencias	73
2. Objetivos	77
3. Pacientes y métodos.....	81
3.1. Pacientes	83
3.2. Métodos	85
3.2.1. Determinación de la carga viral.....	85
3.2.2. Detección de mutaciones de resistencia.....	85

3.2.2.1. Procesamiento de la muestra: extracción del ácido nucleico	86
3.2.2.2. Amplificación del ácido nucleico: RT-PCR	88
3.2.2.3. Secuenciación bidireccional y electroforesis de los secuenciados.....	90
3.2.2.4. Alineamiento de las secuencias e interpretación de los resultados	95
3.2.3. Interpretación de las mutaciones de resistencia	97
3.2.3.1. Algoritmos para la interpretación de la resistencia a fármacos antirretrovirales	98
3.2.3.2. Capacidad de los algoritmos para predecir la respuesta virológica	113
3.2.4. Metodología estadística	114
3.2.4.1. Metodología estadística para determinar la capacidad de predicción de la variación del logaritmo de carga viral a los 3 y 6 meses del inicio del tratamiento por los algoritmos	114
3.2.4.2. Metodología estadística para determinar la capacidad de predicción de la supresión de la CV a los 3 y 6 meses del inicio del tratamiento por los algoritmos	117
4. Resultados	119
4.1. Características basales de los pacientes	121
4.2. Prevalencia de mutaciones de resistencia en RT y PR.....	122
4.3. Características de los tratamientos antirretrovirales administrados tras el estudio de resistencias	128
4.4. Respuesta observada tras el cambio de tratamiento	130
4.5. Capacidad de los modelos para predecir la respuesta virológica en la totalidad de los pacientes.....	133
4.5.1. Capacidad de predicción de la respuesta virológica por los distintos modelos (análisis univariante).....	134
4.5.2. Análisis univariante (otras variables).	135
4.5.3. Análisis multivariante	138

4.6. Capacidad de los modelos para predecir la respuesta virológica en los pacientes tratados con didanosina, tenofovir y/o lopinavir/ritonavir.....	143
4.6.1. ddl-TDF-LPV: Capacidad de predicción de la respuesta virológica por los distintos algoritmos (análisis univariante).....	144
4.6.2. ddl-TDF-LPV: Análisis univariante (otras variables)	145
4.6.3. ddl-TDF-LPV: Análisis multivariante	148
4.7. Capacidad de los modelos para predecir la respuesta virológica en los pacientes tratados con didanosina	153
4.7.1. ddl: Capacidad de predicción de la respuesta virológica por los distintos algoritmos (análisis univariante)	154
4.7.2. dd: Análisis univariante (otras variables).	156
4.7.3. ddl: Análisis multivariante	158
4.8. Capacidad de los modelos para predecir la respuesta virológica en los pacientes tratados con tenofovir	163
4.8.1. TDF: Capacidad de predicción de la respuesta virológica por los distintos algoritmos (análisis univariante)	164
4.8.2. TDF: Análisis univariante (otras variables)	166
4.8.3. TDF: Análisis multivariante	168
4.9. Capacidad de los modelos para predecir la respuesta virológica en los pacientes tratados con lopinavir/ritonavir.....	173
4.9.1. LPV/RTV: Capacidad de predicción de la respuesta virológica por los distintos algoritmos (análisis univariante)	174
4.9.2. LPV/RTV: Análisis univariante (otras variables).....	176
4.9.3. LPV/RTV: Análisis multivariante	179
4.10. Tablas resumen de los resultados (apartados 4.5 - 4.9)	182
5. Discusión	185
6. Conclusiones.....	211
7. Bibliografía.....	215

ABREVIATURAS UTILIZADAS

ABC: abacavir

ADN: ácido desoxirribonucleico

AMP: amprenavir

ARN: ácido ribonucleico

ATZ/RTV: atazanavir/ritonavir

AZT: zidovudina

CRF: forma circulante recombinante (*circulating recombinant form*)

ddC: zalcitabina

ddl: didanosina

dNTP: desoxinucleótido trifosfato

DRV/RTVr: darunavir/ritonavir

d4T: estavudina

EFV: efavirenz

EMA: siglas de Agencia Europea del Medicamento

ETV: etravirina

EVG: elvitegravir

FDA: Food and Drug Administration, USA

FPV/RTVr: fosamprenavir/ritonavir

FTC: emtricitabina

IDV: indinavir

ITIAN: inhibidor de la transcriptasa inversa análogo de nucleósido/nucleótido

ITINAN: inhibidor de la transcriptasa inversa no análogo de nucleósido

IP: inhibidor de la proteasa

LPV/RTV: lopinavir/ritonavir

MVC: maraviroc

NAM: mutación de análogos de nucleósidos (*nucleoside analogue mutation*)

NFV: nelfinavir

NVP: nevirapina

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PR: proteasa

RAL: raltegravir

RT: transcriptasa inversa o retrotranscriptasa

SQV/RTV: saquinavir/ritonavir

TAM: mutación de análogos de timidina (*thymidine analogue mutation*)

TARGA: terapia antirretroviral de gran actividad

TDF: tenofovir

TPV/RTVr: tipranavir/ritonavir

UDVP: usuarios de drogas por vía parenteral

UPAMs: Mutaciones universales de multiresistencia a IPs

URF: Forma recombinante única (*unique recombinant form*)

VIH: virus de la inmunodeficiencia humana

3TC: lamivudina

CÓDIGOS DE AMINOÁCIDOS

A: alanina

C: cisteína

D: ácido aspártico

E: ácido glutámico

F: fenilalanina

G: glicina

H: histidina

I: isoleucina

K: lisina

L: leucina

M: metionina

N: asparragina

P: prolina

Q: Glutamina

R: arginina

S: serina

T: treonina

V: valina

W: triptófano

Y: tirosina

1. INTRODUCCIÓN

1.1. ANTECEDENTES HISTÓRICOS.

Los conocimientos sobre los retrovirus comienzan a principios del siglo XX, cuando varios investigadores identifican en animales ciertos agentes transmisibles que eran capaces de producir leucemias y tumores: los retrovirus.

En el año 1970, Temin y Baltimore (Temin, 1970; Baltimore, 1970) descubrieron la transcriptasa inversa (RT) demostrando que el ciclo de vida de los retrovirus (virus ARN) incluía una forma intermedia de ADN, que denominaron provirus.

A finales de los años 70, se comunicó la aparición en hospitales de San Francisco y New York, de varios casos de pacientes jóvenes, previamente sanos, que padecían infecciones oportunistas o tumores hasta entonces sólo descritos en pacientes oncológicos o trasplantados, sometidos a tratamiento con inmunosupresores. Este proceso inmunodepresor, de etiología desconocida, fue denominado Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA). En los años posteriores se constató una progresiva extensión de la enfermedad y una amplia distribución geográfica. Esto, junto con los antecedentes epidemiológicos de los pacientes, llevó a sospechar la etiología infecciosa como causa del proceso y a postular que la enfermedad podía transmitirse por contacto sexual, por inyección de sangre o derivados y por vía trasplacentaria. Por las características epidemiológicas y el déficit inmunitario, debido a la disminución selectiva de linfocitos CD4, se encauzó la investigación a la búsqueda de un retrovirus como causa del proceso.

El primer retrovirus humano, el virus linfotrópico-T humano de tipo I (HTLV-I), causante de la leucemia de células T del adulto fue aislado en 1980 (Poiesz *et al.*, 1980). Dos años después se descubrió el HTLV-II en un enfermo afectado de leucemia de células peludas. En 1983, el grupo de Montagnier (Barré-Sinoussi *et al.*, 1983) aisló un virus linfotrópico a partir de un ganglio de un paciente con una linfadenopatía, al que denominaron virus asociado a la linfadenopatía (LAV). Al año siguiente, Gallo *et al.* (1984) descubrieron otro retrovirus, al que denominaron virus linfotrópico humano de células T (HTLV-III), para distinguirlo de los dos anteriormente descritos. Posteriormente se confirmó que LAV y HTLV-III eran el mismo virus, admitiéndose internacionalmente una nueva denominación, la de virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH), para el agente causal del SIDA.

En 1986, Clavel *et al.* describieron en pacientes con SIDA de África Occidental un virus antigénicamente relacionado con el anterior, que fue denominado VIH-2 para diferenciarlo del inicial, al que se denominó VIH-1.

1.2. CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL VIH.

1.2.1. Taxonomía.

El VIH pertenece a la familia de *Retroviridae*, subfamilia *Lentivirinae*. Los retrovirus se caracterizan por poseer como material genético ARN en la partícula viral y ADN cuando se encuentran en la célula; el cambio de uno a otro tiene lugar por la acción de una enzima presente en la partícula viral, la transcriptasa inversa o retrotranscriptasa (RT). Los retrovirus se clasifican en tres subfamilias: *Oncovirinae*, *Lentivirinae* y *Espumavirinae* (tabla 1.1).

Tabla 1.1. Familia <i>Retroviridae</i>
<p>Subfamilia <i>Oncovirinae</i></p> <p>Virus linfotrópico de células T humana tipo 1 (HTLV-I) Virus linfotrópico de células T humana tipo 2 (HTLV-II) Virus linfotrópico de células T humana tipo 5 (HTLV-V)</p>
<p>Subfamilia <i>Lentivirinae</i></p> <p>Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 2 (VIH-2)</p>
<p>Subfamilia <i>Spumavirinae</i></p> <p>Virus sincitial humano (VSH)</p>

1.2.2. Estructura del VIH-1

El VIH-1 es una partícula esférica de 80 a 100 nm. Posee una envoltura lipoproteica derivada de la célula huésped, donde se insertan las glucoproteínas en 72 proyecciones externas y los antígenos de histocompatibilidad (MHC) de clases I y II derivadas de las células huésped. La envoltura rodea a una nucleocápside icosaédrica denominada *core*, en cuyo interior se localiza el material genético y determinadas enzimas necesarias para el ciclo vital (**figura 1.1**).

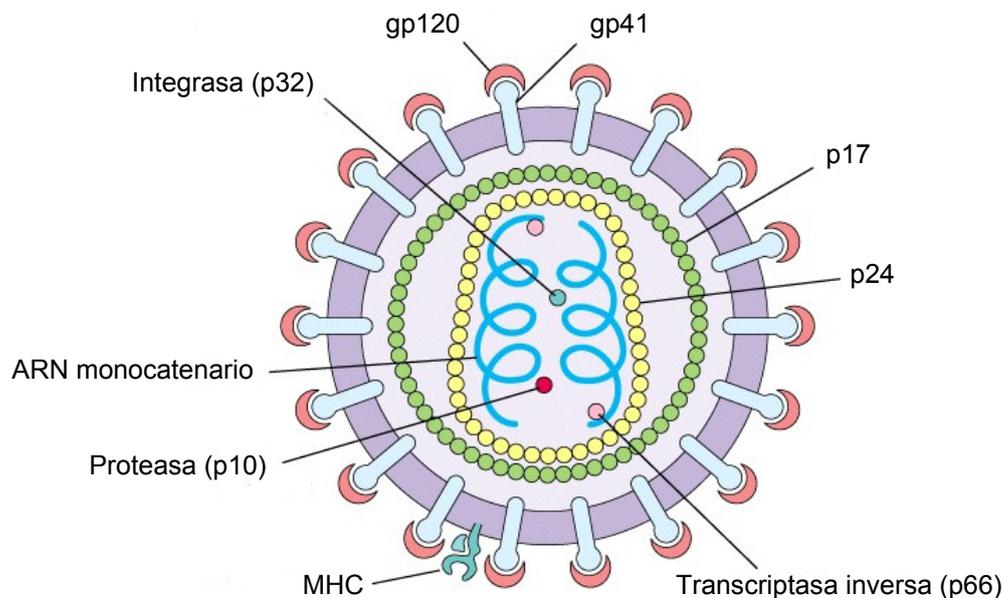


Figura 1.1. Estructura del VIH-1.

El genoma del virus es un ARN de cadena única formado por dos hebras idénticas de 9,8 Kb de polaridad positiva (**figura 1.2**). Emplea la enzima transcriptasa inversa presente en el virión para replicarse, dando lugar al ADN proviral que se integra en el genoma de la célula huésped. Este genoma viral posee tres genes estructurales principales (*gag*, *pol* y *env*) y seis genes reguladores (*nef*, *tat*, *rev*, *vpr*, *vif* y *vpu*). Además, en su forma de provirus, el genoma viral se encuentra flanqueado por unas secuencias repetidas (LTR) que le permiten la integración en el genoma celular, y en las que se localizan los elementos reguladores de la iniciación de la transcripción viral.

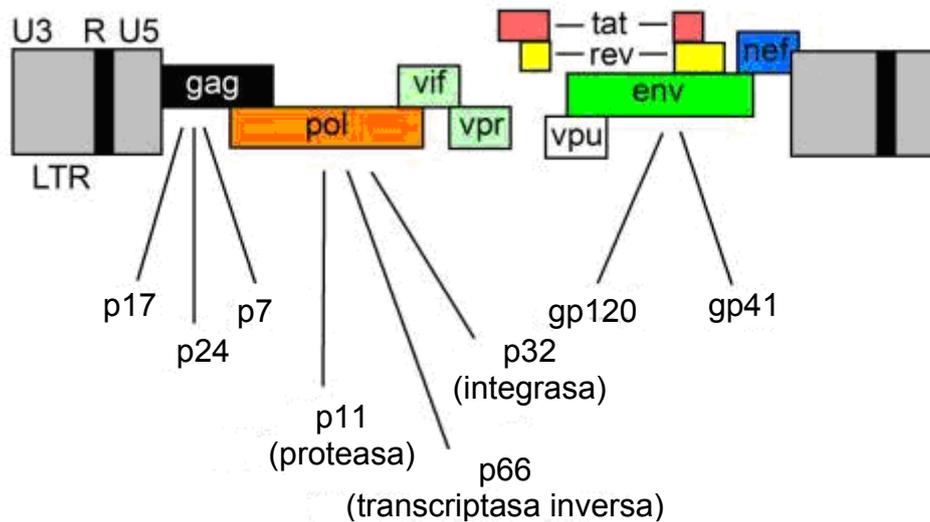


Figura 1.2. Genoma del VIH-1.

En la **tabla 1.2** se resumen las características y funciones de los distintos genes estructurales y reguladores del VIH, y las proteínas codificadas por ellos.

Gen	Proteínas estructurales	Características y/o funciones
<i>gag</i>	p55 Precursora de:	Antígenos de grupo internos p17 Proteína de la matriz, tapiza la superficie interna de la envoltura p24 Proteína de la cápside, antígeno mayoritario
	p15 Precursora de:	Proteínas de la nucleocápside (NC) p9 Proteína unida al ácido nucleico p7 Proteína rica en prolina; ayuda a la encapsidación del virus
<i>pol</i>	p90. Precursora de:	Enzimas p66, p51 Transcriptasa inversa (RT) (ADN polimerasa-ARN dependiente) p15 RNAsa H (RN), función endonucleolítica p10 Proteasa (PR) rotura proteolítica para dar proteínas maduras p32 Integrasa (IN), integración del cADN viral
<i>env</i>	gp160 Precursora de:	Proteínas de la envoltura gp120 Proteína de superficie, interacción con el receptor CD4. gp41 Proteína transmembrana, fusión de la envoltura del virus con la célula
Gen	Proteínas reguladoras	Características y/o funciones
<i>nef</i>	p27	Pleiotrópica, regulación negativa de CD4 y MHC-I; Interferencia en la infectividad de viriones
<i>rev</i>	p19	Regulador de la expresión de las proteínas virales (rotura y transporte de ARNm precursores). Transporte selectivo de ARNm en el citoplasma
<i>tat</i>	p14	Transactivador. Síntesis de ARNm
<i>vif</i>	p23	Proteína asociada a la infecciosidad del virión
<i>vpr</i>	p15	Transporte del complejo de preintegración al núcleo. Bloqueo del ciclo celular
<i>vpu</i>	p16	Aumenta la liberación de viriones de la célula infectada y reduce la acumulación de proteínas virales. Reduce la formación de sincitios y la muerte celular en células T humanas CD4.

Tabla 1.2. Proteínas estructurales y reguladoras del VIH-1 (Schüpbach et al., 2003)

1.2.3. Ciclo biológico del VIH-1.

El ciclo biológico del VIH se divide en dos etapas bien diferenciadas (**figura 1.3**): la fase temprana, que culmina con la integración del ADN proviral en el genoma celular; y la fase tardía, que implica la transcripción del genoma viral y la generación de una progenie infecciosa (Greene, 1991).

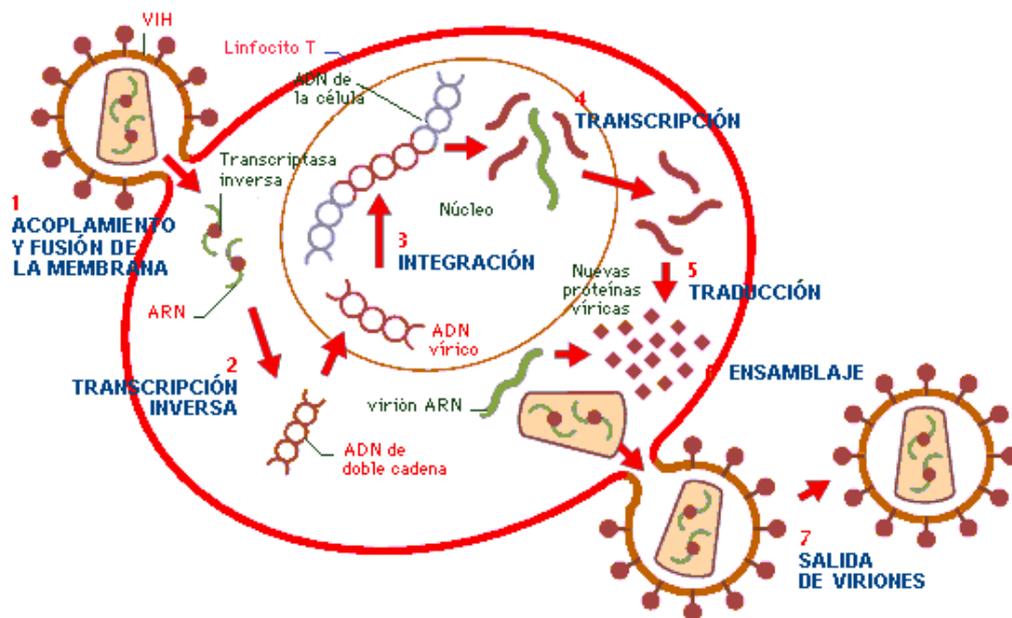


Figura 1.3. Ciclo biológico del VIH.

1) Entrada: interacción con los receptores, fusión e internalización.

La entrada del virus en la célula es un proceso secuencial que se produce mediante la interacción con distintas moléculas situadas en la membrana celular.

En la transmisión por vía sexual el VIH atraviesa el epitelio dañado e infecta las **células de Langerhans** y las **células dendríticas**, que se encuentran en el epitelio estratificado de la mucosa y submucosa vaginal, respectivamente. Estas células son presentadoras de antígeno y expresan en su superficie **DC-SIGN** y **L-SIGN**, una lectinas a las que se adhiere el virus con alta afinidad. Al concentrarse los viriones en la membrana plasmática se facilita enormemente la propagación viral. La transmisión del VIH a los linfocitos CD4 tiene una eficacia muy superior a la

capacidad infectiva de partículas virales solubles no unidas a estas lectinas (Alcamí, 2004).

La infección de las células dendríticas es evidente a las 24-72 horas de la entrada del virus. En las 24-48 horas siguientes las células dendríticas infectadas migran a los ganglios linfáticos regionales, donde activan e infectan gran cantidad de linfocitos CD4, amplificando de forma explosiva la infección y producción viral. En menos de una semana el virus se disemina por vía hematógica a todo el organismo (ganglios linfáticos, SNC, gónadas, sistema digestivo), de forma que cuando aparecen los síntomas el virus ya está en todos los órganos y el reservorio viral, responsable de que el virus no se pueda erradicar, ya se ha establecido. La carga viral se expande de forma exponencial y a las 4 semanas de la infección se alcanza el pico más elevado en plasma, secreciones genitales y otros compartimentos (Miró *et al.*, 2004). En la transmisión parenteral, a partir de sangre o hemoderivados, el virus penetra directamente en la sangre.

Las partículas virales infectan a los linfocitos CD4 mediante la interacción con dos tipos de receptores. Por un lado, los **receptores CD4**, receptores específicos y comunes a todos los subtipos del VIH, presentes en la superficie de los linfocitos T colaboradores y en células de la estirpe mononuclear-fagocítica, lo que determina el tropismo viral por estos dos tipos celulares. Por otro lado, se observó que la presencia de la molécula de CD4 era condición necesaria pero no suficiente para permitir la entrada del VIH en la célula. Para que se produzca la fusión de membrana viral y celular y la internalización de la nucleocápside viral es necesaria la presencia de unos **correceptores**, los receptores de quimiocinas **CCR5** y/o **CXCR4**. Las quimiocinas son mediadores inmunológicos implicados en el reclutamiento de células durante la respuesta inmune. El uso de uno u otro correceptor define el tropismo de la cepa: cepas R5 o no sincitiales con tropismo a macrófagos (CCR5), cepas X4 o sincitiales con tropismo a células T (CXCR4) y cepas R5X4 que pueden entrar en la célula utilizando cualquiera de los dos correceptores. Este tropismo está determinado por la presencia de ciertos aminoácidos en algunos dominios de la gp120, sobre todo en los dominios V3 y V2. Las **cepas R5** son las principales implicadas en la transmisión en las **etapas tempranas** de la infección, no detectándose en esos estadios cepas de tipo X4. Se ha demostrado que las células diana en las primeras etapas de la infección sólo expresan el receptor CCR5 en la

membrana, mientras que el receptor CXCR4 se encuentra internalizado. La elevada presencia de la quimiocina SDF-1, ligando natural del CXCR4, en las mucosas y el tejido linfático hace que este correceptor esté regulado de forma negativa y no se exprese, lo que explica la elevada susceptibilidad a la infección por cepas R5 en la infección aguda. En el **avance** de la infección, frecuentemente se desarrollan **cepas con tropismo X4 o dual R5X4**, que se relacionan con la depleción mayoritaria de linfocitos CD4, por tanto, supone un factor de mal pronóstico (Arrizabalaga *et al.*, 2004; Bermejo *et al.*, 1998; Connor *et al.*, 1997; López-Aldeguer *et al.*, 2005).

En este proceso de interacción entre el virus y la célula, el complejo glucoproteico de la envoltura (gp160) se une a la molécula CD4. Este complejo posee gp120 y gp41 unidas de manera no covalente, formando generalmente trímeros en la superficie del virión. Una vez que se produce dicha unión se generan una serie de cambios, como el desplegamiento de gp120, que adopta una nueva conformación. De este modo, quedan expuestos el dominio V3 y regiones adyacentes, que interaccionan con los correceptores de quimiocinas. Esto provoca nuevos cambios en la estructura espacial de gp120, que expone el dominio N-terminal de gp41. Esta región contiene el denominado **péptido de fusión**, una región altamente hidrofóbica que, una vez anclada en la membrana, provoca la fusión entre la membrana plasmática y la envuelta viral, permitiendo de esta manera la entrada del virus en la célula (**figura 1.4**).

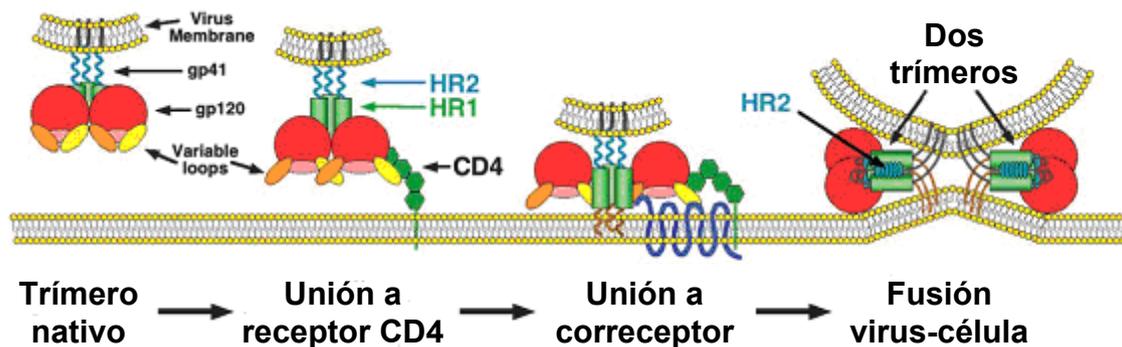


Figura1.4. Interacción con los receptores, fusión e internalización

2) Etapas tempranas: transcripción inversa o integración viral.

Una vez fusionadas las membranas viral y celular, las dos hebras de ARN monocatenario se liberan dentro de la célula junto con las enzimas y proteínas del

core (Greene, 1991). A continuación, una de las hebras de ARN viral se retrotranscribe por acción de la enzima **transcriptasa inversa**. Para la síntesis de una segunda cadena de ADN viral se requiere la acción de la **ribonucleasa H**, que degrada parcialmente el molde de ARN original generándose así un ADN de doble cadena. Una vez sintetizado, el ADN se acopla a una serie de factores celulares y virales, como la proteína *vpr* y la proteína de la matriz viral (p17), formando lo que se denomina el “**complejo de preintegración**” (Fouchier y Malim, 1999). Este complejo es transportado al núcleo y se integra en el genoma celular mediante la acción de la integrasa viral, constituyendo la forma proviral del VIH.

En los linfocitos CD4 en reposo el ADN viral no se integra de inmediato después de la retrotranscripción, sino que se almacena en el citoplasma de la célula. Para que el ADN viral sea transportado al núcleo y se integre en los cromosomas la célula infectada necesita ser **activada**. Existe, por tanto, un 90% de ADN proviral no integrado en los linfocitos circulantes, en forma lineal y episomal circular que constituye un reservorio potencial del VIH. Si el fenómeno de activación no se produce, el ADN no integrado es degradado por las ADNasas celulares.

3) Etapas tardías: reactivación y replicación viral.

El VIH integrado en el genoma celular puede permanecer en estado latente, replicarse de forma controlada o experimentar una replicación masiva, con el consiguiente efecto citopático sobre la célula infectada.

Para llevar a cabo la replicación vírica el ADN proviral tiene que transcribirse para sintetizar ARN mensajero. El inicio de la transcripción del ADN proviral, que se encuentra en los linfocitos CD4 en forma latente, precisa de una serie de factores celulares, entre los que destaca la familia de factores Rel/NF-kB/NF-AT (Alcamí, 1995), cuya forma activa no existe en los linfocitos CD4 en estado de reposo celular, sino que se induce únicamente en el curso de los procesos de activación inmunológica. Por tanto, la replicación del VIH depende absolutamente de la activación de los linfocitos infectados.

La expresión genética temprana comprende la transcripción de los genes reguladores *tat*, *rev* y *nef* mientras que la tardía incluye los genes estructurales y enzimáticos codificados por *gag*, *pol* y *env*, así como los accesorios *vif*, *vpr* y *vpu*. El

gen *tat* codifica una proteína que aumenta la tasa de transcripción del genoma del VIH y, en cooperación con otros factores celulares, permite la elongación completa del ARN mensajero del virus (Greene, 1991). Este es transportado al citosol y procesado en ARNs de distintos tamaños. La proteína codificada por *rev* procesa y facilita el transporte de los ARNm del núcleo al retículo endoplasmático rugoso, donde son traducidos en proteínas por los ribosomas celulares.

Una vez sintetizadas, las proteínas virales deben ser procesadas antes de ensamblarse en lo que serán las partículas virales maduras. Una enzima fundamental en la producción de los viriones es la **proteasa** viral, enzima que provoca la rotura de la poliproteína *gag* en las proteínas de la cápside y nucleocápside (p6, p9, p17, p24), y de la poliproteína *pol*, precursora de todas las enzimas del VIH. Sin embargo, el procesamiento de la gp160 en gp41 y gp120 se produce por una proteasa celular. La maduración final de los viriones y el ensamblaje correcto de las proteínas virales se produce al final del ciclo infectivo. Posteriormente el nucleoide se desplaza a la membrana celular, donde se recubre de la membrana lipídica y de glucoproteínas de superficie adheridas a ella. A continuación, la partícula viral madura se desprende por gemación. Así pues, la proteasa es esencial para que tenga lugar un ciclo vital normal del VIH y, sin su acción, las partículas virales no serán infecciosas.

1.3. EVOLUCIÓN DE LOS PARÁMETROS VIROLÓGICOS E INMUNOLÓGICOS DE LOS PACIENTES INFECTADOS POR EL VIH.

En base a la evolución de los parámetros virológicos e inmunológicos en el curso de la infección VIH, distinguiremos tres períodos: primoinfección, fase crónica y fase avanzada (Pantaleo y Fauci, 1995).

Durante la **fase de primoinfección o infección aguda**, que corresponde al período inmediatamente posterior al contacto con el VIH (2-6 semanas), el virus se disemina extensamente por los órganos linfoides. Existen unos altos niveles de viremia, que se acompaña de una disminución paralela en la cifra de linfocitos CD4, proporcional a la carga viral observada. La primera respuesta inmúnológica corresponde a los linfocitos T CD8+ citotóxicos, que destruyen las células infectadas que expresan antígenos virales en su superficie.

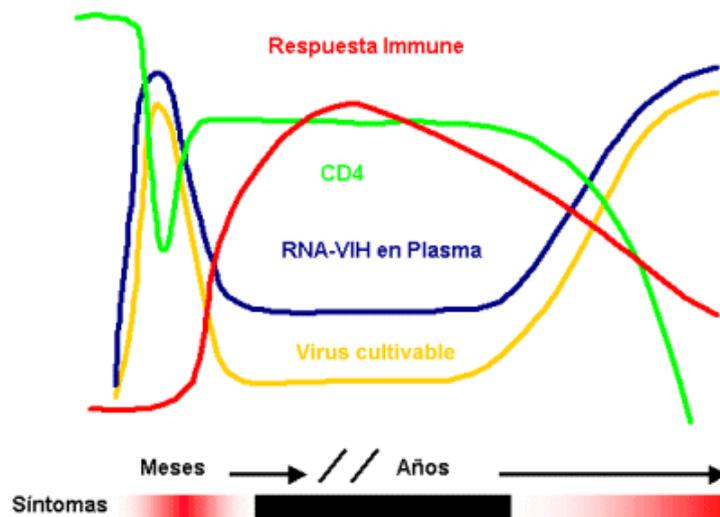


Figura 1.5. Evolución virológica e inmunológica de la infección por el VIH (Paredes *et al.*, 1999).

La **fase crónica asintomática** corresponde a un período que puede durar desde meses hasta más de 15 años. La viremia desciende de forma acusada hasta llegar a niveles indetectables, coincidiendo con la estimulación del sistema inmune; sin embargo, persiste la replicación viral a bajo nivel en determinados reservorios del organismo, ya que la respuesta inmune es incapaz de erradicar el virus del organismo. El nivel de viremia en este periodo se asocia con los años que durará éste, de forma que a menor nivel de viremia, mayor será su duración. Los niveles de linfocitos CD4 tienden a descender progresivamente. Esta caída conduce a la **infección avanzada o SIDA** cuando los niveles de linfocitos T son muy bajos (a partir de unos 200/ μ l), coincidiendo con una aceleración de la replicación viral y el consiguiente incremento de la cantidad de virus y células infectadas circulantes (Landesman, 1996; O'Brien *et al.*, 1996). A largo plazo, el virus y sus mecanismos de diversidad y evasión superan la respuesta inmunológica y la capacidad de regeneración del sistema inmune, que es progresivamente destruido.

Entre los parámetros virológicos e inmunológicos empleados para el seguimiento de la evolución de la infección por el VIH, en la actualidad se considera que el nivel de linfocitos CD4 es el parámetro más importante para decidir el inicio del tratamiento en pacientes asintomáticos. Asimismo, la carga viral plasmática (CV) y el nivel de CD4 deben monitorizarse periódicamente para la valoración de la

respuesta al tratamiento (Hammer *et al.*, 2006; Panel de Expertos GESIDA-Plan Nacional sobre SIDA, 2008); aunque generalmente en los pacientes que reciben tratamiento un aumento de la CV precede o coincide con una disminución en los niveles de linfocitos CD4, se han descrito discordancias entre ambos parámetros, debidas entre otros factores a una escasa adherencia al tratamiento y relacionadas con una mayor mortalidad (Moore *et al.*, 2005).

1.4. VARIABILIDAD GENÉTICA.

Los dos principios que dirigen la evolución de los seres vivos para adaptarse a los cambios ambientales son la mutación y la selección natural. Estos mismos principios son aplicables a la evolución viral, especialmente en el caso de virus ARN, entre ellos el VIH, que muestran una alta tasa de variabilidad e inestabilidad genética, basando su estrategia adaptativa en una continua producción de mutantes a los que la selección conduce a su mantenimiento, expansión o extinción.

La capacidad adaptativa del VIH-1 se basa en la alta tasa de error de las enzimas implicadas en la replicación viral, la rápida cinética de recambio viral a lo largo de toda la infección y en la plasticidad de las proteínas virales (estructurales y enzimáticas).

1.4.1. Tasa de mutación.

La tasa de mutación se define como el número de bases incorrectamente incorporadas por nucleótido y por ronda de replicación, y representa el número de veces que la enzima incorpora un nucleótido erróneo. La tasa de mutación es del orden de 10^{-4} a 10^{-5} sustituciones por nucleótido y por ciclo replicativo (Drake *et al.*, 1998), frente a 10^{-6} a 10^{-7} sustituciones en el ADN celular.

La base bioquímica de la diferencia en tasas de error entre los genes virales y celulares es la ausencia de un mecanismo corrector en las polimerasas y retrotranscriptasas de los virus ARN, como la actividad exonucleasa 3'-5', presente en las ADN polimerasas ADN-dependientes celulares; por esta razón, los nucleótidos incorporados por error no son eliminados.

Dado que el genoma del VIH-1 tiene una longitud de unos 10.000 pares de bases, cabe esperar la presencia de una mutación en cada nueva hebra de ácido nucleico que se sintetice, lo que originará numerosas variantes genéticas del virus. Se ha estimado que en el paciente infectado existen entre $5 \cdot 10^5$ y $5 \cdot 10^{10}$ variantes genéticas, dependiendo del estadio de la infección y de las variaciones entre individuos.

1.4.2. Cinética de replicación.

Mediante el estudio de la cinética de replicación del VIH se ha demostrado que se renuevan cada día del orden de 10^9 a 10^{10} partículas virales en un sujeto infectado no sometido a terapia antirretroviral, lo que conlleva la destrucción directa de 10^7 a 10^8 linfocitos CD4. Por tanto, tendrán un índice de recambio de 10 a 100 veces superior al fisiológico, lo que implica que en situación de equilibrio aproximadamente cada 15 días se remueve la totalidad de los linfocitos CD4 circulantes. Esta dinámica es continua, incluso en fases asintomáticas de la infección (Perelson *et al.*, 1996).

Cuando se instaura un tratamiento se estima que la vida media de un virión es de unas 6 horas y la de un linfocito infectado que replica activamente el VIH se ha estimado en 2,2 días (Ogg *et al.*, 1999). Por tanto, la casi totalidad de la población viral del plasma se renueva cada día. El tiempo transcurrido desde la liberación de un virión hasta que infecta otra célula y se produce la liberación de una nueva generación de viriones se denomina **tiempo de generación media del virus** y se ha estimado en **2,6 días** como. Globalmente se ha calculado que cada célula infectada produce entre 10^4 y 10^5 partículas virales (la mayoría de las cuales son defectivas) y se estima que un 1% del total de linfocitos CD4 del organismo son infectados “de novo” diariamente y destruidos por efecto citopático (Perelson *et al.*, 1996).

Esta elevada dinámica poblacional confiere al VIH una gran capacidad evolutiva en respuesta a presiones selectivas, tanto procedentes del propio organismo (sistema inmune) como del exterior (tratamiento antirretroviral).

1.4.3. El concepto de cuasiespecie.

Como consecuencia del proceso de variación genética las poblaciones de virus ARN están formadas por distribuciones dinámicas de genomas víricos no idénticos pero genéticamente relacionados, denominados **cuasiespecies** (Domingo *et al.*, 1985). Las cuasiespecies se hallan sometidas a un continuo proceso de variación, competición y selección que permiten al virus adaptarse rápidamente al huésped de acuerdo con el ambiente (Eigen *et al.*, 1996). A medida que progresa la infección se imponen por competición y selección variantes con mayor eficacia biológica.

En algunos casos, un genoma con una secuencia definida puede ser el mayoritario y se denomina **secuencia master o secuencia maestra** de la población; es la que muestra mayor eficacia replicativa en el conjunto de mutantes y comprende las variantes más homogéneas y frecuentes (Nájera *et al.*, 1995).

Toda población de virus ARN presenta una secuencia definida estadísticamente, llamada **secuencia promedio o consenso**, que tiene en cada posición el nucleótido más frecuente del conjunto de moléculas de la población y no necesariamente coincide con la secuencia promedio o consenso de la población. En un ambiente constante puede darse un equilibrio poblacional que conduce a una estasis evolutiva, mientras que las perturbaciones ambientales suelen disparar la rápida evolución viral (Domingo *et al.*, 1994; Domingo *et al.*, 1996).

En el organismo del hospedador se producen una serie de presiones selectivas, como la respuesta inmune, que representan para el virus “cuellos de botella” que fuerzan la selección de cuasiespecies con capacidad replicativa (Lukashov *et al.*, 1998).

De igual forma, el tratamiento antirretroviral supone una presión selectiva añadida aplicada desde el exterior, que afecta la dinámica poblacional y selecciona variantes progresivamente resistentes a la medicación (**figura 1.6**). En cada individuo infectado se producen al día 10^{10} nuevos viriones, por lo que es fácil que aparezcan cuasiespecies con mutaciones que les confieren una menor susceptibilidad al fármaco presente en el organismo pero permanecen a niveles bajos en la población vírica global hasta que surge la presión selectiva del tratamiento antirretroviral. Por tanto, las cuasiespecies víricas poseen una memoria

de su historia evolutiva en forma de componentes minoritarios de su espectro de mutantes. Ello tiene un considerable número de implicaciones biológicas, incluida la posibilidad de reemergencia de virus ancestrales cuando se modifican las pautas terapéuticas. La presión selectiva ejercida por los fármacos sustituirá a las subpoblaciones sensibles por otras resistentes pero sin eliminar por completo las primeras, que permanecen en los reservorios, por lo que al cesar la presión por cambio de medicamento pueden volver a predominar subpoblaciones sensibles (Nájera *et al.*, 1995).

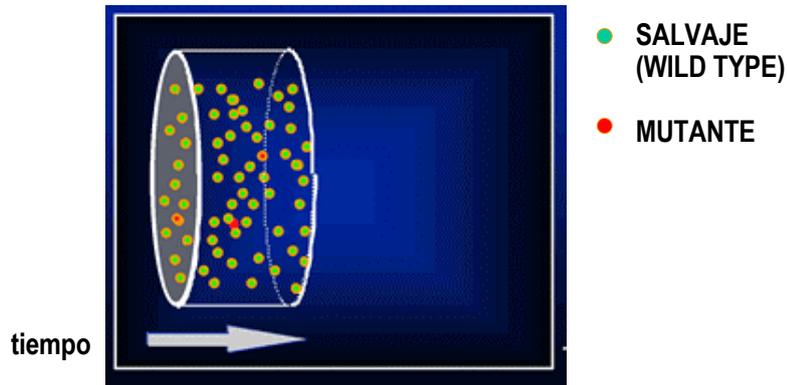
Se ha demostrado que, a pesar de la exposición continua a múltiples variantes del VIH-1, los virus aislados de un mismo individuo están filogenéticamente más próximos entre sí, es decir, la proximidad genética entre ellos es mayor que con las variantes de personas no relacionadas epidemiológicamente.

Cuando proceden de individuos no relacionados epidemiológicamente, la relación entre los virus de una región geográfica concreta está relacionada con el tiempo que el virus lleva circulando en esa población y el número de cepas que iniciaron su difusión.

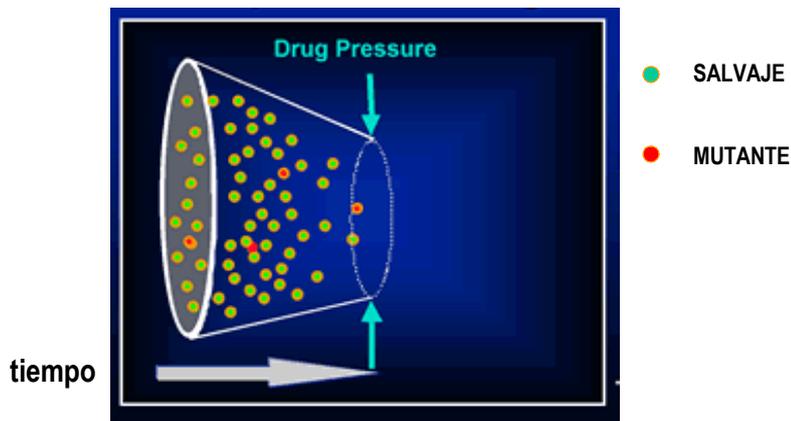
1.4.4. Eficacia biológica o *fitness* viral.

La frecuencia de cada mutante en particular en la población vírica no solamente está determinada por la tasa de mutación en la posición considerada, sino también por su eficacia biológica (*fitness* viral) con respecto al resto de mutantes presentes en la cuasiespecie. La eficacia biológica mide la capacidad de una cuasiespecie para imponerse a otra en un proceso competitivo de replicación, de manera que predominarán las variantes que mejor se adapten a un cambio ambiental (Domingo, 1997; Domingo, 1996). La eficacia biológica indica el grado de eficacia con el que un determinado genoma se adapta a una nueva circunstancia. Por ejemplo, en presencia de fármacos antirretrovirales prevalecerán no los virus más resistentes, sino los que mejor se adapten y mantengan conjuntamente capacidad de resistencia y alto nivel de replicación.

Cuasiespecies en la población viral en individuos sin ningún tipo de presión selectiva:



Efecto inicial de la presión interna o externa, el número de virus se reduce pero alguna cuasiespecie persiste:



Si continúa la presión, las cuasiespecies resistentes comenzarán a dominar y escaparán al control:

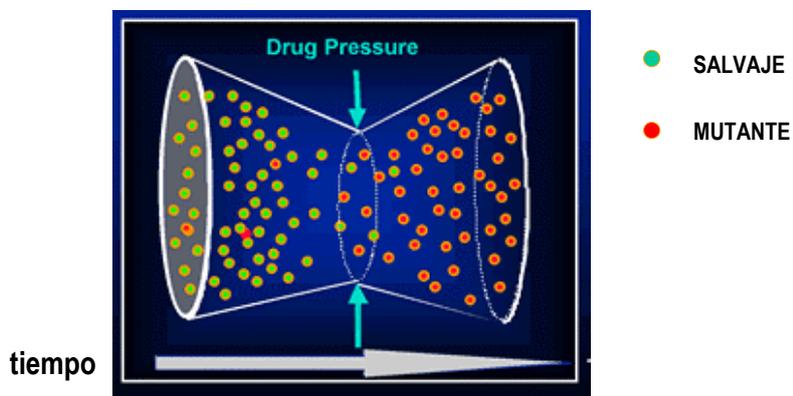


Figura 1.6. Selección de cuasiespecies.

1.5. DIVERSIDAD GENÉTICA DEL VIH.

La alta tasa de variabilidad e inestabilidad genética es la causa de la elevada diversidad del VIH. El virus emplea los mecanismos de mutación y recombinación para provocar un alto grado de heterogeneidad entre subtipos.

1.5.1. Clasificación del VIH.

1.5.1.1. Tipos.

Se han identificado dos tipos de VIH: **VIH-1** y **VIH-2**. El VIH-1 es el más extendido y el responsable de la mayor parte de los casos de infección por VIH en el mundo. El VIH-2, identificado en 1986, tuvo inicialmente una distribución limitada geográficamente al África Occidental, pero actualmente en Europa se han comunicado ya más de un millar de casos de infección por el VIH-2.

Ambos tipos de virus difieren en su epidemiología y en su historia natural. El VIH-2 es más cercano filogenéticamente al virus de la inmunodeficiencia del simio (SIV) que al VIH-1, y parece ser menos patogénico y menos transmisible que el VIH-1. El tiempo de supervivencia tras el diagnóstico de SIDA también es más prolongado en pacientes infectados por VIH-2 que en aquellos portadores del VIH-1.

1.5.1.2. Grupos y subtipos.

Como resultado de los análisis filogenéticos basados en sus secuencias génicas (principalmente en los genes *gag* y *env*), el VIH-1 se ha clasificado en tres grandes grupos: **grupo M** (*main* o principal), **grupo O** (*outlier* o lejano) y **grupo N** (no M, no O) (Robertson *et al.*, 2000). Cada uno de estos grupos tiene sus propias relaciones filogenéticas, lo que sugiere introducciones independientes del VIH-1 en la población humana. La mayoría de las cepas de VIH-1 pertenecen al grupo M, mientras que las de los grupos O y N provienen principalmente de África Central (Perrin *et al.*, 2003).

El **grupo M** es el único del VIH-1 que ha sido subdividido en varios **subtipos: A-D, F-H, J y K** (los subtipos E e I sólo se han detectado en segmentos de cepas recombinantes). Algunos subtipos se clasifican a su vez en sub-subtipos, por ejemplo, el subtipo F está subdividido en dos subclases, F1 y F2. Los subtipos B y D

deberían ser considerados como subclases de un único subtipo, pero por razones históricas es difícil cambiar estas designaciones (Peeters *et al.*, 2003). También dentro del subtipo A, se han descrito las cepas de la subclase A2.

El **VIH-2** se clasifica en **8 subtipos, del A al H**, siendo el subtipo A y, en menor medida el B, los más frecuentes a nivel mundial (Holguin *et al.*, 2005). Hasta que una cepa reúne los criterios para ser definida como un nuevo subtipo nos referimos a ella como U (*unclassified*, no clasificada).

Tabla 1.4. CLASIFICACIÓN DEL VIH.	
VIH-1	Grupo M (<i>main</i>) 9 subtipos: A-D, F-H, J, K 34 CRFs
	Grupo O (<i>outlier</i>)
	Grupo N (<i>new</i>)
VIH-2	8 subtipos (A-H)

1.5.1.3. Formas circulantes recombinantes (CRFs).

La secuenciación de genomas completos del VIH ha demostrado la existencia de recombinantes **intersubtipo**, llamados formas circulantes recombinantes (CRFs), taxonómicamente situadas al mismo nivel que los subtipos del grupo M.

La recombinación constituye una fuente adicional de variación del VIH y desempeña un papel esencial en su evolución y en la expansión geográfica de los subtipos. Ocurre durante el paso de retrotranscripción y antes de la integración, cuando dos cepas diferentes del virus infectan la misma célula (Clavel y Pomerantz, 2002), por lo que es más frecuente en áreas geográficas donde están presentes diferentes subtipos. Para que se produzca la recombinación, los dos provirus parentales distintos han de integrarse en el mismo núcleo. La expresión simultánea y el empaquetamiento correcto del ARN viral generan una primera población heterocigota de partículas virales. La recombinación ocurre sólo tras la reinfección de esa primera generación de virus heterocigotos en nuevas células. Las dos hebras de ARN sirven de forma alternativa de molde para la síntesis del genoma proviral por la transcriptasa inversa, generándose un virus recombinante (**figura 1.7**). La

recombinación puede ocurrir entre diferentes genes o en diferentes regiones de un mismo gen, por lo que para su detección es necesario analizar distintas regiones genómicas del VIH.

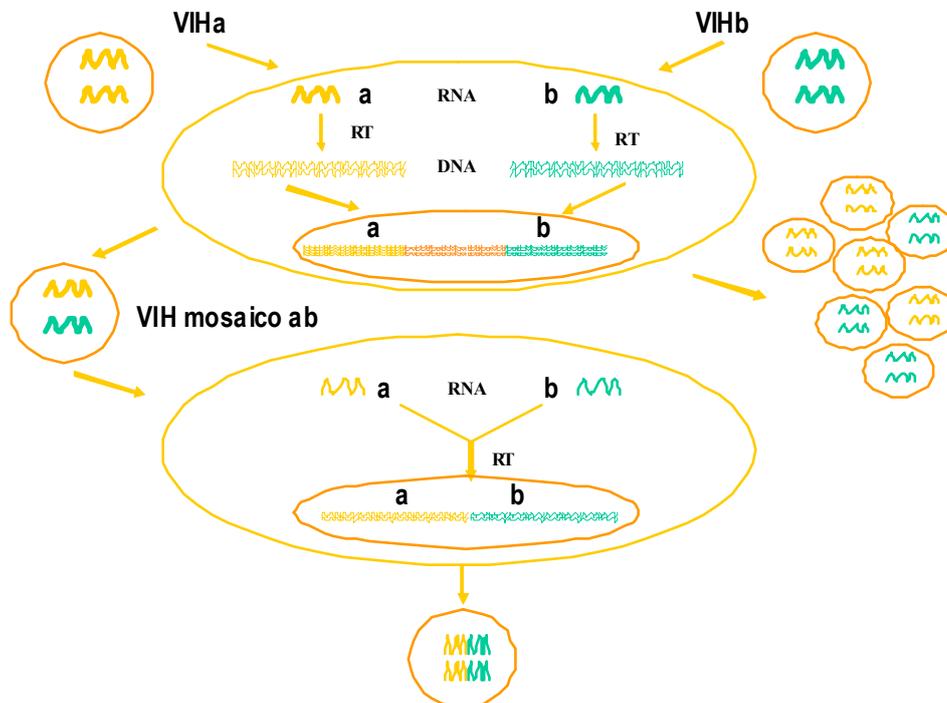


Figura 1.7. Recombinación del VIH.

Más de la mitad de los aislados de VIH-1 secuenciados hasta el momento son recombinantes. La recombinación permite mayores saltos evolutivos que las mutaciones puntuales y puede dar lugar a virus más resistentes a la presión selectiva del sistema inmune o de los antirretrovirales.

Hasta el momento se han descrito 34 CRFs (**tabla 1.5**). Cada CRF se designa con un número de identificación, indicativo del orden cronológico de su descubrimiento, seguido de unas letras colocadas en orden alfabético, indicativas de los subtipos que lo forman. Si el genoma contiene secuencias originarias de más de dos subtipos, las letras se reemplazan por “cpx” (*complex*).

También se han descrito recombinantes entre variantes del mismo subtipo (Allen y Altfeld, 2003; Koelsch *et al.*, 2003; Requejo, 2006; Smith *et al.*, 2005), entre

los grupos M y O (Aghokeng *et al.*, 2004; Vanden Haesevelde *et al.*, 1994) y entre distintos CRFs; sin embargo, aunque se han descrito infecciones duales por VIH-1 y VIH-2, no se han detectado virus recombinantes entre ambos (Requejo, 2006). Los genomas mosaico que no reúnen los requisitos necesarios para constituir un nuevo CRF se denominan **URFs** (formas recombinantes únicas o no clasificables) (Perrin *et al.*, 2003).

Tabla 1.5. Formas circulantes recombinantes (CRFs) del VIH-1 grupo M y subtipos que las componen (www.hiv.lanl.gov. Última modificación: Octubre 2007)			
Nombre	Subtipos	Nombre	Subtipos
CRF01_AE	A, E	CRF18_cpx	A1, F, G, H, K, U
CRF02_AG	A, G	CRF19_cpx	A1, D, G
CRF03_AB	A, B	CRF20_BG	B, G
CRF04_cpx	A, G, H, K, U	CRF21_A2D	A2, D
CRF05_DF	D, F	CRF22_01A1	CRF01, A1
CRF06_cpx	A, G, J, K	CRF23_BG	B, G
CRF07_BC	B', C	CRF24_BG	B, G
CRF08_BC	B', C	CRF25_cpx	A, G, U
CRF09_cpx	CRF02, A, U	CRF26_AU	A, U
CRF10_CD	C, D	CRF27	Pendiente
CRF11_cpx	A, CRF01, G, J	CRF28_BF	B, F
CRF12_BF	B, F	CRF29_BF	B, F
CRF13_cpx	A, CRF01, G, J, U	CRF30	CRF02, CRF06
CRF14_BG	B, G	CRF31_BC	B, C
CRF15_01B	CRF01, B	CRF32_06A1	CRF06, A1
CRF16_A2D	A2, D	CRF33_01B	CRF01, B
CRF17_BF	B, F	CRF34_01B	CRF01, B

1.5.2. Distribución geográfica del VIH.

Al comienzo de la epidemia **VIH-1** y **VIH-2** tenían la misma prevalencia pero estaban geográficamente separados: el VIH-1 predominaba en el este y centro de África, mientras que el VIH-2 se situaba principalmente en África Occidental (Gilbert *et al.*, 2003). Posteriormente, la infección por **VIH-1 del grupo M** (con sus múltiples variantes) se expandió mundialmente (Geretti, 2006). La infección por **grupo O** es menos común: supone menos del 10% en Camerún, (Yamaguchi *et al.*, 2004), aunque se han descrito ya casos en Europa y Estados Unidos. La infección por el **grupo N** se localiza en África Central-Occidental, más concretamente en Camerún (Arien *et al.*, 2005).

A nivel mundial, las formas más prevalentes del VIH-1 grupo M son los subtipos A y C, junto con los recombinantes CRF02_AG y CRF01_AE. En la **tabla 1.6** se muestra la distribución geográfica de los diferentes subtipos del VIH-1 y CRFs. Aunque inicialmente cada subtipo ocupaba un área geográfica definida, en la actualidad los límites geográficos entre subtipos van desapareciendo (**figura 1.8**), debido a la gran movilidad de la población por la emigración y el turismo. Entre otras consecuencias, esto favorece el aumento de las infecciones mixtas en regiones donde coexisten varios tipos de virus (Gascón, 2003).

En **África** existe la mayor diversidad genética, coexistiendo prácticamente todos los subtipos, aunque con grandes diferencias en su distribución entre las diferentes regiones. Los subtipos A y C y el recombinante CRF_02 son los más prevalentes (Arien *et al.*, 2005).

En **Europa Occidental, Norteamérica y Australia** predomina el subtipo B, aunque paulatinamente se están introduciendo los subtipos no-B y distintos CRFs, especialmente en los países con gran afluencia de inmigración subsahariana (Fleury *et al.*, 2003; Herring *et al.*, 2003; Lospitao *et al.*, 2003; Mendoza *et al.*, 2005).

En **Europa Oriental y Asia Central** el subtipo A es el más prevalente (79%), seguido del B, el CRF03_AB y los subtipos C y F. En **Tailandia** la transmisión heterosexual se debe principalmente a CRF01_AE, mientras que la epidemia inicial entre ADVP fue debida a una variante del subtipo B (Thai B). En la **India** las cepas del subtipo C son responsables de 97% de las infecciones (Hemelaar *et al.*, 2006).

En **América Central y del Sur y el Caribe** circula preferentemente el subtipo B; sin embargo, en **Brasil** también es frecuente el subtipo F (Sa-Ferreira *et al.*, 2007), el subtipo C en el sur del país (Soares *et al.*, 2005) y se ha descrito una variante de B (Bb) entre los UDVP. En **Argentina y Uruguay** el recombinante CRF12_BF posee la mayor prevalencia, especialmente en relación con UDVP (Hierholzer *et al.*, 2002).

Tabla 1.6. Distribución mundial del VIH (McCutchan FE, 2006).		
GRUPO	Subclasificación	REGIÓN
M	A (A1-A4)	África, Europa
	B	Europa, América, Tailandia, India, Australia
	C	África, India, Malasia
	D	África
	F (F1, F2)	Africa Central Occidental
	G	Africa Central Occidental
	H	Africa Central Occidental
	J	Africa Central Occidental
	K	Africa Central Occidental
CRF	CRF01_AE	Sudeste de Asia
	CRF02_AG	Africa Occidental
	CRF03_AB	Rusia
	CRF04_cpx	Africa, Chipre, Grecia
	CRF05_DF	África Central
	CRF06_cpx	África Occidental
	CRF07_BC	China
	CRF08_BC	China
	CRF09_cpx	Africa Occidental
	CRF10_CD	Tanzania
	CRF11_cpx	África Central Occidental
	CRF12_BF	Argentina
	CRF13_cpx	Africa Central Occidental
	CRF14_BG	España, Portugal
	CRF15_01E	Tailandia
	CRF16_A2D	Kenia
URF	AC, AD, CD, ACD cpx	Kenia, Ruanda, Tanzania, Uganda, Nigeria, Camerún
	BF	Brasil, Argentina
	CRF01_AE/B	Tailandia, Myanmar (antigua Birmania)
O		Camerún, Senegal
N		Camerún

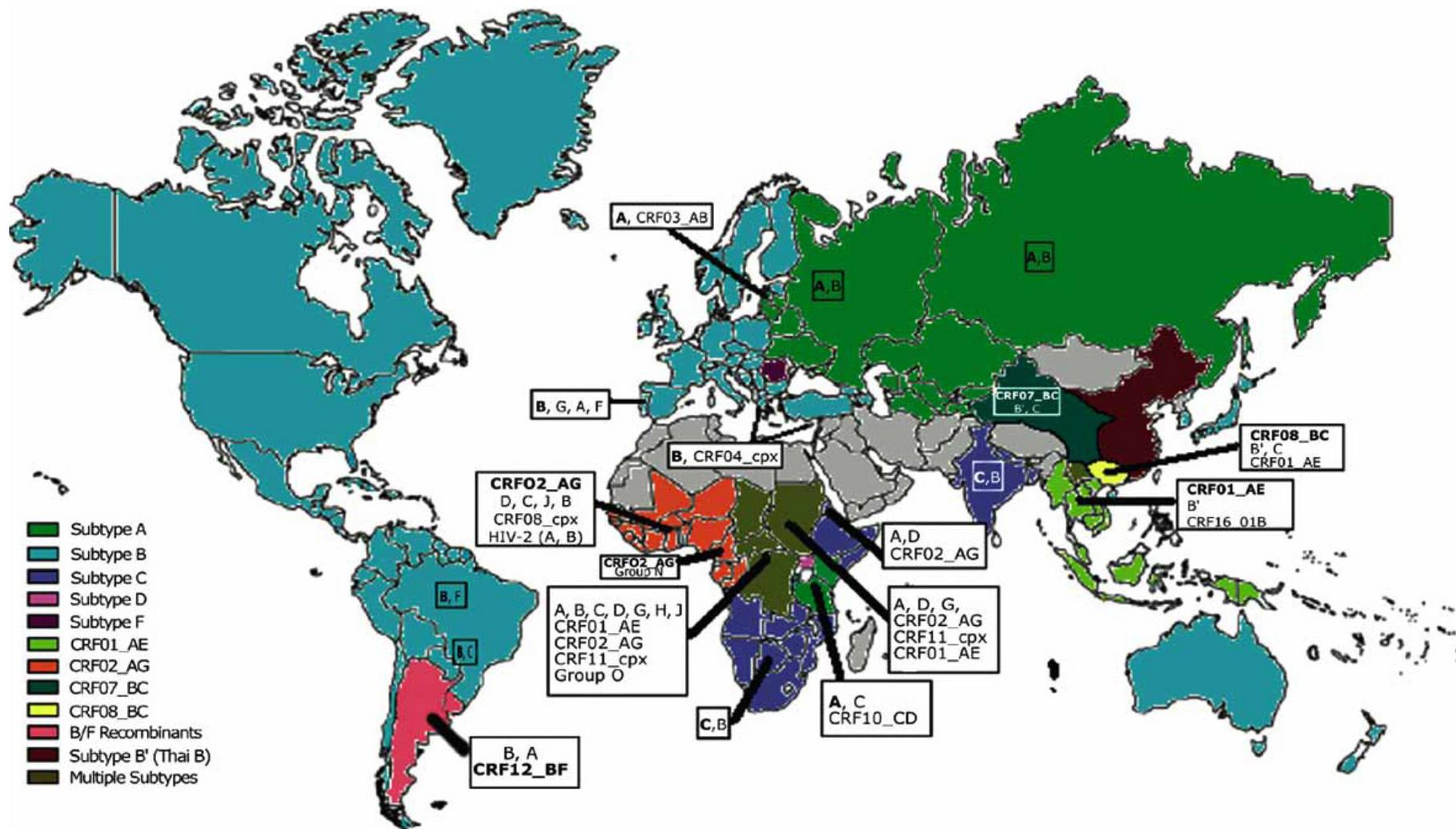


Figura 1.8. Prevalencia mundial y distribución del VIH (Butler *et al.*, 2007).

1.5.3. Implicaciones clínicas y epidemiológicas de los subtipos del VIH.

La mayoría de los primeros genomas analizados a nivel molecular y fenotípico del VIH-1 fueron variantes del subtipo B, que eran las formas más prevalentes en los países desarrollados. Por este motivo, gran parte de las investigaciones sobre biología y patogénesis del VIH-1 se realizaron con cepas de este subtipo. Sin embargo, las consecuencias sobre transmisibilidad, patogenicidad, diagnóstico, tratamiento y diseño de vacunas que resultan de la alta tasa de variabilidad genética del VIH hacen esencial la caracterización de los subtipos del VIH-1 que circulan en cada área geográfica.

Basándose en las diferencias de transmisibilidad entre VIH-1 y VIH-2, se ha sugerido que ciertos subtipos pueden presentar un **mecanismo predominante de transmisión** (homosexual, heterosexual, vertical o parenteral), pero esto no ha sido aún demostrado (Gao *et al.*, 1996; van Harmelen *et al.*, 1997). Algunos trabajos han encontrado diferencias entre los subtipos y el **grado de progresión a SIDA** (Kaleebu *et al.*, 2002), al contrario que otros (Alaeus *et al.*, 1999). Las diferencias entre los resultados de estos estudios podrían deberse también a factores ajenos al virus (huésped, condiciones ambientales, diseño de los estudios, tamaño de muestra, etc.).

Los **procedimientos diagnósticos**, optimizados inicialmente para el diagnóstico del subtipo B, pueden dar resultados falsamente negativos o dudosos cuando se aplican a otros subtipos. De ahí la importancia de incorporar subtipos no-B en técnicas de diagnóstico de VIH, tanto serológico (Tatt *et al.*, 2001; Aghokeng *et al.*, 2004) como molecular (Maes *et al.*, 2004). Sin embargo, la optimización de estas técnicas para subtipos y CRFs poco frecuentes puede ser difícil, dado el escaso número de secuencias completas de las que disponemos, lo que complica su validación (McCutchan, 2006).

Igualmente, algunas de las **técnicas de cuantificación de la carga viral** se basan en el uso de *primers* diseñados frente a secuencias del subtipo B del VIH-1, que podrían no hibridar o hibridar defectuosamente con el genoma de los aislados de subtipos no-B (Jagodzinski *et al.*, 2000; Swanson *et al.*, 2001), lo que daría lugar a valores falsos de carga viral, indetectables (Holguin *et al.*, 1999) o inferiores a los reales (Damond *et al.*, 1999; Harris *et al.*, 2005).

Con respecto a las **técnicas de detección de mutaciones de resistencia a antirretrovirales**, actualmente aún existen problemas en la detección de resistencia en subtipos no-B tanto para los ensayos genotípicos como fenotípicos (Fontaine *et al.*, 2001; Holguin *et al.*, 2003; Jagodzinski *et al.*, 2003; Maes *et al.*, 2004).

La variabilidad genética también influye en la **respuesta al tratamiento antirretroviral** de los diferentes aislados. Se ha demostrado que los distintos subtipos del VIH-1 presentan diferencias de sensibilidad a los antirretrovirales (Palmer *et al.*, 1998). Así, por ejemplo, los ITINANs, activos frente al VIH-1, muestran muy poca actividad frente al VIH-2 o VIH-1 grupo O. Igualmente, enfuvirtida presenta una acción específica frente al VIH-1 (Wainberg, 2003; Kantor y Katzenstein, 2004). Sin embargo, la eficacia de los diferentes antirretrovirales contra los virus no-B no es bien conocida.

El principal reto al que se enfrenta el desarrollo de la vacuna frente al VIH es precisamente su diversidad genética y rápida variación (Garber *et al.*, 2004). Cualquier vacuna que se desarrolle frente al VIH deberá ser elaborada específicamente para cada área geográfica, es decir, dirigida contra los subtipos presentes en dicha área. Con este fin, se deberían incluir epítomos conservados de los subtipos que circulan en la región donde se va a administrar, o de cepas que puedan dar una neutralización cruzada, para que la protección sea más completa y eficaz.

1.6. FARMACOS ANTIRRETROVIRALES.

La erradicación completa del VIH no es posible con los fármacos antirretrovirales de los que disponemos actualmente, puesto que los virus que se encuentran en estado de latencia en los linfocitos T CD4 desde los estadios iniciales de la infección aguda (Chun *et al.*, 1998) son capaces de persistir durante largo tiempo a pesar de que se logre una supresión prolongada de la viremia (Wong *et al.*, 1997). Por tanto, los **objetivos** que llevan a iniciar el tratamiento antirretroviral son: reducir la morbilidad relacionada con el VIH y prolongar la supervivencia, mejorar la calidad de vida del paciente, restaurar y preservar la función inmunológica, lograr una supresión de la CV duradera y

prevenir la transmisión vertical de VIH. Se deben diseñar estrategias terapéuticas que eviten o retrasen la selección de mutaciones que causen resistencias cruzadas y que limitarían la eficacia de los regímenes terapéuticos posteriores. Para lograr el éxito terapéutico, los regímenes de tratamiento deben contener al menos 2 o, preferiblemente, 3 fármacos activos, pertenecientes a varias familias farmacológicas (DHHS Panel on Antiretroviral Guidelines for Adult and Adolescents, 2007). Esto supondrá una barrera genética, farmacocinética y farmacodinámica que dificultará al VIH desarrollar resistencias a los fármacos antirretrovirales (Hammer *et al.*, 1997; Drusano *et al.*, 1998).

En los pacientes con infección por VIH-1 multirresistente o sin opciones terapéuticas en un futuro próximo resulta muy difícil o imposible conseguir la supresión de la CV, por lo que el objetivo terapéutico consistirá en preservar la función inmune y evitar la progresión clínica de la infección. Conseguir recuentos de linfocitos CD4+ >200 μ /l o un descenso de al menos 0,5 \log_{10} en la CV se considera un éxito terapéutico, ya que suele acompañarse de un enlentecimiento en la progresión clínica. El **mega-HAART** es una opción terapéutica de rescate que persigue la supresión completa de la replicación viral mediante la terapia combinada con cinco o más fármacos (por ejemplo, 2 IPs potenciados + 2-3 ITIANs \pm ITINAN); sin embargo, estas pautas no han demostrado beneficio clínico, son muy difíciles de cumplir, presentan una elevada toxicidad y son muy caras. Tampoco se han obtenido buenos resultados con la **interrupción temporal del tratamiento** en pacientes con múltiples fracasos terapéuticos, en los que se produjo un descenso importante del número de linfocitos CD4+ y un mayor riesgo de progresión clínica en comparación con los pacientes que continuaban recibiendo tratamiento (Panel de Expertos de GESIDA-PNS, 2007).

Los fármacos antirretrovirales aprobados hasta el momento se pueden clasificar en **cuatro grupos** principales: inhibidores de la RT análogos de nucleósidos o nucleótidos (ITIAN), inhibidores de la RT no análogos de nucleósidos (ITINAN), inhibidores de la proteasa (IP), inhibidores de la entrada y la fusión e inhibidores de la integrasa (**tabla 1.7**).

Tabla 1.7. Fármacos antirretrovirales aprobados por la FDA (Enero 2008).

INHIBIDORES DE LA TRANSCRIPTASA INVERSA
- ANÁLOGOS DE NUCLEÓSIDOS/NUCLEÓTIDOS (ITIANs)

ZIDOVUDINA (AZT)
 DIDANOSINA (ddI)
 ZALCITABINA (ddC)
 ESTAVUDINA (d4T)
 EMTRICITABINA (FTC)
 LAMIVUDINA (3TC)
 ABACAVIR (ABC)
 TENOFOVIR DF (TDF)

- NO ANÁLOGOS DE NUCLEÓSIDOS (ITINANs)

NEVIRAPINA (NVP)
 DELAVIRDINA (DLV)
 EFAVIRENZ (EFV)
 ETRAVIRINA (ETV, antes TMC-125)

INHIBIDORES DE LA PROTEASA (IPs)

NELFINAVIR (NFV)
 SAQUINAVIR (SQV)
 INDINAVIR (IDV)
 RITONAVIR (RTV)
 LOPINAVIR (LPV)
 ATAZANAVIR (ATV)
 FOSAMPRENAVIR (FPV)
 TIPRANAVIR (TPV)
 DARUNAVIR (DRV, antes TMC-114)

INHIBIDORES DE LA ENTRADA Y LA FUSION

ENFUVRTIDE (ENF, antes T-20)
 MARAVIROC (MVC)

INHIBIDORES DE LA INTEGRASA

RALTEGRAVIR (RAL)

1.6.1. Inhibidores de la transcriptasa inversa.

La RT, enzima fundamental en el ciclo biológico del VIH, es un heterodímero compuesto de dos subunidades, denominadas p66 y p51. En la subunidad p66 se localiza el sitio activo del enzima, formado por el dominio polimerasa unido al dominio ARNasa H. El dominio polimerasa tiene una

morfología peculiar, ya que recuerda la forma de una mano derecha, con tres subdominios denominados *fingers* (dedos), *palm* (palma) y *thumb* (pulgar). La RT sintetiza ADN, utilizando como molde ARN (actividad ADN polimerasa ARN-dependiente) o ADN (actividad ADN polimerasa ADN-dependiente), y degrada ARN cuando éste se encuentra formando parte del complejo ARN-ADN (actividad RNasa H).

Los inhibidores de la RT se clasifican en dos grandes grupos en base a sus características moleculares, que determinan mecanismos de inhibición distintos para ambos grupos de fármacos:

- Inhibidores de la RT Análogos de Nucleósidos o Nucleótidos (ITIAN).
- Inhibidores de la RT No Análogos de Nucleósidos (ITINAN).

1.6.1.1. Inhibidores de la RT Análogos de Nucleósidos / Nucleótidos (ITIANs).

Los fármacos inhibidores de la RT Análogos de **Nucleósidos** son estructuralmente semejantes a los nucleósidos naturales y, al igual que éstos, requieren ser trifosforilados en el citoplasma celular por una fosfoquinasa para ser biológicamente activos. Una vez fosforilados, compiten con los dNTPs en su incorporación a la cadena de ADN sintetizada por la RT (Arts y Wainberg, 1996) interrumpiendo su proceso de síntesis, ya que carecen de grupo hidroxilo en la posición 3' del azúcar y los nuevos nucleótidos no se pueden unir a la cadena de ADN sintetizada.

Los inhibidores de la RT Análogos de **Nucleótidos** actúan de forma similar a los análogos de nucleósidos pero, al estar parcialmente fosforilados, necesitan menos fosforilaciones en el interior de la célula para ser activos.

- **Azidotimidina o Zidovudina (AZT, ZDV):** aunque se sintetizó en 1964 como fármaco antineoplásico, su actividad antirretroviral no se descubrió hasta 1985. Fue el primer fármaco aprobado por la FDA para el tratamiento de la infección por VIH (1987). Es un análogo del nucleósido timidina con actividad frente al VIH-1 y, en menor grado, frente al VIH-2 (Ribera *et al.*, 2004).

- **Didanosina (ddl)**: es un análogo de la adenosina que se fosforila a didesoxiadenosina-trifosfato en el interior de la célula. Fue aprobado por la FDA para el tratamiento antirretroviral en 1991. Presenta una elevada barrera genética (Ortega, 2004)
- **Zalcitabina (ddC)**: es un análogo del nucleósido citosina comercializado desde 1992. Actualmente su uso es muy poco frecuente.
- **Estavudina (d4T)**: es un fármaco análogo del nucleósido timidina, con una eficacia clínica similar al AZT (Spruance *et al.*, 1997). Fue aprobado por la FDA para tratamiento antirretroviral en 1995.
- **Lamivudina (3TC)**: este fármaco es un análogo del nucleósido citosina, que fue aprobado en 1995 por la FDA para su uso combinado, ya que posee una baja barrera genética (Guardiola *et al.*, 2004).
- **Abacavir (ABC)**: este análogo del nucleósido guanosina fue aprobado por la FDA en 1998 para su uso clínico en combinación con otros antirretrovirales. Fue diseñado específicamente para incrementar la potencia, biodisponibilidad oral y penetración en el sistema nervioso central, en comparación con otros análogos de nucleósidos previos. Posee una elevada barrera genética (Antela *et al.*, 2004).
- **Emtricitabina (FTC)**: fue aprobada por la FDA en 2003 para su uso combinado con otros fármacos antirretrovirales. Posee una estructura similar a 3TC pero su actividad *in vitro* frente al VIH-1 es 5-10 veces superior. La incidencia de la mutación M184V cuando se administra FTC (siempre dentro de un régimen que incluya otros fármacos activos) es menor que con 3TC, (Rivero y Camacho, 2005).
- **Tenofovir (TDF)**: el TDF es un inhibidor de la RT análogo de la timidina, con actividad *in vitro* frente a retrovirus y hepadnavirus. Se administra por vía oral como profármaco, tenofovir disoproxil fumarato, convirtiéndose una vez absorbido en tenofovir, que es su forma activa. A diferencia de los fármacos anteriores, el TDF está monofosforilado, por lo que requiere menos reacciones metabólicas intracelulares para adoptar su forma activa (Tuset y Miró, 2004). Puede ser empleado tanto en tratamientos de inicio como de rescate (Moreno *et al.*, 2004).

1.6.1.2. Inhibidores de la RT No Análogos de Nucleósidos (ITINANs).

Los **ITINANs** no requieren activación metabólica intracelular. A diferencia de los ITIANs no se incorporan a la cadena de ADN en formación sino que se unen de forma no competitiva a un lugar cercano al centro catalítico de la enzima, una región hidrofóbica de la subunidad p66 (Spence *et al.*, 1995). Esta unión conduce a un cambio conformacional en la estructura del enzima, que impide la colocación correcta del complejo molde-iniciador, imposibilitando la polimerización del ADN (De Clercq, 1999).

Estos fármacos no son activos frente a cepas del VIH-1 del grupo O ni frente al VIH-2. Algunas cepas del subtipo F también parecen mostrar una menor sensibilidad a estos fármacos (Fonjuno *et al.*, 2002).

- **Nevirapina (NVP)**: es un fármaco aprobado por la FDA en 1996. Se ha observado que la resistencia a NVP aparece a las pocas semanas si se mantiene la viremia detectable en presencia del fármaco (Barreiro y Soriano, 2004). Debido a esta baja barrera genética ha de administrarse dentro de un régimen de tratamiento triple.
- **Efavirenz (EFV)**: fue aprobado por la FDA en 1998. Posee mayor eficacia virológica que NVP. Presenta resistencia cruzada con otros ITINANs (Ferrer *et al.*, 2004).
- **Delavirdina (DLV)**: este fármaco fue aprobado por la FDA en 1997 para el tratamiento combinado de la infección por VIH-1 pero en España no está autorizado.
- **Etravirina (ETV, TMC-125)**: ha sido aprobada recientemente por la FDA (enero de 2008) para tratamientos de rescate. En España se puede solicitar por uso compasivo o acceso expandido.

1.6.2. Inhibidores de la proteasa.

La proteasa del VIH es un homodímero constituido por dos subunidades de 99 aminoácidos codificadas en el extremo 5' del gen *pol* que interaccionan con el sustrato a través de una hendidura situada en la zona de contacto entre

ambas subunidades. Esta enzima actúa en la fase final del ciclo de replicación viral, participando en el procesamiento de las poliproteínas *Gag* y *Gag-Pol*.

Los **fármacos inhibidores de la proteasa (IPs)** se unen al centro activo de esta enzima, compitiendo con sus sustratos naturales (*Gag* y *Gag-Pol*) lo que resulta en la formación de partículas virales inmaduras y, por consiguiente, no infecciosas (Tomasselli y Heinrichson, 2000).

- **Saquinavir (SQV)**: Fue el primer IP aprobado por la FDA para uso clínico, en 1995. Es un potente inhibidor de la proteasa del VIH-1 y VIH-2. Se suele administrar con otro IP, **Ritonavir**, que inhibe el citocromo P450 e incrementa la biodisponibilidad del SQV (Merry *et al.*, 1997).
- **Ritonavir (RTV)**: fue el segundo IP aprobado (1996). Presenta interacciones complejas con otros fármacos y su eficacia varía según pacientes y situaciones. Actualmente se utiliza a bajas dosis como potenciador del efecto de otros IP, excepto nelfinavir, debido a su efecto inhibidor del citocromo P450 (Miralles, 2006).
- **Indinavir (IDV)**: fue aprobado también en 1996. En su mayor parte es metabolizado por el citocromo P450, por lo que su actividad se incrementa si se administra junto a ritonavir a pequeñas dosis. Actualmente no está indicado en regímenes de inicio, debido a su menor eficacia, mayor toxicidad y mayor complejidad de uso en comparación con otros IP (Panel de Expertos de GESIDA y Plan Nacional sobre el SIDA, 2007).
- **Nelfinavir (NFV)**: fue aprobado por la FDA en 1997. Combinado con otros fármacos antirretrovirales tiene un efecto aditivo (con ddI y d4T) o sinérgico (AZT, 3TC, ddC) (Partaledis *et al.*, 1995). Por las mismas razones que IDV, tampoco está indicado en regímenes de inicio (Panel de Expertos de GESIDA y Plan Nacional sobre el SIDA, 2007).
- **Lopinavir (LPV)**: este fármaco es un análogo del RTV activo frente a mutantes resistentes a este último, aprobado por la FDA en el año 2000. Se comercializa en una especialidad farmacéutica, Kaletra[®], que combina LPV con una pequeña dosis de RTV. Se utiliza tanto en pacientes *naïve* como en terapias de rescate (Oldfield *et al.*, 2006). Se está estudiando su eficacia en

monoterapia tras la inducción de respuesta virológica con triple terapia que incluye LPV/r (Escobar *et al.*, 2006).

- **Fosamprenavir (FOS):** este profármaco del amprenavir, aprobado en 2003, una vez absorbido por las células epiteliales del intestino es rápidamente hidrolizado hasta amprenavir, su forma activa, que se une a la proteasa del VIH. Amprenavir es metabolizado en el hígado por el sistema enzimático citocromo P450, por lo que su actividad se potencia cuando se administra con bajas dosis de ritonavir (Arvieux y Tribut, 2005).
- **Atazanavir (ATV):** fue aprobado por la FDA en 2003. ATZ posee una elevada selectividad para la proteasa viral por lo que es muy poco tóxico (Robinson *et al.*, 2000). Es activo frente a algunos aislamientos de VIH resistentes a otros IPs y tiene la ventaja de no ser metabolizado por el citocromo P450. En pacientes pretratados se recomienda su administración junto con RTV (<http://aidsinfo.nih.gov>).
- **Tipranavir (TPV):** fue aprobado por la FDA en junio de 2005. A diferencia del resto de fármacos IPs, no es un análogo peptídico sino un derivado de la sulfonamida, lo que explica su actividad frente a gran parte de las cepas de VIH resistentes a los IPs anteriores. Para ser efectivo frente a estas cepas debe potenciarse con RTV, que eleva su concentración plasmática. (<http://aidsinfo.nih.gov>).
- **Darunavir (DRV, TMC-114):** Acaba de ser aprobado por la FDA para el tratamiento de la infección por VIH en adultos multitratados en los que no se observa respuesta. Como otros IPs, también debe ser administrado con una dosis baja de ritonavir y combinado con otros fármacos activos. En estudios en fase 2b los pacientes cuyo tratamiento incluyó darunavir/ritonavir alcanzaron mayores porcentajes de reducción de la carga viral que aquellos a los que se administró otro IP potenciado diferente (<http://aidsinfo.nih.gov>).

1.6.3. Inhibidores de la entrada y la fusión.

- **Enfuvirtida (ENF, T-20):** es un péptido sintético de 36 aminoácidos derivado de la secuencia HR2 de la glucoproteína gp41 del HIV-1. Fue aprobado por la

FDA en 2003. A diferencia de otros fármacos antirretrovirales actúa a nivel extracelular, uniéndose al dominio HR1 de gp41 e inhibiendo el cambio conformacional de esta glucoproteína. De esta forma previene la fusión entre la envoltura del HIV y la membrana del linfocito CD4 y, en consecuencia, la penetración de la cápside viral en la célula huésped (Raffi *et al.*, 2004). Ha demostrado eficacia virológica e inmunológica en pacientes altamente pretratados con fracaso virológico y múltiples mutaciones de resistencia.

- **Maraviroc (MVC)**: ha sido recientemente aprobado por la FDA y la EMEA (2007) para su administración en pacientes adultos pretratados infectados por VIH-1 con tropismo CCR5, ya que actúa bloqueando el co-receptor CCR5 e impidiendo así la entrada del virus en la célula (<http://aidsinfo.nih.gov>). Los virus con tropismo dual (CXCR4-CCR5) y los CXCR4 son resistentes a maraviroc.

1.6.4. Inhibidores de la integrasa.

Los fármacos de este grupo actúan inhibiendo la acción de la integrasa, lo que bloquea la integración del ADN del VIH en el ADN de la célula. Hasta el momento **raltegravir (RAL, MK-0518)** es el único fármaco de este grupo aprobado por la FDA (2007). En España se encuentra disponible bajo un programa de acceso expandido para pacientes en situación de fracaso terapéutico.

1.6.5. Nuevos fármacos antirretrovirales en desarrollo.

Con la búsqueda de nuevos fármacos se intenta incrementar su potencia, modificar los perfiles de resistencia, reducir la toxicidad y simplificar las pautas de administración. Entre estos nuevos fármacos podemos citar:

- **Elvitegravir (EVG, GS-9137)**: es un nuevo fármaco del grupo de los inhibidores de la integrasa. La magnitud y durabilidad de la respuesta virológica aumenta cuando EVG/RTV se combina con otro fármaco potente, como por ejemplo ENF (Zolopa *et al.*, 2007).

- **Rilpivirina (TMC-278)**: pertenece a la clase de los ITINANs. Se encuentra disponible bajo un programa de acceso expandido. Posee una potencia similar a EFV pero menos efectos adversos (Ruxrungtham *et al.*, 2007).
- **Bevirimat (PA-457)**: pertenece a una nueva clase de antirretrovirales conocida como **inhibidores de la maduración**. Estos fármacos impiden que las proteínas y partículas producidas en la célula infectada se articulen para formar una nueva copia del VIH, lo que reduce el número total presente en el organismo (Salzwedel *et al.*, 2007).
- **Vicriviroc (SCH-41790, SCH-D)**: pertenece al grupo de inhibidores del correceptor CCR5, como maraviroc.
- **TNX-355**: es un anticuerpo monoclonal en experimentación que pertenece al grupo de inhibidores de la entrada. Actúa uniéndose al receptor CD4 para bloquear la entrada del VIH en la célula (<http://aidsinfo.nih.gov/>).

1.6.6. Formulaciones con combinaciones de antirretrovirales.

El desarrollo de fármacos antirretrovirales coformulados ha supuesto un gran avance en el tratamiento de los pacientes con infección por el VIH, puesto que mejoran la adherencia al tratamiento al disminuir el número de comprimidos, envases y, generalmente también, el número de tomas diarias. Los principales antirretrovirales coformulados que se han comercializado en nuestro país son:

- **Combivir®**: AZT 300mg + 3TC 150 mg (1 comp./12 h). Fue la primera combinación disponible en el mercado, administrada junto con un IP o un ITINAN como terapia de inicio en pacientes *naïve*. Se ha demostrado que retrasa la aparición de cepas resistentes a AZT en pacientes sin TAR previo; en pacientes con la mutación M184V retrasa la aparición de cepas resistentes a análogos de la timidina.
- **Trizivir®**: AZT 300mg + 3TC 150 mg + ABC 300 mg (1 comp./12 h). Aunque la comodidad de su posología mejora la adherencia al tratamiento, en pacientes con elevada CV basal no es tan efectivo como otras pautas que incluyen algún IP o ITINAN, por lo que en estos casos no está indicada como

terapia de inicio. Está indicado en caso de no poder utilizar IPs o ITINANs en pacientes sin fracasos previos o sin tratamientos previos subóptimos con cualquiera de los fármacos que lo componen.

- **Kivexa[®]**: ABC 600 mg + 3TC 300 mg (1 comp./24h). Indicado en pacientes *naïve* con infección por VIH-1 y VIH-2 en combinación con un IP, un ITINAN o un tercer ITIAN. Aunque posee la misma eficacia virológica que Combivir[®] el incremento de linfocitos CD4 observado con Kivexa[®] es mayor. Para administrarlo en pacientes pretratados o con fracaso virológico es necesario un estudio previo de resistencias, ya que las mutaciones M184V, K65R, L74V y Y115F se han asociado con resistencia a Kivexa[®].
- **Kaletra[®]**: LPV 400 mg + RTV 100 mg (adultos: 3 cáps./12 h; niños: 5ml/12 h); **Kaletra[®] Meltrex**, más reciente, requiere un menor número de comprimidos (2 compr./12 h). Se emplea como tratamiento de primera línea, siendo eficaz y bien tolerado a largo plazo en la población *naïve*. También está indicado en pacientes pretratados con fracaso virológico, mostrando una eficacia igual o superior a otros IPs. Posee una elevada barrera genética (requiere un gran número de mutaciones para adquirir resistencia) y farmacológica (puesto que RTV aumenta los niveles plasmáticos de LPV).
- **Truvada[®]**: FTC 200 mg + TDF 245 mg. Esta combinación muestra sinergismo frente a VIH-1. Administrado con EFV a pacientes *naïves* (ensayo GS-934) se ha observado un efecto antiviral superior a Combivir[®] + EFV y menores efectos secundarios.
- **Atripla[®]**: EFV 600 mg + FTC 200 mg + TDF 245 mg (1 comp./24h). Aprobado por la FDA en julio de 2007. Está indicado en el tratamiento de la infección por el VIH-1 en adultos con supresión virológica (< 50 copias/ml) mantenida durante más de 3 meses con su terapia antirretroviral combinada actual.

1.7. FRACASO TERAPÉUTICO.

El fracaso terapéutico se define como una respuesta subóptima a la terapia desde cualquiera de estos 3 puntos de vista: clínico, inmunológico y/o virológico (DHHS Panel on Antiretroviral Guidelines for Adults and Adolescents, 2007; Panel de Expertos de GESIDA y Plan Nacional sobre el SIDA, 2008).

La aparición de una enfermedad oportunista en un paciente en TARV debe considerarse como un **fracaso clínico**, excepto si tienen lugar durante los primeros 3-6 meses de tratamiento en pacientes con inmunodepresión avanzada y una respuesta virológica adecuada.

El **fallo inmunológico** puede definirse como el fallo en alcanzar y mantener un recuento de CD4 >350-500 CD4/mm³ durante 4-7 años o un incremento de 50-100 CD4 sobre el recuento basal a pesar de la supresión virológica.

El **fracaso virológico** se define por cualquiera de estas situaciones: CV detectable a las 24 semanas de iniciado el TARV, o bien, si tras alcanzar una CV indetectable (<50 copias/ml), ésta vuelve a ser detectable en dos determinaciones consecutivas. La aparición aislada de cargas virales detectables bajas (menores de 1000 copias/mL), denominadas *blips*, no siempre es reflejo de fracaso virológico real y aunque la vigilancia debe estrecharse no se recomienda modificar el TARGA (Miralles, 2006).

Los recientes avances en terapia antirretroviral no han conseguido evitar el retorno de la CV a niveles detectables en muchos pacientes. Diversos factores pueden contribuir al fracaso terapéutico:

- inadecuado cumplimiento de la medicación
- alteraciones en el metabolismo intracelular
- farmacocinética subóptima en los diferentes compartimentos del organismo
- potencia farmacológica limitada
- interacción con otros medicamentos
- alteración en la absorción

Todos ellos conducen a la generación de resistencias al permitir la replicación viral. Aunque la aparición de resistencias es una causa importante de fracaso terapéutico, no es la única, y la ausencia de resistencias no predice necesariamente una buena respuesta clínica.

1.8. RESISTENCIA DEL VIH-1 A LOS FÁRMACOS ANTIRRETROVIRALES.

1.8.1. Dinámica de generación de resistencias.

Una de las principales causas del fracaso terapéutico es la habilidad del VIH-1 para desarrollar mutaciones que confieren resistencia a los fármacos antirretrovirales (Havlir *et al.*, 1998; Rey *et al.*, 1998) debido a dos circunstancias:

- La **elevada tasa de replicación viral** en los individuos infectados.
- La transcriptasa inversa tiene una **elevada tasa de error** en la incorporación de nucleótidos, debido a que carece de actividad correctora de errores, generándose moléculas de ARN vírico con frecuentes mutaciones respecto al genoma inicial.

En la dinámica de cuasiespecies se seleccionarán aquellas variantes que posean una **mejor capacidad de adaptación (*fitness viral*)** que el resto frente a una nueva circunstancia, por ejemplo, la presencia de antirretrovirales (Domingo *et al.*, 1997). De manera natural existen variantes del virus con mutaciones que confieren resistencia, las cuales son seleccionadas ante la presión farmacológica y con el tiempo predominan en el conjunto de la población (Hirsch *et al.*, 1998). Se estima que un 0,1-1% de la población vírica en cada sujeto infectado (indetectable por la mayoría de métodos) es resistente a un fármaco, mientras que la resistencia a dos o más fármacos es mucho menos frecuente (Condra *et al.*, 1998). Esta es una de las razones que apoya el empleo de terapia triple (TARGA o terapia antirretroviral de gran actividad): empleando terapias máximamente supresivas desde el inicio del tratamiento, evitamos o, al menos, enlentecemos la aparición de variantes resistentes, como consecuencia de la baja actividad replicativa del virus y, por tanto, de la baja mutabilidad vírica (Kemp *et al.*, 1998). En cambio, los niveles subóptimos de antirretrovirales no inhiben del todo la replicación viral, lo que favorece la generación de nuevas cuasiespecies, con la posibilidad de que se acumulen en un único genoma aquellas mutaciones que confieren conjuntamente capacidad de resistencia y alto nivel de replicación.

La dinámica de generación de resistencias varía entre fármacos de distintas familias e incluso entre compuestos de la misma familia. El fármaco

debe superar una serie de **barreras** farmacocinéticas (absorción, metabolismo y eliminación), farmacodinámicas (metabolismo de un profármaco) y genéticas (número de mutaciones requeridas para desarrollar resistencia a un fármaco determinado) que comprometen su eficacia.

Los fármacos con **baja barrera genética** adquieren un alto nivel de resistencia con la generación de una única variante mutante. Los fármacos con **alta barrera genética** requieren la acumulación de más mutaciones para adquirir un elevado nivel de resistencia. Si analizamos la barrera genética en los distintos grupos de fármacos disponibles encontramos:

-Inhibidores de la RT análogos de nucleósidos/ótidos (ITIANs): su barrera genética es muy variable, dependiendo del fármaco. Así, 3TC tiene una barrera genética baja, ya que una única mutación da lugar a un virus con resistencia de alto nivel al inhibidor. En cambio, ddI presenta una barrera genética bastante mayor, pues se requieren al menos 3 ó 4 mutaciones para que el virus presente un nivel elevado de resistencia.

-Inhibidores de la RT no análogos de nucleósidos (ITINAN). Tienen una baja barrera genética, un solo cambio de nucleótido confiere alta resistencia genotípica a estos inhibidores, y en muchos casos se produce resistencia cruzada entre todos los componentes de la familia. Como excepción, ETV es el primer no análogo con alta barrera genética y actividad en cepas con resistencia a los no análogos existentes

-Inhibidores de la proteasa (IP). Su barrera genética es muy buena, ya que se requieren al menos 2 mutaciones primarias y 3-4 mutaciones secundarias para obtener variantes con alta resistencia a los fármacos (Alcamí, 2004). La proteasa del VIH tiene una gran plasticidad, lo que le permite mutar en numerosas posiciones sin perder completamente su actividad enzimática.

Por tanto, el sinergismo de las combinaciones de antirretrovirales de distintas familias se debe a que las barreras débiles de uno de los componentes son compensadas por las de los otros, junto con la actuación sobre distintas dianas y a través de distintos mecanismos bioquímicos.

1.8.2. Mecanismos de resistencia.

Una de las principales causas de resistencia a los fármacos antirretrovirales es la aparición de **mutaciones** en la región codificante de la transcriptasa inversa, la proteasa, la envoltura o la integrasa.

Las mutaciones se representan por una letra mayúscula indicativa del nombre del aminoácido en la cepa *wild-type* o salvaje, sin mutaciones, seguida del número que indica la posición del aminoácido y finalmente la letra del aminoácido mutado. Así, por ejemplo, M41L indicaría que en la posición 41 del virus mutado aparece una leucina (L) en vez de una metionina (M).

Las **figuras 1.9 y 1.10** muestran las mutaciones asociadas con resistencia a los ITIANs, ITINANs, IPs, inhibidores de la entrada e inhibidores de la integrasa (Johnson *et al.*, 2007; De Mendoza y Soriano, 2007).

Mutaciones en el gen de la proteasa asociadas con resistencia a ITIANs e ITINANs.

ITIANs

Multiresistencia a ITIANs: el complejo de inserción 69 afecta a todos los ITIANs.

M	A	K	L	T	K	
41	62	69	70	210	215	219
L	V	R		W	Y	D

Multiresistencia a ITIANs: el complejo 151 afecta a todos los ITIANs excepto tenofovir.

A	V	F	F	O
62	75	77	116	151
V	I	L	Y	M

Multiresistencia a ITIANs: las mutaciones de análogos de la timidina (TAMs) afectan a todos los ITIANs.

M	D	K	L	T	K	
41	67	70	210	215	219	
L	N	R		W	Y	D

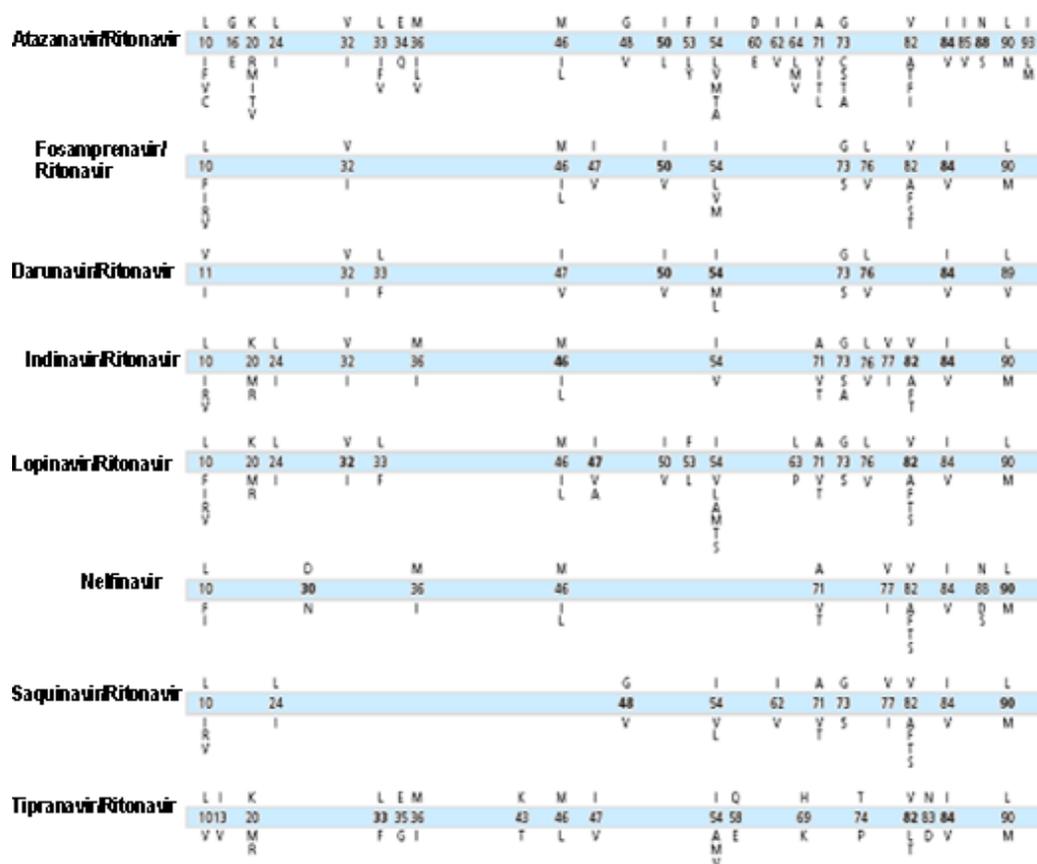
Abacavir	K	L	Y	M			
	65	74	115	184			
	R	V	F	V			
Didanosina	K	L					
	65	74					
	R	V					
Emtricitabina	K			M			
	65			184			
	R			Y			
Lamivudina	K			M			
	65			184			
	R			Y			
Estavudina	M	D	K	L	T	K	
	41	67	70	210	215	219	
	L	N	R		W	Y	D
Tenofovir	K	K					
	65	70					
	R	E					
Zidovudina	M	D	K	L	T	K	
	41	67	70	210	215	219	
	L	N	R		W	Y	D

ITINANs

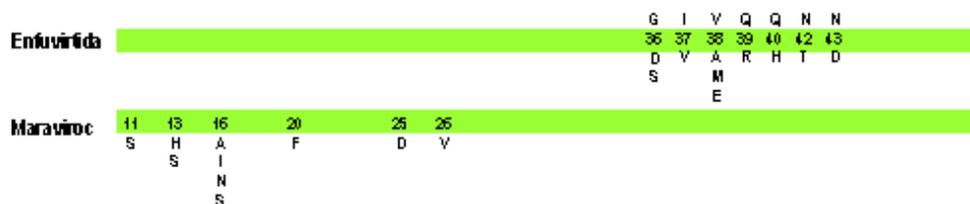
Efavirenz		L	K	V	V	Y	Y	G	P
		100	103	106	108	181	188	190	225
		I	N	M	I	C	L	S	H
Etravirina		V	A	L	K	V	V	Y	G
		90	98	100	101	106	179	181	190
		I	G	I	E	I	D	C	S
Nevirapina		L	K	V	V	Y	Y	G	
		100	103	106	108	181	188	190	
		I	N	A	I	C	C	A	
				M		I	L	H	

Figura 1.9. Mutaciones en el gen de la transcriptasa inversa asociadas con resistencia a ITIAN e ITINAN (Johnson *et al.*, 2007).

Mutaciones en el gen de la proteasa asociadas con resistencia a IPs



Mutaciones en el gen de la envoltura asociadas con resistencia a inhibidores de la entrada.



Mutaciones en el gen de la integrasa asociadas con resistencia a inhibidores de la integrasa.

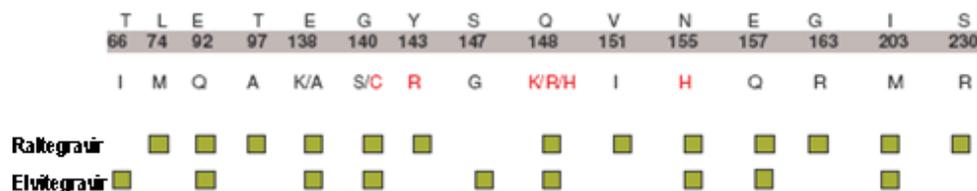


Figura 1.10. Mutaciones de resistencia asociadas a los inhibidores de la proteasa, inhibidores de la entrada e inhibidores de la integrasa (Johnson *et al.*, 2007; De Mendoza y Soriano, 2007).

1.8.2.1. Mecanismos moleculares de resistencia a inhibidores de la RT análogos de nucleósidos y nucleótidos.

- **Pirofosforolisis.**

Consiste en la eliminación del fármaco que bloqueaba la elongación de la cadena de ADN mediante hidrólisis y a concentraciones fisiológicas de pirofosfato o de ATP (Meyer *et al.*, 1999). La RT mutada facilita la aproximación al análogo incorporado de ATP o pirofosfato, que ataca el enlace fosfodiéster que une el análogo a la cadena de ADN, resultando en la retirada del análogo. Cuando el análogo de nucleósido trifosfato es incorporado a la cadena de ADN, en lugar de liberarse el pirofosfato la presencia de múltiples mutaciones de resistencia en la RT evita la translocación, permitiendo la escisión del análogo y la continuación del proceso de extensión con la adición de un nuevo nucleósido trifosfato celular.

Este mecanismo de acción es propio de las **TAMs** o mutaciones asociadas a análogos de la timidina. Actualmente se reconocen como TAMs los cambios en las posiciones 41, 67, 70, 210, 215 y 219. La mutación T215Y/F compromete por sí sola la actividad de AZT, con reducciones de sensibilidad de hasta 15 veces. Si se mantiene la presión farmacológica de análogos de timidina en un régimen no supresor, entonces las TAMs se acumulan secuencialmente, limitando la actividad de d4T y secuencialmente del resto de ITIANs no análogos de la timidina, a excepción de 3TC y FTC.

Aunque existen dos rutas para la acumulación de estas mutaciones, no se conocen con exactitud los factores que condicionan la selección de una u otra ruta. La **ruta 1** se caracteriza por la aparición de T215Y y la posterior acumulación de M41L, L210W y finalmente de D67N (TAMs tipo 1); la **ruta 2** se caracteriza por la selección de T215F o K70R y la posterior acumulación de D67N y K219Q/E/N (TAMs tipo 2). Si no se consigue la supresión virológica y se continúa el tratamiento con un análogo de timidina, se pueden seguir acumulando TAMs hasta alcanzar las seis mutaciones; en estos casos puede servir como índice de la ruta original la detección de T215Y (ruta 1) o de T215F (ruta 2). La importancia de que se seleccione una u otra ruta radica en que ejercen distinto efecto sobre la actividad de los ITIANs: cuando se acumulan 3

TAMs de la ruta 1 la actividad de AZT, d4T y TDF se ve reducida, y con 4 también se ven seriamente afectados ddl y ABC; sin embargo, 3 TAMs de la ruta 2 sólo limitarán la actividad de AZT y con 4 TAMs d4T no tendría actividad, mientras que TDF, ddl y ABC posiblemente no pierdan totalmente su actividad si no hay TAMs de la ruta 1 (Cozzi-Lepri *et al.*, 2005). Las mutaciones T215A/C/D/E/G/H/I/L/N/S/V se han detectado en pacientes en los que previamente existió T215Y/F y posteriormente desapareció la presión de los ITIANs; estos cambios se conocen como “revertientes de T215Y/F” y ante la presencia del ITIAN reaparecerá rápidamente T215Y/F.

Las mutaciones E44D y V118I han sido clasificadas como NAMs (mutaciones asociadas a nucleósidos/ótidos) (Soriano y de Mendoza, 2002a). Parecen ser más comunes en virus de pacientes tratados con 3TC y AZT y se asocian con alto nivel de resistencia a AZT y d4T, probablemente al mejorar la capacidad replicativa de los aislados portadores de TAMs. Sin embargo, se desconoce su significado cuando aparecen de forma aislada (Johnson *et al.*, 2006).

En la transcriptasa inversa de algunos aislados de pacientes sometidos a tratamientos antirretrovirales intensos se han detectado **inserciones** de dos aminoácidos (Ser-Ser, Ser-Ala o Ser-Gly) **entre los codones 69 y 70**, generalmente junto con TAMs (frecuentemente T215Y/F) y otras mutaciones específicas que, en conjunto, confieren resistencia a múltiples análogos de nucleósido (**multirresistencia**), también por rescate mediante pirofosforólisis.

- **Cambios en la afinidad de la RT por ITIAN y dNTPs.**

La RT mutada sufre una pérdida de afinidad por el inhibidor respecto a la RT no mutada, probablemente por interferencia estérica (Miller *et al.*, 2004), sin que se vea afectada significativamente su afinidad por su sustrato natural y permitiendo así continuar la síntesis de ADN. Las mutaciones afectan a residuos implicados directamente en la interacción entre enzima y fármaco.

Dentro de este grupo se encuentran las mutaciones seleccionadas por los ITIANs no análogos de la timidina (TDF, ddl, 3TC, FTC, ABC) o No TAMs, entre las que destacan las siguientes:

- **Complejo Q151M:** comprende un conjunto de mutaciones que aparecen sucesivamente en la RT, confiriendo un alto grado de resistencia a la mayoría de los ITIANs. La mutación Q151M es la primera mutación del complejo que suele aparecer y se localiza muy cerca del sitio de unión del nucleósido a la RT, en una zona altamente conservada. A continuación se van acumulando gradualmente otras mutaciones (A62V, V75I, F77L y F116Y) que van aumentando el grado de resistencia (Ruíz, 2005). Este complejo es poco frecuente en los pacientes infectados por VIH-1 (Quirós-Roldán *et al.*, 2001; Re *et al.*, 2003; Zaccarelli *et al.*, 2004) y, curiosamente, más frecuente en VIH-2 (Clavel y Hance, 2004).
- **M184V/I:** es seleccionada principalmente por 3TC y FTC y, en menor medida por ddl y ABC. Reduce fenotípicamente sólo la actividad de los dos primeros, aunque se ha comprobado que, en presencia de esta mutación, empleando 3TC todavía se pueden conseguir descensos en la CV de hasta 0,5 log (Quan *et al.*, 2003).
- **L74V:** se selecciona por el empleo de ddl y ABC; por sí sola limita mínimamente la actividad de ddl.
- **K65R:** es una mutación poco prevalente. Es seleccionada mayoritariamente por TDF, y en menor proporción por ddl y ABC (Casado, 2006). Afecta principalmente a TDF.
- Otras mutaciones de interés de este grupo son **Y115F**, que aparece en pacientes tratados con ABC, y **K70E**, seleccionada por TDF. Recientemente se ha descrito el cambio **K65N**, que afectaría a TDF y ddl.

Las mutaciones M184V/I, L74V y K65R se caracterizan por disminuir la capacidad replicativa de los virus que las presentan (Shulman *et al.*, 2003). Este hecho se ha utilizado, sobre todo con la mutación M184V, como estrategia para mantener el control inmunológico en pacientes con escasas opciones terapéuticas. Además, se sabe que la mutación M184V y, con mucha probabilidad, también L74V y K65R revierten parcialmente la resistencia a los ITIANs causada por las TAMs. Según los datos de que disponemos en estos momentos, el rescate de pacientes que muestran fracaso virológico a un

régimen que contiene ITIANs es más fácil de realizar si se seleccionan una o varias de estas mutaciones que si se acumulan TAMs (Wainberg *et al.*, 2004).

1.8.2.2. Mecanismos moleculares de resistencia a inhibidores de la RT no análogos de nucleósidos/nucleótidos.

El mecanismo de resistencia para los fármacos de este grupo se debe en la mayoría de los casos a la pérdida de interacciones hidrofóbicas que estabilizan la unión de la RT con el inhibidor (Erickson *et al.*, 1996).

Las mutaciones **K103N**, **Y188L**, **G190C/E/Q/S/T** y **M230L** confieren resistencia a **EFV** y **NVP**, al igual que la presencia de **dos o más** mutaciones del resto de las mutaciones de ITINANs: **K101E**, **V106A**, **Y181C/I**, **G190A/S**, **M230L**. Por el contrario, la presencia de las mutaciones **G190A**, **Y181C** o **Y188C** sólo confiere resistencia a **NVP**. Aunque existen pocos datos acerca de la resistencia a **ETV**, parece que para que ésta se produzca serían necesarias al menos tres mutaciones de resistencia a ITINANs (The TMC-125 C-233 Writing Group, 2007). Sin embargo, otros autores consideran también relevantes para la resistencia a ETV otras mutaciones, como F227C, E138K, V179D/F/E/I/M o P225H, algunas de las cuales se ha visto que también pueden afectar en mayor o menor grado a la sensibilidad a NVP y/o EFV; en base a esto, se está trabajando en el desarrollo/actualización de reglas de interpretación de la resistencia a los ITINANs. (Libre *et al.*, 2007; Vingerhoets *et al.*, 2007; De Mendoza y Soriano, 2007).

1.8.2.3. Mecanismos moleculares de resistencia a inhibidores de la proteasa.

Las mutaciones de resistencia a los IPs se tienden a clasificar según su efecto en la susceptibilidad viral a los fármacos.

- Las **mutaciones primarias** (30, 32, 46, 47, 48, 50, 54, 76, 82, 84, 88 y 90) son relativamente específicas de cada fármaco y aparecen pronto tras la presión selectiva ejercida por éste, en un intento por evadir su acción. Producen una disminución de la afinidad del fármaco por su diana,

incrementando la cantidad de éste necesaria para inhibir el enzima. Por otro lado, su aparición conlleva a menudo una menor capacidad replicativa respecto a las variantes salvajes o *wild type* (Zennou *et al*, 1998): por ello, en ausencia de tratamiento las cepas resistentes suelen hallarse en minoría con relación al conjunto de cuasiespecies de un paciente determinado, mientras que bajo presión farmacológica las mutaciones que confieren resistencia se convertirán en las variantes virales dominantes, dada su ventaja replicativa. Las mutaciones primarias no suelen producir resistencias cruzadas entre distintos IPs.

- Las **mutaciones secundarias** (10, 20, 24, 36, 63, 64, 71, 77 y 93) aparecen generalmente cuando ya existen una o más mutaciones primarias. Por sí mismas no producen resistencia pero se van acumulando lejos del sitio activo de la proteasa y aumentan enormemente el grado de resistencia y la capacidad replicativa del virus (Nijhuis *et al.*, 1999). Estas mutaciones son compartidas por la mayoría de los IPs, lo que conlleva una importante resistencia cruzada entre ellos. Por tanto, la generación de virus con alta resistencia se asocia al fracaso terapéutico de todos estos fármacos (Condra *et al.*, 1995).

Las mutaciones **D30N, V32I, G48V, I50V/L, V82A/T/F/S y I84V** se sitúan en el **dominio central**, mientras que las mutaciones en la **tapadera o hélice** comprenden los **residuos 33 a 62**, con especial importancia de los residuos 46 al 54 debido a su movilidad y a que sus mutaciones comportan mayor grado de resistencia, destacando M46I/L/V, I47V e I54V/T/L/M. Existen también mutaciones en otros residuos, como son: **G73S, N88S y L90M**.

Las mutaciones relacionadas con exposición a cada IP son: D30N para NFV, M46I/L para IDV, G48V para SQV, I50V para APV/FOS, I50L para ATZ o las combinaciones V32I + I47A para LPV y V32I + I47V para FOS. Aun en presencia de dichas mutaciones, cuando estos IPs (a excepción de NFV) se potencian con RTV se puede lograr actividad antiviral, pero en el caso de que además existan otras mutaciones (incluso a niveles indetectables con las técnicas actualmente disponibles) los fármacos podrían no ser activos. Los IPs de nueva generación, TPV y DRV, se han mostrado activos frente a cepas resistentes a los fármacos anteriores, pues requieren un mayor número de

mutaciones en la proteasa para desarrollar resistencia (Valdez *et al.*, 2005; De Meyer *et al.*, 2006).

Los cambios en las posiciones **33, 82, 84 y 90** adquirieron la denominación de **UPAMs**, mutaciones universales de multirresistencia a IPs. No obstante, este término de mutaciones universales debería abandonarse porque no sólo se ha visto que la mutación 90M no se selecciona por TPV ni su presencia confiere resistencia a este fármaco, sino porque, por ejemplo, otra de las mutaciones, la 33F, no tiene ninguna relevancia para al menos 3 IPs (SQV, IDV y NFV) y tan sólo confiere resistencia de bajo grado al resto (García-Deltoro, 2006).

En la proteasa cada vez están adquiriendo más importancia los **polimorfismos**, variaciones naturales de la secuencia que implican cambios en el aminoácido pero sin afectar a la resistencia a los antirretrovirales.

Por último, existen también mutaciones fuera del propio gen de la proteasa, en zonas en las que las poliproteínas son cortadas por la proteasa (*gag cleavage site*), que pueden aumentar la actividad de la enzima compensando la disminución en el *fitness* viral en individuos con mutaciones primarias en la proteasa (Peters *et al.*, 2001; de Mendoza *et al.*, 2002).

1.8.2.4. Mecanismos moleculares de resistencia a inhibidores de la entrada y la fusión.

La resistencia a los inhibidores de la entrada puede deberse a la inhibición de distintos pasos: unión virus-célula e interacción con el co-receptor (pasos en los que está implicada la proteína gp120) y fusión celular (en la que interviene gp41).

La proteína gp120 presenta una gran plasticidad, por lo que sólo un número limitado de mutaciones puede afectar a la unión del VIH al linfocito CD4. La región de la gp120 que se une al co-receptor se localiza cerca de la base de V3, principal determinante del tropismo celular del VIH, por lo que cualquier cambio en esta región que interfiera con la unión del virus a los co-receptores CCR5 y/o CXCR4 puede alterar el tropismo del virus (Soriano y de Mendoza, 2002b).

- **Resistencia a T-20 y otros inhibidores de la fusión.**

Las mutaciones en el dominio HR1 de gp41, especialmente **G36D/S, I37V, V38A/M/E, Q39R, Q40H, N42T y N43D**, generan **resistencia a enfuvirtida** mediante la alteración del sitio de unión (de Mendoza y Soriano, 2004; Johnson *et al.*, 2007). Estos cambios producen además una disminución de la capacidad replicativa del virus, por lo que, tras la supresión del tratamiento, el virus salvaje puede volver a desplazar al resistente (Melby *et al.*, 2002); también pueden seleccionarse mutaciones en otras regiones de gp41 (por ejemplo, en HR2) y/o gp120, que aumenten el grado de resistencia a ENF e incluso mejoren el *fitness* viral (Ruíz, 2005).

Es posible que la generación de resistencias cruzadas entre esta familia de compuestos sea menor que en el resto de fármacos antirretrovirales, así por ejemplo, virus resistentes a ENF mantienen la sensibilidad a otros inhibidores de la fusión, como, por ejemplo, el T-1249 (segundo inhibidor de la fusión en desarrollo también derivado del segmento HR2 de la gp41) (Lorenzo y González, 2004). No obstante, existen también mutaciones que afectan a ENF y T-1249. Para el tratamiento de los aislados resistentes a estos dos fármacos se están ensayando dos nuevos inhibidores de la fusión, TRI-999 y TRI-114.

Puesto que ENF está autorizada para su uso en terapia de rescate, según las recomendaciones nacionales e internacionales, es necesario realizar estudio de resistencias a este fármaco.

- **Resistencia a maraviroc.**

La resistencia a MVC puede deberse a la presencia de variantes minoritarias preexistentes con tropismo X4 o dual, que son seleccionadas como consecuencia de la presión selectiva ejercida por el fármaco, desplazando a las cepas R5.

También han sido descritas algunas mutaciones en la región V3 de gp120 que permiten al virus unirse al receptor CCR5 en presencia de MVC (antagonismo no competitivo) (**figura 1.11**), lo que produce una reducción del porcentaje máximo de inhibición (MPI) pero no un incremento de la IC50; esto implica que no se pueda emplear la IC50 para medir la resistencia a este

fármaco. No parece existir resistencia cruzada entre MVC y ENF (Mori *et al.*, 2007).

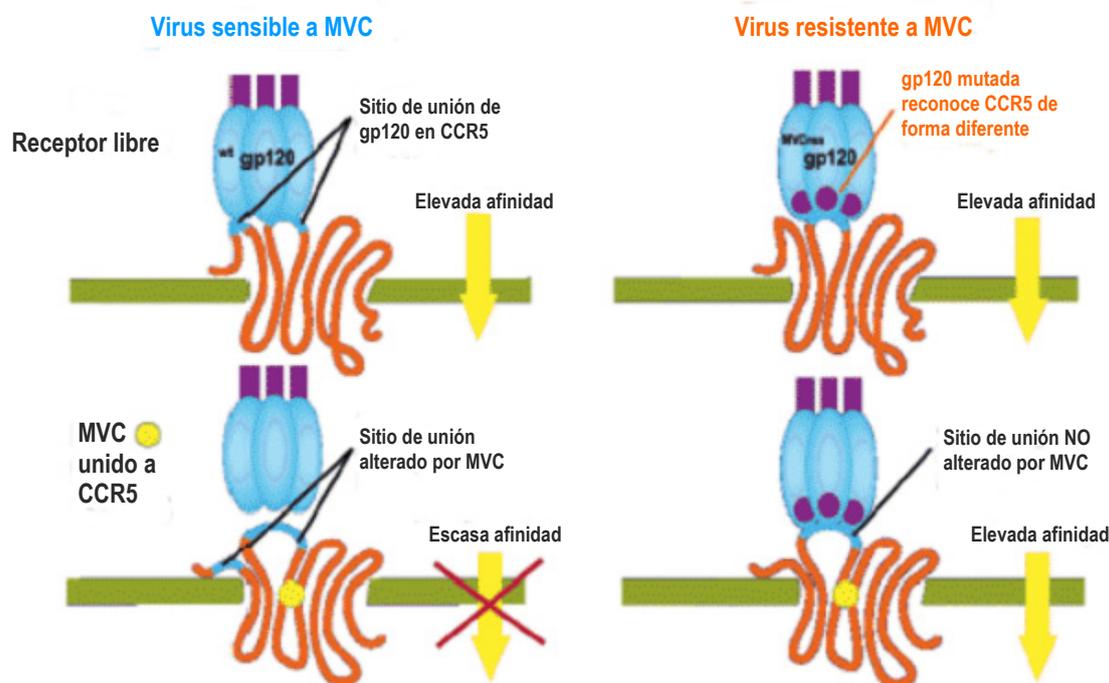


Figura 1.11. Reconocimiento de co-receptor CCR5 por virus resistentes a maraviroc (adaptado de www.natap.org).

- **Resistencia a inhibidores de la integrasa.**

Estudios *in vitro* han identificado hasta 41 mutaciones dentro del gen de la integrasa asociadas a resistencia. En los ensayos clínicos BENCHMRK se han encontrado dos patrones de resistencia principales (Cooper *et al.*, 2007; Steigbigel *et al.*, 2007):

- **Ruta de Q148H/K/R:** incluye la mutación primaria Q148H/K/R junto a las mutaciones secundarias L74M+E138A, E138K o G140S. La combinación más frecuente de esta ruta, y también la que produce una mayor pérdida de sensibilidad a raltegravir, es Q148H+G140S.

- **Ruta de N155H:** incluye la mutación primaria N155H junto a las mutaciones secundarias L74M, E92Q, T97A, E92Q+T97A, Y143H, G163K/R, V151I o D232N.

También hay evidencias de la existencia de un tercer patrón (Y143R/C + L74A/I, T97A, I203M, S230R).

1.8.2.5. Mecanismos de resistencia a nivel celular.

Otras posibles causas de resistencia a drogas antirretrovirales son las resistencias a nivel celular:

- **Resistencia a nivel de los mecanismos de fosforilación intracelular:** como los ITIAN son profármacos, una alteración en la afinidad de las enzimas que los fosforilan puede generar resistencia frente a éstos. Esta resistencia opera por un mecanismo según el cual disminuye la disponibilidad en enzimas celulares cuando aumenta la cantidad de sustratos. Esto explica que AZT y d4T no se puedan administrar juntos, ya que comparten como profármacos la misma vía de fosforilación y pueden competir por el enzima (Villalba *et al*, 1997). En estos casos no aparecen mutaciones de resistencia, puesto que el fármaco no llega a convertirse en su forma fosforilada activa.

- **Bombas de fármacos:** se ha definido el fenómeno de resistencia celular al detectarse la existencia de bombas de expulsión en la membrana celular de los linfocitos y otras células, que expulsan los fármacos antirretrovirales al medio extracelular. Así, se han descrito el MDRP-1 (glicoproteína-P) para los IPs y la MDRP-4 para los ITIANs (Schuetz *et al*, 1999; Huisman *et al.*, 2000). Sin embargo, se desconoce la relevancia clínica de estos hallazgos.

1.9. MÉTODOS DE LABORATORIO PARA DETECCIÓN DE RESISTENCIAS.

Los métodos disponibles en la actualidad para la detección de resistencias son de dos tipos: genotípicos y fenotípicos (García y Aguilera, 2005; Carlos *et al.*, 2006). Ambos se realizan generalmente a partir de muestras de plasma o suero, donde se encuentran las poblaciones de virus que contienen los cambios más recientes relacionados con el tratamiento antirretroviral; sin embargo, algunos ensayos genotípicos también admiten también otras muestras, como líquido cefalorraquídeo, tejido linfoide o células mononucleares de sangre periférica.

Se ha demostrado que existe una buena correlación entre ambos métodos, sobre todo con la familia de los ITINAN y menos con los ITIAN. La correlación es bastante más deficiente en pacientes multitratados y faltan datos

para los fármacos más recientes (TDF, APV, ATV) (Panel de Expertos de GESIDA-PNS, 2008).

1.9.1. Métodos genotípicos.

Los métodos genotípicos detectan mutaciones en el gen de la transcriptasa inversa y de la proteasa asociados con la aparición de resistencia. Sin embargo, el desarrollo de nuevas clases de fármacos antirretrovirales hace necesario también el análisis de otras regiones del genoma del VIH, como el gen *env*, para detectar resistencia a los inhibidores de la fusión y la entrada, y la región de *pol* que codifica la integrasa. La determinación de la resistencia por técnicas genotípicas ayuda a comprender los motivos del fracaso terapéutico y, en el caso de una determinada combinación terapéutica, predice mejor el fracaso que el éxito de la misma.

La mayoría de las técnicas actuales incluyen durante su realización la extracción del ARN viral y su posterior retrotranscripción en ADN. De este ADN se amplifica la región genómica que se desea investigar mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La **secuenciación del ADN** es el método genotípico de referencia para la determinación de la resistencia del VIH a los fármacos antirretrovirales. Se obtiene información completa de la secuencia de la región del genoma viral amplificada previamente por PCR, empleando *primers* o dideoxinucleótidos marcados de forma diferente para poder distinguirlos entre sí. Los productos de las reacciones de secuenciación se someten a electroforesis en gel y las bandas que se obtienen (cada una representando uno de los cuatro nucleótidos A, T, G o C) son leídas por el secuenciador. El resultado es una secuencia de nucleótidos que, una vez editada, se traduce en una secuencia de aminoácidos. Esta secuencia de aminoácidos se compara entonces con la de una cepa de referencia del VIH (**cepa consenso**) con el fin de determinar si existen mutaciones que confieran resistencia al tratamiento. Existen varios ensayos de secuenciación comercializados (Wilson, 2003): TRUGENE HIV-1 Genotyping Kit (Visible Genetics), ViroSeq HIV Genotyping System (PE Applied Biosystems), GeneSeq (Virologic), HIV-1 GenotypR PLUS (Specialty Laboratories), Virco GEN II

(Virco), HIV-1 Mutation Analysis (Focus Technologies), HIV ViroTYPE (Rheumatology Diagnostics Laboratory), GenoSure (LabCorp y Virco) y HIV-1 Genotype (Quest Diagnostics).

Otros métodos genotípicos para la detección de resistencias son: LiPA (*line probe assay*) (por ejemplo, Versant HIV-1), los microarrays o chips de hibridación de sondas múltiples (como Affimetrix®), la PCR selectiva, la hibridación diferencial (*point mutation assay*) o la determinación de secuencias de genoma individuales de una población viral mediante clonación del amplificado en una bacteria.

MÉTODOS GENOTÍPICOS
Ventajas
<ul style="list-style-type: none"> • Sensibilidad • Rapidez • Dificultad técnica media • Menor coste económico • Las mutaciones pueden preceder a las resistencias fenotípicas
Inconvenientes
<ul style="list-style-type: none"> • Algunos no detectan variantes minoritarias (< 20% de la población vírica) • Puede no existir correlación con el análisis fenotípico • Desconocimiento de mutaciones que ofrecen resistencia a diferentes inhibidores • Desconocimiento del efecto de las resistencias cruzadas • Respuesta variable de los pacientes a un fármaco • Marcador indirecto de la sensibilidad del VIH a los antirretrovirales
MÉTODOS FENOTÍPICOS
Ventajas
<ul style="list-style-type: none"> • Medida directa de la sensibilidad del VIH a los antirretrovirales • Se puede utilizar para cualquier tipo de fármaco • Información útil acerca de las resistencias cruzadas
Inconvenientes
<ul style="list-style-type: none"> • No detecta variantes minoritarias • Lento • Laborioso • Coste elevado • Medidas de contención biológica • Posible selección de variantes víricas mejor adaptadas al cultivo celular • Valores de IC50 que definen resistencias variables aún no establecidas claramente para todos los fármacos

Tabla 1.8. Ventajas e inconvenientes de los métodos genotípicos y fenotípicos.

1.9.2. Métodos fenotípicos.

Los métodos fenotípicos determinan la sensibilidad del virus a diferentes fármacos. La resistencia fenotípica se expresa en términos de concentración de fármaco necesaria para reducir la población viral en un 50% (IC₅₀) o 90% (IC₉₀). Este valor se compara con la concentración requerida para inhibir una cepa de referencia de laboratorio (o cepas aisladas en el mismo paciente antes del tratamiento antirretroviral) y se expresa como diferencia de veces entre ambas (*fold change* o *folds*). La interpretación de estos valores es diferente dependiendo del fármaco implicado.

Las técnicas fenotípicas más utilizadas en la actualidad para el estudio de resistencia a fármacos antirretrovirales son las técnicas de virus recombinantes y el fenotipo virtual.

- **Técnicas de virus recombinantes.**

Son métodos fenotípicos semiautomatizados basados en la utilización de virus recombinantes, que permiten determinar la sensibilidad del VIH a todos los antirretrovirales disponibles.

Antivirogram® (Virco, Bélgica) es un ensayo fenotípico de segunda generación, en el que una línea celular de linfocitos T CD4+ es cotransfectada con el amplificado PR-RT del plasma del paciente insertado en un plásmido delecionado en dicha región; la recombinación homóloga origina virus recombinantes cuya IC₅₀ se determina midiendo la viabilidad de las células transfectadas en presencia de antirretrovirales mediante técnicas de reducción de placas o ensayos de detección de muerte celular (Hertogs *et al.*, 1998).

Phenosense™ HIV (ViroLogic), a diferencia del Antivirogram, es un ensayo de un solo ciclo de replicación vírica, lo que reduce el tiempo para los resultados. Utiliza un proceso de ligación para introducir el fragmento amplificado de PR-RT mediante RT-PCR en el genoma de un virus vector. El gen *env* es sustituido por un gen productor de luciferasa. El virus vector es capaz de co-transfectar las células huésped y las partículas virales resultantes se utilizan para infectar células diana (**figura 1.12**), produciendo en un solo ciclo de replicación todas las proteínas virales excepto la envoltura, ya que en su lugar se expresa el gen de la luciferasa en cantidad proporcional al grado de

replicación vírica. Los antirretrovirales capaces de inhibir la replicación reducen la actividad luciferasa de forma dosis-dependiente, por lo que se puede cuantificar la IC50 de un fármaco comparando la actividad luciferasa en presencia y ausencia éste (Petropoulos *et al.*, 2000).

Phenoscript™ (Viralliance) es un método fenotípico que combina aspectos de los dos anteriores: un proceso de recombinación homóloga, como Antivirogram, y un sólo ciclo de replicación vírica, como Phenosense. Las células diana contienen el gen de la beta-galactosidasa, controlado por la región LTR del VIH: cuando se acumulan suficientes productos del gen *tat* en la célula infectada, se expresa el gen de la beta-galactosidasa y su producto se puede medir mediante colorimetría o fluorimetría (Race *et al.*, 1999). La amplificación por separado de la PR y la RT aumenta la sensibilidad del ensayo (500 copias/ml). Es una técnica rápida (unos 7 días), al basarse en un solo ciclo de replicación, y presenta una elevada correlación con otros ensayos fenotípicos

- **Fenotipo virtual y Virco®TYPE (Virco).**

El fenotipo virtual, disponible desde 2001, predice de forma cuantitativa la sensibilidad viral al comparar la secuencia genotípica de la RT y la PR del VIH obtenida del paciente con una base de datos que cuenta con información de unos 100.000 genotipos y fenotipos (Larder *et al.*, 2000a). Actualmente existen unos 30.000 emparejamientos genotipo-fenotipo de las mismas muestras clínicas y la base de datos se actualiza constantemente para asegurar la máxima fiabilidad posible en las predicciones. Las regiones de la PR y RT del virus aislado del paciente son secuenciadas y analizadas, identificándose todas las mutaciones que pueden afectar a la resistencia a cada fármaco; a continuación el *software* busca en la base de datos los genotipos de muestras previas que presentan el mismo patrón de mutaciones y los fenotipos de resistencia correspondientes para cada fármaco. El fenotipo virtual indica el cambio en la IC50 que se prevé para cada fármaco, basándose en los datos de cientos o miles de fenotipos reales con el mismo patrón de mutaciones (**figura 1.13**).

Los puntos de corte del fenotipo virtual se han ido modificando a lo largo del tiempo, con el fin de aumentar la correlación entre los resultados obtenidos *in vitro* y la respuesta virológica observada. Inicialmente se aplicaron **puntos de corte técnicos**, basados únicamente en la reproducibilidad intraensayo, que informaban en qué medida difería la IC50 de la cepa en estudio de la IC50 de una cepa de referencia. Más adelante se establecieron los **puntos de corte biológicos** de los distintos antirretrovirales, en los que la IC50 de la cepa en estudio se comparaba con la IC50 de cepas *wild-type*, estableciéndose el punto de corte en dos desviaciones estándar por encima de la media de éstas.

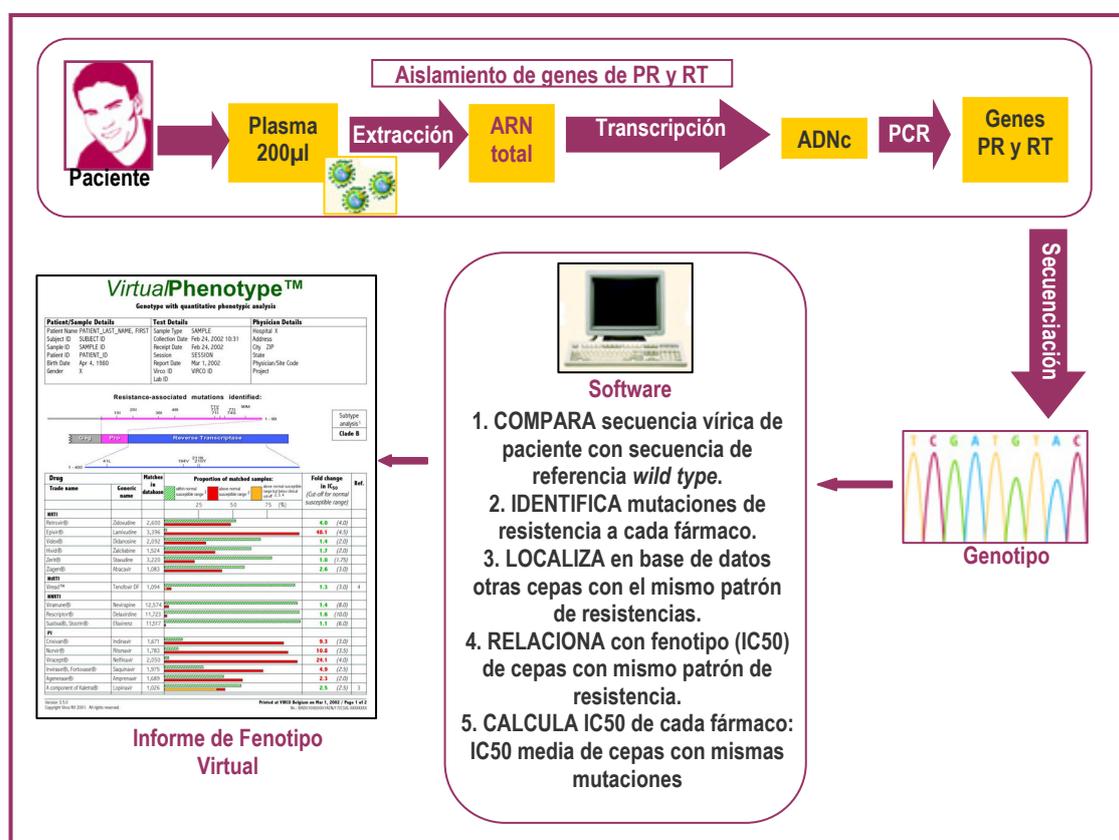


Figura 1.12: Esquema del proceso seguido en la realización del fenotipo virtual.

El sistema **virco[®]TYPE HIV-1**, disponible desde 2005, deriva del fenotipo virtual pero posee ya **puntos de corte clínicos**, basados en la correlación entre el *fold change* de la IC50 observada y la respuesta virológica en pacientes tratados, medida como variación de la carga viral, por lo que indica cómo afecta la resistencia viral a la respuesta virológica. Estos nuevos puntos de corte derivan de una base de datos que contiene tanto información clínica (historial terapéutico, tratamiento actual, CV y recuento de CD4 basales

y tras el tratamiento, etc.) como de resistencia de más de 17.000 pacientes. A diferencia de los puntos de corte técnicos y biológicos, la resistencia se interpreta de una forma continua, estableciéndose **dos puntos de corte clínicos** para cada fármaco: **CCO1** es el valor del FC asociado con un 20% de pérdida de respuesta virológica en comparación con una cepa *wild-type*, mientras que **CCO2** es el valor del FC asociado con un 80% de pérdida de respuesta. Los inhibidores de la proteasa potenciados con ritonavir y sin potenciar son considerados fármacos diferentes. En la actualidad se dispone de puntos de corte clínicos para la mayoría de los antirretrovirales, que son actualizados regularmente (la última actualización es de enero de 2008). Los puntos de corte biológicos se siguen aplicando a los fármacos más recientemente autorizados, mientras no existan datos clínicos suficientes para establecer puntos de corte clínicos (www.vicolab.com).

1.10. INDICACIONES CLINICAS DE LAS PRUEBAS DE RESISTENCIA.

El estudio de resistencias es útil tanto para los pacientes, que se benefician así de un uso más adecuado de los fármacos antirretrovirales, como para la comunidad, en términos de salud pública, ya que una mejor utilización de estos fármacos podría disminuir la aparición de resistencias potencialmente transmisibles. La utilidad de las pruebas de resistencia en el seguimiento del tratamiento antirretroviral fue avalada por los estudios GART, VIRADAPT y HAVANNA o ARGENTA; sin embargo, otros estudios (Kaiser, VIRA3001, Narval, CCTG575 y CERT) no han encontrado diferencias significativas en la repuesta virológica entre pacientes con y sin estudios de resistencias (Vandamme *et al.*, 2004).

Diversos grupos de expertos, tanto a nivel nacional como internacional, elaboran y actualizan regularmente recomendaciones para la utilización de los estudios de resistencia: el Panel Europeo de Resistencia a Fármacos Antirretrovirales (Vandamme *et al.*, 2004), la International AIDS Society (IAS) (Johnson *et al.*, 2007), el Department of Health and Human Services (DHHS) en Estados Unidos (DHHS Panel on Antiretroviral Guidelines for Adult and Adolescents, 2007) o el Grupo de Estudio de SIDA (GESIDA) de la Sociedad

Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC) junto con el Plan Nacional sobre SIDA (Panel de Expertos de GESIDA y PNS, 2008) (**tablas 1.9 y 1.10**). En la Comunidad Autónoma de Andalucía, las indicaciones de las pruebas de resistencia fueron reguladas por primera vez en el año 2001 por el Servicio Andaluz de Salud (S.A.S.); posteriormente estas indicaciones han sido modificadas (Resolución SC 618/2005, de 10 de agosto, de la Dirección Gerencia del S.A.S.) aplicando los actuales conocimientos sobre resistencia del VIH y la disponibilidad de nuevos fármacos antirretrovirales (**tabla 1.11**).

Tabla 1.9. Comparación de recomendaciones sobre la realización de estudios de resistencia (Zoloppa, 2006; Vandamme et al., 2004)			
Situación	DHHS	IAS	Panel Europeo
Infección aguda (<6 meses)	Recomendado	Recomendado	Recomendado
Paciente <i>naïve</i> con infección crónica (>2 años)	Recomendado	Si prevalencia de resistencia >5% o desconocida	Si se sospecha cepa resistente o prevalencia de resistencia >10%
Fracaso terapéutico	Recomendado	Recomendado	Recomendado
PEP (paciente fuente)	No recomendado	No recomendado	Recomendado
Embarazo	Recomendado	Si CV detectable	Si CV detectable
Infección pediátrica	-	No recomendado	Si la madre tiene CV detectable y se administra TAR al nacer

Tabla 1.10. Indicaciones de las pruebas genotípicas de resistencias a antirretrovirales* (Panel de expertos GESIDA/PNS, 2008)
<p>A. Pacientes sin tratamiento antirretroviral previo: Al inicio del seguimiento Infección aguda por el VIH Mujeres embarazadas Profilaxis postexposición (en caso fuente) Pacientes que van a iniciar TARV (si no se dispone de estudio previo)</p> <p>B. Pacientes pretratados: En todos los fracasos.</p>
<p>*Todos los pacientes deberían tener un estudio de resistencias genotípicas antes de iniciar el tratamiento antirretroviral. Este estudio se podría incluir en el cribado inicial.</p>

Tabla 1.11. Indicaciones de las pruebas genotípicas de resistencias a antirretrovirales* (Servicio Andaluz de Salud, 2008)

<p>A. Pacientes sin tratamiento antirretroviral previo: En pacientes <i>naïve</i> que vayan a recibir tratamiento antirretroviral Infección primaria o pacientes con diagnóstico reciente de infección por VIH Profilaxis postexposición ocupacional Mujeres embarazadas</p> <p>B. Pacientes en tratamiento antirretroviral con fracaso virológico.</p>

Los distintos grupos de expertos coinciden en recomendar la realización de tests de resistencia en los **pacientes *naïve* con infección aguda** (6 a 12 meses), pues permiten identificar las resistencias primarias en estos pacientes. Las resistencias primarias se deben a la transmisión de un virus con mutaciones en el momento del contagio, a partir de un sujeto expuesto a tratamiento antirretroviral (resistencia primaria) (Hecht *et al.*, 1998), o bien, a la presencia de polimorfismos que, de manera natural, reducen la afinidad del fármaco por su enzima (resistencias naturales). La transmisión de cepas de VIH resistentes varía dependiendo de las características de los pacientes, así como de la zona geográfica: 16-22% en EEUU (Weinstock *et al.*, 2004; Viani *et al.*, 2006) frente a un 9-10% en Europa (de Mendoza *et al.*, 2005; Oette *et al.*, 2006; Sánchez-Oñoro *et al.*, 2007). La detección de resistencias primarias permite seleccionar fármacos activos frente a la cepa aislada, evitando un tratamiento subóptimo que favorecería la acumulación de nuevas mutaciones de resistencia.

Hasta hace poco se consideraba que los tests de resistencias en **pacientes *naïve* con infección crónica** podían tener menos utilidad, ya que a lo largo del tiempo los virus con mutaciones van siendo reemplazados por virus *wild-type*, con mayor capacidad replicativa, y las pruebas de resistencia habituales no son capaces de detectar mutaciones en poblaciones virales minoritarias (<20%). Los trabajos de Weinstein *et al.* (2001) y Holtzer y Youle (2004) calcularon que los tests de resistencia son coste-efectivos a partir de una prevalencia de resistencias primarias del 10%. Posteriormente, otros estudios (Hecht *et al.*, 2005; Sax *et al.*, 2005; Novak *et al.*, 2005) han demostrado el beneficio clínico y un balance coste-efectividad favorable de los tests de resistencia aunque la prevalencia de resistencias primarias sea inferior (1-5%).

La realización del test de resistencia para orientar la **profilaxis post-exposición (PPE)** también es recomendada por el panel español y el europeo. Sin embargo, el tratamiento antirretroviral debe administrarse de forma empírica inmediatamente tras la exposición, a ser posible durante las primeras 2 horas (como máximo, dentro de las primeras 48 horas). El estudio de resistencias al caso fuente modificará la pauta inicialmente instaurada en función de su resultado. También se debe investigar la medicación que recibe la fuente para no incluir en la profilaxis esos fármacos ni otros con los que pudieran presentar resistencia cruzada.

El riesgo de **transmisión vertical** del VIH se asocia con el nivel de CV plasmática en la madre (Mofenson *et al.*, 1999). El objetivo del tratamiento antirretroviral en la mujer embarazada ha de ser alcanzar la máxima supresión de la CV, tanto para el tratamiento de la infección en la madre como para prevenir su transmisión perinatal. Todos los grupos de expertos coinciden en que las pruebas de resistencia a fármacos antirretrovirales, tanto para la selección del tratamiento inicial como para la orientación de un cambio terapéutico, permiten seleccionar la mejor opción terapéutica.

La elección del tratamiento más adecuado en el **paciente pediátrico** es incluso más importante que en adultos, puesto que existen menos opciones terapéuticas. El grupo europeo recomienda realizar el test de resistencias en niños con carga viral detectable antes del inicio o cambio de tratamiento.

Los estudios de resistencias han demostrado ser útiles en el cambio de tratamiento tras **un fracaso terapéutico (tratamiento de segunda línea) o más (tratamiento de rescate)**, ya que optimizan el nuevo tratamiento, aumentan su eficacia y mejoran el pronóstico de los pacientes tratados (Palella *et al.*, 2006). Deben realizarse sin suspender el tratamiento para evitar la reversión de mutaciones ante la falta de presión farmacológica. Si se detectan cepas con mutaciones de resistencia a unos fármacos determinados, se aconseja su retirada; sin embargo, determinadas interacciones entre mutaciones pueden restaurar parcialmente la susceptibilidad a algunos fármacos (Cabrera y Clotet, 2006).

La detección de cepas *wild-type* en pacientes que no responden al tratamiento puede deberse a factores como la falta de adherencia, interacciones farmacológicas, trastornos de la absorción del medicamento o niveles subóptimos de los fármacos antirretrovirales. También puede deberse a la existencia de variantes minoritarias (<20%) resistentes en los reservorios, que no son detectadas por las técnicas convencionales. Para considerar que un fármaco mantiene actividad antirretroviral debe tenerse en cuenta el estudio de resistencia actual, los realizados previamente y la historia farmacológica completa, que nos puede informar de posibles resistencias favorecidas por terapias previas y no detectadas por las pruebas de resistencia.

La existencia de resistencia predice que un fármaco determinado sea inefectivo si se aplica. Esto está claro para una resistencia de alto grado asociada a mutaciones de resistencia primarias, ante las cuales evitaremos el empleo de ese fármaco; sin embargo, es más difícil tomar decisiones terapéuticas ante niveles intermedios de resistencia.

1.11. INTERPRETACION DE GENOTIPO DE RESISTENCIA.

Los resultados del genotipo consisten en una extensa **lista de mutaciones** detectadas en la cepa de VIH del paciente estudiado en comparación con una cepa de referencia, que deben ser interpretadas por expertos antes de aplicarse en la práctica clínica. Factores como la posición y el tipo de sustitución en los aminoácidos, la interacción entre mutaciones o el uso simultáneo de varios fármacos hacen que las reglas desarrolladas para interpretar la forma en que el patrón de mutaciones influye en la actividad de los distintos fármacos antirretrovirales sean extremadamente complejas. Por esta razón se ha pasado de la mera interpretación de una lista de mutaciones a la complejidad que supone **relacionar el genotipo con la respuesta virológica**, estudiando el impacto de un conjunto de mutaciones sobre la caída de la carga viral tras instaurar un nuevo régimen terapéutico (Brun-Vezinet *et al.*, 2004). Es evidente que las mejoras en la interpretación del genotipo de resistencia influyen, entre otros factores, en la eficacia de la terapia antirretroviral.

La tendencia actual es la elaboración de **reglas de interpretación** a partir de series de pacientes en los que se incluye el fármaco a estudiar en el regimen terapéutico, relacionando las mutaciones basales con la eficacia virológica en términos de descenso de carga viral a los tres o seis meses. En este sentido se han desarrollado reglas de interpretación para los distintos antirretrovirales disponibles, como abacavir (Brun-Vézinet *et al.*, 2003), didanosina (Marcelin *et al.*, 2004), tenofovir (Masquelier *et al.*, 2004), lopinavir (Marcelin *et al.*, 2005), amprenavir (Marcelin *et al.*, 2003**b**), atazanavir (Yerly *et al.*, 2004; Colonna *et al.*, 2003) o tipranavir (Marcelin *et al.*, 2007). Nuestro grupo de trabajo ya ha realizado con éxito la elaboración de reglas y la validación clínica de regímenes que incuyen TDF, ddl (Alvarez *et al.*, 2004; Alvarez *et al.*, 2005) y Lopinavir/ritonavir (Martínez, 2004).

Una vez generadas las reglas de interpretación de la resistencia a cada fármaco, además de ser **validadas** individualmente en poblaciones similares y/o mediante *bootstrapping*, deben ser aplicadas conjuntamente en forma de **algoritmo de interpretación**, el cuál también habrá de ser posteriormente sometido a validación clínica mediante la metodología estadística adecuada (De Luca *et al.*, 2003; Torti *et al.*, 2003).

En la **tabla 1.12** se muestran las principales características de los sistemas empleados en la actualidad para la interpretación del genotipo. La mayoría consiste en algoritmos desarrollados por expertos a partir de bases de datos que relacionan genotipo con respuesta virológica; algunos de ellos han sido posteriormente validados clínicamente en función de su capacidad para predecir respuesta o fallo al tratamiento mediante estudios retrospectivos y/o prospectivos. Sólo Geno2pheno y *VirtualPhenotype* se basan en la predicción de la respuesta al tratamiento en función del fenotipo y utilizan bases de datos de genotipos con sus correspondientes fenotipos.

Tabla 1.12. PRINCIPALES ALGORITMOS PARA LA INTERPRETACIÓN DEL GENOTIPO DE RESISTENCIA.

Sistema de interpretación	Tipo	Validación clínica	Última actualización	Acceso
Stanford University HIV Drug Resistance Database	Sistema experto basado en reglas	Si, retrospectiva	Septiembre 2007	http://hivdb.stanford.edu/pages/algs/HIVdb.html
International AIDS Society-USA	Tablas de mutaciones de resistencia clínicamente relevantes	No	Septiembre 2007	http://www.iasusa.org/resistance_mutations/index.html
Retrogram™	Sistema experto basado en reglas	Si, retrospectiva (v1.6) y prospectiva (v1.0)	Junio 2003	http://www.openclinical.com/dm_retrogram.html
AntiRetroScan, Universidad de Siena	Sistema experto basado en reglas	No	Febrero 2007	https://www.hivarca.net/hiv_resistance.asp
Rega Institute System v7.1.1	Sistema experto basado en reglas	Si, retrospectiva	Julio 2007	http://www.rega.kuleuven.be/cev/fileadmin/algorithms/Rega_HIV1_Rules_v7.1.1.pdf
Centre Hospitalier du Luxembourg (CHL)	Sistema experto basado en reglas	Si, retrospectiva	Julio 2005	http://www.ablsa.com/
Grupo de Aconselhamento Virologico	Sistema experto basado en reglas	Si	Enero 2006	http://www.ablsa.com/
Detroit Medical Center	Sistema experto basado en reglas	Si	Octubre 2004	http://www.ablsa.com/
Agence Nationale de Recherches sur le SIDA (ANRS) v.16	Sistema experto basado en reglas	Si, retrospectiva	Octubre 2007	http://www.hivfrenchresistance.org/
Guidelines v.12.0, TruGene™, VGI/Siemens	Sistema experto basado en reglas	Si, retrospectiva	Julio 2007	http://diagnostics.siemens.com
ViroSeq™ HIV-1 Genotyping System, v.2.8, Abbott	Sistema experto basado en reglas	No	2006	http://www.abbottmolecular.com/
GeneSeq™ HIV v3.0, Monogram Bioscience	Expertos y software propio	No	Febrero 2004	http://www.monogramhiv.com/
Virco®Type HIV-1, v.4.2.01	Base de datos (>32000 G/F)	Si, retrospectiva y prospectiva	Enero 2008	http://www.vicolab.com
Geno2pheno v.3.0	Base datos (>800 G/F)	Si, retrospectiva	Julio 2005	http://www.genafor.org

1.11.1. Metodología para el desarrollo de nuevas reglas de interpretación del genotipo.

Hasta hace pocos años las reglas genotípicas sólo se desarrollaban a partir de ensayos fenotípicos, para los que únicamente existía un punto de corte técnico, basado en la reproducibilidad intraensayo, no relacionado con la respuesta virológica. Aunque recientemente se han establecido puntos de corte biológicos (basados en el rango de susceptibilidad de la cepa de referencia) y clínicos (aún no disponibles para todos los fármacos), todavía la relación entre nivel de resistencia fenotípica y respuesta virológica no está bien determinada. Esto, unido al hecho de que las técnicas fenotípicas sean más caras y lentas, ha motivado el desarrollo de reglas que relacionan genotipo con respuesta virológica. Este proceso consta de dos etapas (Brun-Vézinet *et al.*, 2004):

- Creación de nuevas reglas, que relacionan número y tipo de mutaciones con resistencia o respuesta virológica a un fármaco determinado.
- Validación de dichas reglas sobre una población diferente.

Estas reglas han de estar sometidas a una mejora continua, por lo que en la práctica ambos procesos se combinan mediante sucesivos ciclos de **identificación** de las mutaciones con influencia sobre un fármaco y **validación** de dichas mutaciones sobre una nueva población.

Existen distintos aspectos a tener en cuenta en cuanto a la población a partir de la cual se van a extraer las reglas, que influirán en la metodología a seguir y en las cuestiones a las que darán respuesta:

- **Tipos de ensayos:**

- **Ensayos *add-in*:** consisten en añadir un fármaco nuevo a un tratamiento previo, que no estaba siendo efectivo, para medir la respuesta virológica (Flandre *et al.*, 2005). Permiten una medida más directa del efecto del fármaco añadido pero sólo se pueden llevar a cabo durante un periodo corto (2-4 semanas). Son aconsejables para fármacos con baja barrera genética, que generan resistencias rápidamente.

- **Cambio completo de tratamiento o *switch trials*:** son los ensayos más habituales. Permiten medir la respuesta a más largo plazo (24-48 semanas) pero el efecto del fármaco estudiado se enmascara por la actividad

del resto, especialmente si se introduce además otro fármaco de una nueva clase o si varios fármacos son de la misma clase. Es preferible que el fármaco a estudiar sea el único de su clase.

- **Retirada de un fármaco** de un régimen en fallo terapéutico: la medida del consiguiente incremento de la carga viral a corto plazo (1-2 semanas) permite valorar el efecto de las mutaciones existentes sobre dicho fármaco, sin que sea enmascarado por otros factores. Estos ensayos son poco habituales, ya que pueden generar resistencias por la insuficiente actividad del resto de los fármacos.

▪ **Tipos de respuestas.**

- **Variación de la CV:** habitualmente se utiliza la diferencia entre el \log_{10} CV entre el comienzo del tratamiento y el final del período de seguimiento. Se trata de una variable continua, utilizada cuando no se espera que la carga viral disminuya por debajo del límite de detección de la técnica. Por ejemplo, en pacientes previamente tratados con muchos fármacos (Brun-Vézinet *et al.*, 2003), estudios a corto plazo (Flandre *et al.*, 2007) o pacientes pediátricos (Green *et al.*, 2006).

- **Respuesta / No respuesta:** las diferentes definiciones de la respuesta pueden influir en la capacidad de predicción de una regla de interpretación. Generalmente la respuesta se ha definido como la **supresión de la CV**, es decir, el descenso de la CV por debajo del límite de sensibilidad de la técnica o CV indetectable (Gianotti *et al.*, 2006; Capdepon *et al.*, 2006); sin embargo, al tratarse de una variable discreta, cuando se aplica a pacientes con varios tratamientos previos se ve muy influida por el valor de la CV a nivel basal, proporcionando una información menos completa. En otras ocasiones se ha definido la respuesta como un **descenso de CV $\geq 0,5$ o 1 \log_{10}** en un tiempo determinado (Marcelin *et al.*, 2006a): en este caso el problema radica en cómo interpretar la respuesta en los pacientes con bajos niveles de CV basal que alcanzan una CV inferior al límite de sensibilidad de la técnica, sin que esto suponga una reducción de la CV inferior a 0,5 o 1 \log_{10} . Otra posibilidad es la clasificación en **tres categorías:** *respuesta* (CV indetectable), *respuesta parcial* (descenso significativo de la CV, por ejemplo $\geq 0,5$ log) o *no respuesta* (descenso de la CV $\leq 0,5$ log CV).

- **Duración del estudio.**

La elección del punto final aplicado a la respuesta virológica es un factor importante en el desarrollo de reglas de interpretación. Así, mientras la respuesta **a corto plazo** (2-8 semanas) se relaciona de manera más directa con la actividad del fármaco, la respuesta **a largo plazo** (24-48 semanas) posee una mayor relevancia clínica, pero también se ve más afectada por factores externos, como son la pérdida de adherencia, la suspensión temporal o los cambios en el tratamiento (De Luca y Perno, 2003). En un estudio de De Luca *et al.* (2004a) el *endpoint* elegido fue el tiempo necesario para conseguir una CV \leq 500 copias/ml, aunque el límite de sensibilidad de la técnica fuera de 50 copias/ml.

- **Características de la población y tamaño de muestra.**

La ausencia o escasa presencia de determinadas mutaciones o fármacos en la base de datos utilizada puede llevar a infravalorar su importancia clínica. En general, una cohorte de 200-300 pacientes permite establecer reglas válidas de interpretación, al menos a nivel preliminar, ya que en una muestra de este tamaño las mutaciones más relevantes deberían estar suficientemente representadas. Para valorar mutaciones o combinaciones de mutaciones menos prevalentes es necesario un tamaño de muestra mucho mayor (Brun-Vézinet *et al.*, 2004).

- **Adherencia al tratamiento.**

En pacientes previamente tratados con múltiples fármacos en los que la cepa aislada carece de mutaciones de resistencia (cepa tipo o *wild type*) debemos sospechar una escasa o nula adherencia, que podría ser fuente de resultados anómalos (Descamps *et al.*, 2001). En este sentido, la adherencia y, si es posible, la concentración plasmática de fármacos deberían ser recogidas en la medida de lo posible en las bases de datos.

- **Experiencia previa con fármacos.**

Los estudios sobre pacientes con un amplio rango de fármacos previos proporcionan más información que aquellos con pacientes de características más similares. Igual ocurre con los estudios en los que la población muestra un amplio rango de respuestas, comparado con aquellos en los que la mayoría de los pacientes responden (o fallan) al tratamiento (Brun-Vézinet *et al.*, 2004).

1.11.2. Discrepancias entre distintos sistemas de interpretación.

En los últimos años se han realizado diversos trabajos que ponen de relevancia la existencia de discrepancias entre distintos algoritmos de interpretación (Puchhammer *et al.*, 2002; García F *et al.*, 2003; Nogales *et al.*, 2005; Zoloppa *et al.*, 2005; Bryant *et al.*, 2007).

En el grupo de **ITINANs** prácticamente no se han descrito discrepancias entre los distintos sistemas de interpretación, ya que las mutaciones seleccionadas por ellos suponen una resistencia inmediata; por el contrario, la pérdida de actividad de los IPs e ITIANs va aumentando progresivamente, conforme se van acumulando mutaciones de resistencia. Por el contrario, los resultados más dispares han sido descritos en **ITIANs**, especialmente ddl, d4T, ddC y ABC cuando el genotipo se interpreta en función de datos fenotípicos, probablemente por el empleo de puntos de corte biológicos no validados clínicamente y por defectos en los sistemas celulares empleados en los ensayos fenotípicos recombinantes para activar los dideoxynucleótidos mediante trifosforilación. En cuanto a los **IPs**, existen bastantes discordancias en la interpretación del genotipo, ya que la resistencia está asociada a patrones mutacionales complejos que a su vez pueden variar según se utilice o no ritonavir conjuntamente (como potenciador de su actividad) (De Luca y Perno, 2003).

Otra razón que explica las discrepancias entre los distintos sistemas es el **subtipo** del virus, puesto que la cepa utilizada como referencia en los sistemas comercializados actualmente pertenece al subtipo B. Esto no afecta a países con baja prevalencia de subtipos no-B, como Estados Unidos; sin embargo, en Europa Occidental comienza a ser un problema, debido al reciente aumento de estos subtipos, que alcanzan el 50% en Portugal y determinadas áreas de Francia y Bélgica (De Luca y Perno, 2003). En España se ha descrito una prevalencia del 7,6% de subtipos no-B entre todos los seroconvertidores (N=198) identificados entre 1997 y 2004 (De Mendoza *et al.*, 2005). El problema es mayor en el Este de Europa, Brasil o Tailandia, que presentan una gran prevalencia de subtipos no-B, pero especialmente en el Sudeste Asiático y Africa Subsahariana, donde prácticamente no existe el

subtipo B. Las mayores discrepancias en la interpretación del genotipo han sido descritas en los subtipos D-K (De Luca y Perno, 2003).

1.11.3. Validación clínica.

Ante la evidencia de las discrepancias descritas entre los distintos algoritmos de interpretación, en los últimos años se han llevado a cabo diversos estudios para la validación clínica de las reglas de interpretación ya existentes o en desarrollo. La validación clínica tiene por objeto medir la capacidad de una regla de interpretación para predecir la respuesta clínica. Existen dos procedimientos para validar clínicamente unas reglas (Brun-Vézinet *et al.*, 2004):

- **Validación externa.**

Las nuevas reglas se aplican a una población distinta, determinando si el tratamiento prescrito en función de la interpretación de la resistencia se correlaciona con respuesta virológica en el paciente.

- **Validación interna.**

Se lleva a cabo cuando no se dispone de una nueva población sobre la que validar las reglas. Existen dos procedimientos:

- **Validación cruzada:** los datos se dividen en dos conjuntos de desarrollo (entrenamiento y verificación) y un conjunto de validación, por lo que requiere que el tamaño de muestra sea lo suficientemente grande.
- Cuando el tamaño de muestra no es lo suficientemente grande se aplican las llamadas **técnicas de remuestreo**, también denominadas técnicas de computación intensiva, pues requieren una gran potencia computacional. Entre éstas, la más desarrollada a nivel teórico y aplicado es el **bootstrap**, basado en la extracción muestras de la base de datos repetidamente y con reemplazamiento. De esta manera se crean múltiples conjuntos de entrenamiento (al menos 1000) del mismo tamaño que la base de datos original y se estima la variabilidad de cada uno, permitiendo valorar la estabilidad y replicabilidad de las reglas desarrolladas.

1.11.4. *Fuzzy rules*.

Las *fuzzy rules* (reglas borrosas) son una aproximación matemática utilizada para representar el conocimiento que se ve afectado por la incertidumbre. Se basan en el concepto de que un elemento no pertenece a un conjunto en su totalidad sino que, por el contrario, su pertenencia al conjunto podría graduarse y expresarse mediante un valor entre 0 y 1.

Diversas ramas científicas han aplicado, incluidas la biología y la genética, han aplicado las *fuzzy rules*. En relación con la interpretación del genotipo de resistencia del HIV-1 frente a fármacos antirretrovirales, constituyen una herramienta que permite medir, entre otros parámetros, su grado de resistencia frente a éstos o el éxito que cabe esperar con una determinada terapia. La revisión de reglas ya existentes, comparándolas con los datos de respuesta al tratamiento, conduce a modificaciones en la interpretación de la resistencia con una mejor y más independiente capacidad de predicción de la respuesta virológica (De Luca *et al.*, 2004b).

En líneas generales el procedimiento a seguir consta de los siguientes pasos:

- 1) Selección de una **cohorte de aprendizaje (*training set*)** y una **cohorte de validación**. Los pacientes han de cumplir determinados requisitos para su inclusión en una u otra: fallo virológico tras un tratamiento adecuado, adherencia, con genotipo de resistencias realizado, etc...
- 2) Definición de las **reglas de interpretación**. Se escoge un algoritmo de interpretación ya existente para su evaluación y actualización.
- 3) Transformación del algoritmo en un conjunto de ***fuzzy rules*** para cada fármaco, completando con los operadores necesarios (*fzand*, *fzor*, *fznot*). Estas reglas, aplicadas al genotipo del paciente, miden el nivel de resistencia frente a cada fármaco, con un valor de 0 a 1. A partir de éste se calcula la actividad esperada:

Actividad esperada = 1- Resistencia

La respuesta virológica observada se expresa mediante una fórmula, deducida a partir del área bajo la curva (AUC) que representa la CV basal frente al tiempo. La actividad esperada y la respuesta virológica se

aplican para revisar y actualizar las reglas, como se detallará más adelante.

- 4) Procedimiento de **aprendizaje y actualización de las reglas**. Para que una regla se pueda valorar debe haber sido aplicada por el sistema un número mínimo de casos. Los valores de actividad esperada y de respuesta virológica obtenidos para cada paciente y fármaco se introducen en una **tabla de 4 entradas (figura 1.14)**: las reglas que predicen correctamente la respuesta no se modifican (A y B) pero aquellas cuyas predicciones son incorrectas (C y D) se penalizan (disminuyendo su peso) o se eliminan, según la proporción de errores.

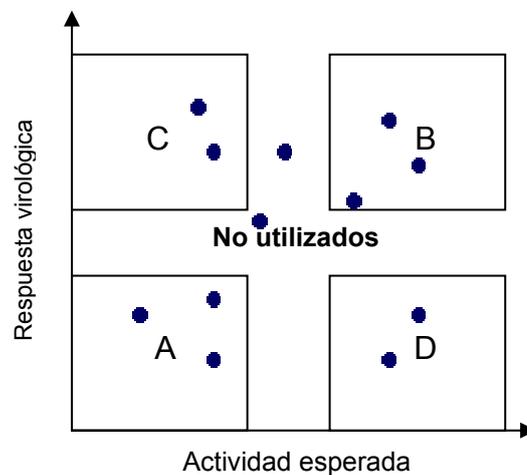


Figura 1.14: Tabla de cuatro entradas.

- 5) **Validación del algoritmo resultante**. Las *fuzzy rules* resultantes deben ser validadas en un segundo grupo de pacientes completamente diferente del anterior, analizando la correlación entre la actividad esperada del tratamiento de rescate (interpretada según las reglas modificadas) y la respuesta observada en el punto final elegido. Esta correlación se realiza mediante diversos métodos estadísticos, como regresión lineal simple y múltiple y regresión logística.

Entre las limitaciones presentes a la hora de llevar a cabo este procedimiento podemos citar: el tamaño de las cohortes de aprendizaje y validación, las diferencias en las características de ambas cohortes, la adherencia o los fármacos previamente recibidos.

1.11.5. Redes neuronales (*Neural networks*).

Las redes neuronales artificiales (RN) son sistemas de cálculo que se asemejan a las redes neuronales biológicas al utilizar nodos (neuronas) interconectados. Estos nodos reciben la información, realizan operaciones sobre los datos y transmiten sus resultados a otros nodos. Las RN se definen como sistemas no lineales, flexibles y con gran capacidad de generalización. Estas propiedades han hecho que se difundieran en todos los campos científicos y que se demostrara su equivalencia o superioridad sobre algunas técnicas estadísticas (Trujillano *et al.*, 2003).

El interés de la aplicación de las RN en Medicina durante los últimos 10 años no ha hecho más que aumentar, como refleja el número progresivamente creciente de publicaciones que incluyen esta metodología. Las áreas que han ido ocupando son, entre otras: reconocimiento de imágenes, análisis de ondas, procedimientos de farmacología, epidemiología, predicción de resultados y procesos diagnósticos (Baxt *et al.*, 1995; Armoni *et al.*, 1998; Dayhoff *et al.*, 2001; Sargent *et al.*, 2001; Trujillano *et al.*, 2004).

Entre las aplicaciones más importantes de las RN al estudio de la resistencia del VIH, podemos citar las siguientes:

- Predicción de la resistencia o actividad disminuida de los fármacos antirretrovirales. En este caso las RN son especialmente útiles en el caso de fármacos con patrones de resistencia complejos, como lopinavir, indinavir, saquinavir, ritonavir, nelfinavir, amprenavir o estavudina (Larder *et al.*, 2000b; Romano *et al.*, 2002).

- Predicción de la respuesta virológica frente al tratamiento instaurado, en función del genotipo. Las RN consideran simultáneamente todas las mutaciones de la base de datos, sin necesidad de una selección previa; identifican aquellas con mayor influencia en la respuesta y construyen modelos complejos que relacionan el genotipo con la respuesta virológica. La predicción de la respuesta se calcula como la media de las distintas respuestas virológicas observadas en todos los pacientes con cada uno de los distintos patrones de mutaciones presentes (Wang *et al.*, 2003a).

La validación cruzada forma parte integrante de las RN: de la base de datos se separa un conjunto de entrenamiento, utilizado para que las RN aprendan los patrones complejos de relaciones existentes entre las variables predictoras y de resultado; de esta manera podrán enfrentarse a nuevos datos a los que dar respuesta. Por este motivo, aunque las RN se han aplicado con éxito a bases de datos con un número de casos bastante limitado, es de esperar que al aumentar el tamaño de las bases de datos de entrenamiento se consiga incrementar también la exactitud de los resultados obtenidos (Wang *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2003b).

1.11.6. Cohortes de resistencias.

Para llevar a cabo el proceso de validación clínica de los algoritmos generados es imprescindible disponer de bases de datos que combinen datos de laboratorio con datos clínicos. Existen además otros muchos puntos de interés que justifican la creación de cohortes de pacientes VIH con genotipo de resistencias, como son:

- Epidemiología de las resistencias primarias y adquiridas (prevalencia, incidencia, evolución).
- Epidemiología de los subtipos de VIH.
- Vigilancia epidemiológica de la resistencia a las distintas familias de antivirales y de las multirresistencias.
- Valoración de la utilidad de los ensayos de resistencia en los distintos grupos de población de nuestro medio.
- Establecimiento de tratamientos de rescate en pacientes con determinadas mutaciones o patrones de mutaciones de difícil interpretación.
- Vigilancia de fracasos precoces relacionados con determinadas pautas de tratamiento.

Existen antecedentes de iniciativas a nivel europeo e internacional para el desarrollo de cohortes de resistencia que sirven de base para la investigación en interpretación del genotipo de resistencia. Como ejemplos podemos citar las siguientes:

▪ **AIDS Clinical Trials Group (ACTG).**

El ACTG es la mayor organización mundial para la realización de ensayos clínicos, fundada por el Department of Health and Human Services (DHHS) de Estados Unidos con el fin de establecer protocolos de tratamiento frente a la infección por el VIH y las infecciones oportunistas asociadas. Uno de los trabajos realizados en este campo (Costagliola *et al.*, 2005) se llevó a cabo mediante la creación de una gran base de datos a partir de 9 fuentes diferentes, con el objeto de investigar la relación entre genotipo de resistencia frente a didanosina y abacavir (interpretado mediante 4 algoritmos) y respuesta virológica. Se aportaron 583 pacientes para abacavir y 400 para didanosina. Se desarrolló un plan para el análisis de los datos, que incluía: criterios de inclusión/exclusión, puntos finales, diferencias entre los distintos sistemas de interpretación y el procedimiento a seguir en el caso de que el tamaño de la base de datos fuera suficientemente grande como para dividirla en un conjunto de entrenamiento y un conjunto de prueba. Los resultados reflejan la importancia de los trabajos de colaboración (permiten lograr un mayor tamaño de muestra y mejorar así la metodología estadística) y de la validación externa de los sistemas de interpretación.

▪ **HIV Resistance Response Database Initiative (RDI).**

La creación de esta base de datos proviene de una iniciativa de colaboración internacional, cuyo objetivo es recoger información de pacientes de centros de investigación de Estados Unidos, Canadá, Australia, varios países europeos (entre ellos España) y Japón, y desarrollar herramientas informáticas (*recursive partitioning*, redes neuronales artificiales...) que mejoren la predicción de la respuesta virológica a partir del genotipo. En la base de datos se registra la información relativa al genotipo, tratamiento y respuesta a todos los cambios de tratamiento junto a otras variables de interés. Actualmente esta base de datos cuenta con información de 30.000 pacientes (Disponible en: <http://www.hivr.org/>. Último acceso: Febrero 2008)

▪ **Forum for Collaborative HIV Research (www.hivforum.org).**

Es otra iniciativa de colaboración entre diferentes centros, que aprovecha las diversas cohortes ya existentes. Las cohortes incluidas tienen que cumplimentar un cuestionario en un formato estándar. Uno de los objetivos

perseguidos es lograr la estandarización y la relevancia clínica de las pruebas de resistencia del VIH, concretamente:

- Identificar bases de datos clínicas útiles para la desarrollar algoritmos genotípicos y establecer puntos de corte fenotípicos.
- Desarrollar una metodología para la derivación de reglas de interpretación de la resistencia a cada fármaco.
- Revisar aspectos actuales de la estandarización y el control de calidad del laboratorio y la interpretación del genotipo.
- Establecer recomendaciones para la evaluación continua y a largo plazo de la definición de resistencia desde un punto de vista clínico.

▪ **Antiretroviral Resistance Cohort Analysis (ARCA).**

En esta base de datos, creada con el objetivo de desarrollar modelos de predicción de la respuesta al tratamiento antirretroviral (*Genotype-Response Project*), la información procede de diferentes entidades de Italia, sobre todo universidades y servicios públicos de salud. Cada genotipo es un “caso” de la base de datos, que además contiene información clínico-epidemiológica sobre los pacientes (incluidos los tratamientos administrados y los niveles de CV y CD4). En la actualización de febrero de 2008 esta base de datos contaba con más de 18.000 genotipos de 11.171 pacientes. Puede accederse de forma libre a través de su página web (http://www.hivarca.net/hiv_resistance.asp) para consultar estadísticas descriptivas o aplicar un algoritmo genotípico de interpretación (AntiRetroScan), desarrollado y actualizado regularmente por la Universidad de Siena.

▪ **Cohorte RIS (Red de Investigación en SIDA, España).**

La RIS es una estructura coordinada y financiada por el Ministerio de Sanidad y Consumo para la investigación del VIH/SIDA. Entre sus proyectos se encuentra la creación de cohorte numerosa de pacientes VIH+, que permita valorar la eficacia de nuevos protocolos terapéuticos y llevar a cabo estudios de resistencias a fármacos antirretrovirales. Para ello la información se almacena en un Centro de Datos, integrado por epidemiólogos, estadísticos e informáticos. Recientemente se ha publicado la metodología y los resultados basales de esta cohorte (Caro-Murillo *et al.*, 2007) (Disponible en: www.retics-ris.net).

▪ **Cohorte de Resistencias de Andalucía Oriental (CORAO).**

Esta cohorte, coordinada desde nuestro grupo de trabajo, pretende centralizar una completa base de datos, con información clínica y genotípica procedente de un gran número de unidades clínicas y laboratorios implicados en el tratamiento y monitorización de pacientes VIH+, además de proporcionar soporte técnico y estadístico para el desarrollo de modelos matemáticos de predicción de la respuesta al tratamiento (Peña *et al.*, 2006; Alvarez *et al.*, 2007).

Además de las descritas, existen muchas otras bases de datos mediante las cuales se investiga la resistencia del VIH, como son Stanford HIV Drug Resistance Database (www.hivdb.stanford.edu), Los Alamos National Laboratories (www.hiv.lanl.gov), Agence National de Recherches sur le SIDA (ANRS) (<http://www.hivfrenchresistance.org/>), British HIV Association (BHIVA) (<http://www.bhiva.org/>) o Centre Hospitalier du Luxembourg (CHL)

2. OBJETIVOS

El trabajo experimental de la presente Tesis se ha planteado en relación con los antecedentes expuestos en el capítulo **Introducción**, planteando los siguientes **Objetivos**:

1. Comparar la capacidad de predicción de la respuesta virológica de cuatro modelos genotípicos de interpretación de la resistencia del VIH, previamente desarrollados por la Red Andaluza para el Estudio de Resistencia a Antirretrovirales (RAERA), la Agence Nationale de Recherches sur le SIDA (ANRS), Visible Genetics (Siemens) y nuestro grupo de investigación, así como dos interpretaciones (dual y continua) del Fenotipo Virtual (Virco).
2. Estudiar la posible influencia de otros factores en la capacidad de predicción de dichos modelos. Determinar qué modelos son capaces de predecir la respuesta virológica a un régimen de tratamiento antirretroviral con independencia de otros factores.

3. PACIENTES Y MÉTODOS

3.1. PACIENTES.

Para la realización de este estudio se recogió información referente a 258 pacientes con serología positiva para el VIH y estudio de resistencias realizado entre Enero de 2002 y Septiembre de 2003, procedentes de 14 hospitales (**Tabla 3.1**): Hospital de Torrecárdenas y Hospital de Poniente (Almería); Hospital Clínico Virgen de la Victoria, Hospital Carlos Haya y Hospital Costa del Sol de Marbella (Málaga); Hospital Virgen del Rocío, Hospital Virgen de Valme y Hospital Virgen de la Macarena (Sevilla); Hospital Puerta del Mar, Hospital de Jerez y Hospital de La Línea (Cádiz); Hospital Juan Ramón Jiménez (Huelva); y Hospital Virgen de las Nieves y Hospital Clínico San Cecilio (Granada), siendo este último el centro desde el cual se coordinó la recogida de datos y donde se realizó el trabajo de investigación. Los hospitales en los que se realizaron los estudios genotípicos de resistencias fueron el Hospital Virgen de Valme, Hospital Virgen de la Macarena, Hospital Virgen de la Victoria y Hospital Clínico San Cecilio.

Tabla 3.1. Hospital de origen	
Hospital Universitario San Cecilio (Granada)	N=27 (11,5%)
Hospital Regional Universitario Carlos Haya (Málaga)	N=30 (12,8%)
Hospital Virgen de las Nieves (Granada)	N=26 (11,1%)
Hospital Virgen del Rocío (Sevilla)	N=25 (10,7%)
Hospital Virgen Macarena (Sevilla)	N=21(9,0%)
Hospital Puerta del Mar (Cádiz)	N=21 (9,0%)
Hospital Torrecárdenas (Almería)	N=18 (7,7%)
Hospital Virgen de la Victoria (Málaga)	N=18 (7,7%)
Hospital Nuestra Señora de Valme (Sevilla)	N=16 (6,8%)
Hospital de Jerez (Cádiz)	N=10 (4,3%)
Hospital Juan Ramón Jiménez (Huelva)	N=9 (3,8%)
Hospital Costa del Sol (Marbella, Málaga)	N=7 (3,0%)
Hospital de Poniente (El Ejido, Almería)	N=4 (1,7%)
Hospital La Línea (Cádiz)	N=2 (0,9%)

Aunque inicialmente se partió de un total de 258 pacientes, con posterioridad se excluyeron del estudio 15 pacientes que presentaban una carga viral basal <400 copias/ml, puesto que el límite de detección de niveles de ARN según la técnica de cuantificación utilizada por cada hospital era 50, 200 ó 400 copias/ml. Asimismo se excluyeron otros 9 pacientes porque el tratamiento que recibieron tras el estudio de resistencias incluía fármacos para los que no se habían desarrollado reglas de interpretación, como zalcitabina (ddC) o amprenavir (APV) no potenciado con ritonavir (RTV); en el caso del APV sólo se excluyeron los pacientes que presentaban alguna mutación en la PR.

Por tanto, este estudio se llevó a cabo finalmente con **234 pacientes**, de los que fueron recogidos los siguientes datos:

- Demográficos: número de historia clínica, referencia, edad, sexo, hospital de procedencia.
- Clínicos: recuento de linfocitos CD4+ a nivel basal (justo antes del cambio de tratamiento), a los tres y a los seis meses; niveles de ARN de VIH a nivel basal, a los tres y a los seis meses.
- Terapéuticos: tratamientos previo y posterior al estudio de resistencias, adherencia, número de fracasos, fecha de realización del test de resistencia, fecha de inicio del nuevo tratamiento, número de líneas de tratamiento, número de familias de antirretrovirales que han recibido previamente, características del nuevo régimen (número de fármacos, número de fármacos nuevos y número de familias nuevas).
- Genotípicos: mutaciones de resistencia a ITIANs, ITINANs e IPs.

La información procedente de los distintos hospitales se unificó en una única base de datos de SPSS sobre la que se comenzó a trabajar, calculando nuevas variables a partir de las ya existentes: diferencia entre el logaritmo de la CV basal y a los 3 meses ($\Delta\log CV_{3m}$), diferencia entre el logaritmo de la CV basal y a los 6 meses ($\Delta\log CV_{6m}$), CV indetectable a los 3 y 6 meses, número de fármacos activos, número de mutaciones de resistencia a ITIANs, ITINANs e IPs; número de TAMs y UPAMs; grado de sensibilidad al nuevo régimen (*score*) según los distintos modelos de interpretación genotípicos y fenotípicos, etc...

3.2. METODOS.

3.2.1. Determinación de la carga viral plasmática.

Los niveles plasmáticos de ARN o carga viral (CV) se determinaron mediante la técnica automatizada de COBAS Amplicor (Roche Diagnostics), que permite realizar simultáneamente la amplificación y cuantificación de dicho material genético. Está basada en 5 procesos fundamentales: 1) obtención del RNA de la muestra; 2) transcripción inversa para generar ADNc; 3) amplificación de este ADNc por PCR con *primers* específicos; 4) hibridación de los productos amplificados con sondas oligonucleotídicas específicas y 5) detección por colorimetría de los productos amplificados y unidos a las sondas. El material de partida es ARN plasmático al que se añade un control interno de cuantificación, con un número conocido de copias de ARN, de tamaño y composición de bases iguales al producto amplificado, a excepción de una pequeña región interna que servirá para diferenciarlos en la cuantificación.

El límite de detección inferior fue distinto en función de la versión utilizada por cada hospital: 200 copias/ml en los Hospitales de Poniente y Torrecárdenas; 400 copias/ml en el Hospital Virgen de la Macarena, que posteriormente pasó a ser de 50 copias/ml; el resto de hospitales sitúa su límite en 50 copias/ml.

3.2.2. Detección de mutaciones de resistencia.

El método de detección de mutaciones de resistencia empleado fue, en todos los casos, la técnica de secuenciación de ácidos nucleicos de TruGene™ HIV-1 Genotyping Kit (Visible Genetics). Esta técnica consta de 5 etapas: extracción del ácido nucleico, amplificación mediante RT-PCR, reacción de secuenciación bidireccional (CLIP) y electroforesis de los secuenciados, alineamiento de las secuencias e interpretación de los resultados (**figura 3.1**).

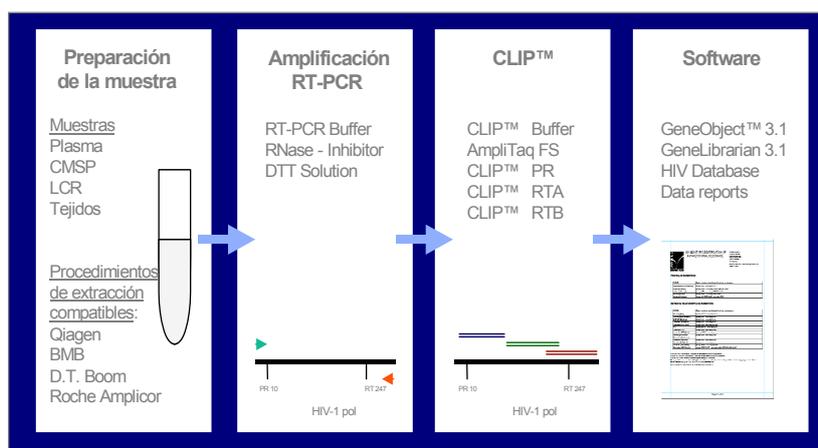


Figura 3.1. Etapas de la técnica de secuenciación.

En el laboratorio hay tres áreas bien diferenciadas para la realización de las distintas etapas: en el área 1 se lleva a cabo la extracción, así como la preparación de las mezclas de reactivos necesarias para las reacciones de amplificación y secuenciación; el área 2 es el área de PCR, donde se encuentra el termociclador necesario para la amplificación; por último, el área 3 es el área de secuenciación.

Con esta diferenciación de zonas se consigue evitar cualquier contaminación, ya que el sentido de avance es siempre del área 1 al 2 y al 3, y nunca a la inversa.

3.2.2.1. Procesamiento de la muestra: extracción del ácido nucleico.

Ésta es la primera etapa para la realización de cualquier técnica de Biología Molecular. Consiste en hacer accesible la diana, es decir, el ácido nucleico del VIH, que se encuentra dentro de la cápside viral. Para ello se realiza un pretratamiento del suero para conseguir la lisis de las partículas víricas; posteriormente se procede a separar el ácido nucleico de los restos virales y de las proteínas séricas (generalmente se hace por unión a una partícula sólida o por precipitación); finalmente se lava el ácido nucleico y se purifica, quedando al final una solución que contiene el ARN viral en condiciones de poder ser utilizado para la amplificación.

En nuestro estudio se empleó el protocolo de extracción de Qiagen (TruPrep QIAGEN®):

Concentración y lisis de la partícula vírica:

1.- Tomar 140 µl de suero. Si la muestra tiene una carga viral <1000 copias/ml se centrifuga previamente para conseguir una mayor concentración de ácido nucleico, con el objetivo de optimizar su posterior amplificación (Erali, 2001). Para ello se añade 1 ml de muestra en un eppendorf y se centrifuga a 23.600 rpm/1 hora/4°C. Se descarta el sobrenadante con cuidado de no arrastrar el pellet y se dejan 140 µl. Vortex 15-30”.

2.- Añadir 560 µl de Buffer AVL (agente de lisis). Vortex.

3.- Incubar 10 min. a temperatura ambiente. *Spin* 3.500 rpm/ 1 min.

Precipitación y recuperación del ácido nucleico:

4.- Añadir 560 µl de etanol 100% (precipitación). Vortex 15-30 segundos.

5.- Transferir 630 µl de la muestra a una columna. Centrifugar a 8000 rpm/1’. Recuperar la columna (ahí se queda el ácido nucleico, que se separa de los restos virales y proteínas séricas) y pasarla a un nuevo tubo de desecho.

6.- Transferir el resto de muestra (630 µl) a la columna. Centrifugar 8000 rpm/1’. Recuperar la columna y pasarla a un nuevo tubo de desecho.

Lavado del ácido nucleico:

7.- Añadir 500 µl de Buffer AW1 a la columna. Centrifugar 8000 rpm/1’. Recuperar la columna y pasarla a un nuevo tubo de desecho.

8.- Añadir 500 µl de Buffer AW2 a la columna. Centrifugar 13500 rpm/3’. Recuperar la columna y pasarla a un tubo eppendorff. Centrifugar de nuevo a 13500 rpm/1’.

9.- Pasar las columnas a un tubo eppendorff estéril.

Elución del ácido nucleico:

10.- Añadir 60 µl de Buffer AVE (eluyente). Incubar 1’ a temperatura ambiente. Centrifugar a 8000 rpm/1’.

11.- Asegurarse de que exista solución (ahí está el ácido nucleico, que el eluyente ha separado). Desechar la columna y guardar el eppendorff en nevera. Si la muestra no se va a procesar inmediatamente, congelar a -70°C.

3.2.2.2. Amplificación del ácido nucleico: RT-PCR.

La amplificación se realizó de acuerdo al siguiente protocolo:

Preparación de la RT-PCR Master Mix I (trabajar en hielo)

- Descongelar los reactivos a temperatura ambiente, excepto las enzimas y el inhibidor de la RNAsa. Vortex y centrifugar a 13.500 rpm unos segundos.
- Preparar la RT-PCR Master-Mix I en un tubo de 0.5 ml añadiendo los siguientes reactivos en el orden y proporciones que se especifican en la **tabla 3.2** (los volúmenes, expresados en µl, están ajustados según el número de muestras a procesar):
- Mezclar bien la Master-Mix I y añadir 9 µl de la misma a cada tubo de PCR de 0.2ml.
- Añadir 17 µl de muestra o control al tubo que contiene 9 µl de Master-Mix I. Mezclar con la pipeta.

Nº muestras	3	4	5	6	7	8
RT-PCR <i>primers</i>	21	27	36	42	48	54
dNTP	5,3	6,8	9	10,5	12	13,5
DTT	3,5	4,5	6	7	8	9
Inhibidor de RNAsa	1,8	2,3	3	3,5	4	4,5

Tabla 3.2. Reactivos para la RT-PCR Master-Mix I.

Preparación de la RT-PCR Master Mix II (Trabajar en hielo)

- Preparar la RT-PCR Master-Mix II en un tubo de 0.5 ml añadiendo los siguientes reactivos en el orden y proporciones que se especifican en la **tabla 3.3**. Trabajar en un tiempo inferior a 15 minutos.

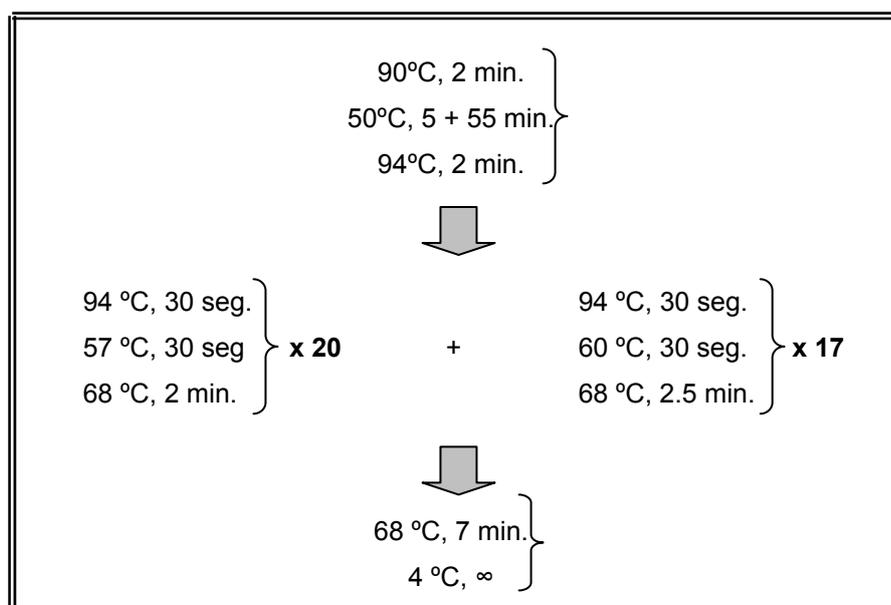
Nº muestras	3	4	5	6	7	8
RT-PCR buffer	35	45	60	70	80	90
Inhibidor de RNAsa	1,8	2,3	3	3,5	4	4,5
RT-Enzima	3,5	4,5	6	7	8	9
ADN polimerasa	8,8	11,3	15	17,5	20	22,5

Tabla 3.3. Reactivos para la RT-PCR Master-Mix II.

- Mezclar bien la Master-Mix II y mantenerla en hielo para transportarla después al área de PCR.

Montaje de la RT-PCR

- Seleccionar en el termociclador el programa de RT-PCR. Precalentar el aparato a 90°C. Pulsar pausa.
- Transferir los tubos con la mezcla Master-Mix I/muestra al área de PCR y situar en el termociclador precalentado. Ejecutar el programa de RT-PCR y cuando las muestras hayan estado 5 minutos a 50°C, pulsar pausa y añadir 14 µl de la Master-Mix II a cada tubo de PCR. Mezclar bien y ejecutar el programa, que durará aproximadamente 4 horas. El perfil de amplificación es el siguiente:



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

3.2.2.3. Secuenciación bidireccional y electroforesis de los secuenciados.

La reacción de secuenciación que realizamos se basa en la secuenciación bidireccional. Ésta, que se conoce como reacción CLIPTM, no es más que una modificación del método de Sanger que emplea terminadores de la secuencia de ADN en forma de didesoxinucleótidos (ddNTP). Los ddNTPs carecen del grupo –OH en el carbono 3 del azúcar, que es el responsable de la unión de los nucleósidos entre sí a través del grupo fosfato para formar el nucleótido e incorporarse a la cadena del ácido nucleico. Por lo tanto, si un enzima al elongar una cadena de ADN coloca en vez de una adenina en forma de dATP una ddATP, la cadena que se está formando se trunca y no puede ser elongada más. Por esto se dice que los ddNTPs son terminadores.

La mayoría de los métodos que se emplean para secuenciar emplean los terminadores marcados con fluoróforos. En este caso los terminadores no están marcados, son los *primers* los que se marcan. En concreto, un *primer* incorpora Cy5.5 como fluoróforo en 5' y el otro *primer* incorpora Cy5.0 en 3'. Estos dos fluoróforos tienen la característica de emitir luz a distintas longitudes de onda (690 y 670 nm respectivamente), de modo que podremos diferenciar con un láser la emisión de los productos de secuenciación iniciados con cada uno de estos dos *primers* y, de esta manera, conoceremos en un mismo tubo la secuencia *sense* y *antisense* (*forward* y *reverse*). El secuenciador semiautomático dispone de un sistema láser que hace lecturas cada 30 segundos, de manera que va registrando las señales que emiten los fluoróforos: el producto de secuenciación en la dirección 5' Cy5.5, que emite a 550 nm; en dirección 3' incorpora Cy5.0 y emite a 670 nm. El secuenciador tiene un sistema de registro de ambas longitudes de onda, de modo que lee a la vez la secuencia de la dirección 5' y 3'. Por esto a esta tecnología se la conoce como secuenciación bidireccional.

Alicuotar *primers*-terminadores

Partimos del producto de amplificación de 1.3 Kb del gen pol. Para cada amplificado a secuenciar vamos a realizar tres reacciones distintas de secuenciación: CLIP PR, en la que investigaremos la secuencia de la proteasa (codones 6-95 aproximadamente); CLIP RTA, en la que investigaremos una parte de

la transcriptasa reversa (RT *beginning*, codones 38-140 aproximadamente) y finalmente, CLIP RTB, en la que investigaremos otro fragmento de la transcriptasa reversa (RT *middle*, codones 130-249 aproximadamente).

Para llevar a cabo la secuenciación, para cada una de las tres regiones (PR, RTA, RTB) se necesitan 4 tubos (A, C, G, T). En cada uno de ellos se añaden los *primers* de secuenciación marcados con Cy5.5 y Cy5.0, el didesoxinucleótido correspondiente (ddATP, ddCTP, ddGTP y ddTTP) y los dNTPs.

- Trabajando en hielo, alicuotar 7 μ l de cada *primer*-terminador-dNTP en los 12 tubos correspondientes a cada muestra.

Preparación de la CLIP Master-Mix

- Descongelar los reactivos de la CLIP excepto la enzima.
- Preparar la master mix con los siguientes reactivos en el orden y proporciones que se especifican en la **tabla 3.4**, y comprobar que se ha mezclado bien (pipetear arriba y abajo):

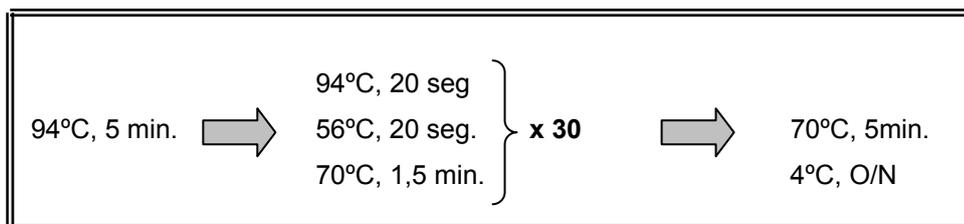
Nº muestras	3	4	5	6	7	8
Agua	246	328	437	475	550	626
CLIP buffer	62	83	111	120	139	158
Amplitaq FS	11,7	15,6	20,8	22,5	26,1	29,7

Tabla 3.4. Reactivos para la CLIP Master-Mix.

- Añadir 95 μ l de la mezcla de reacción por tubo.
- Trabajando en el área de secuenciación, y siempre en hielo, añadir 5 μ l del producto de amplificación a su correspondiente tubo con CLIP Master-Mix. Mezclar bien.
- Transferir 5 μ l a cada uno de los 12 tubos en que se alicuotaron los *primers*-terminadores.

Secuenciación

- Precalear el termociclador a 94°C, colocar los tubos y ejecutar el programa de secuenciación, que consta de los siguientes ciclos:



- Una vez finalizado, añadir 14 µl de solución de parada (formamida + colorante) por tubo (Tural, 2002). En este momento se pueden conservar las muestras a 4°C hasta el día siguiente.
- Antes de realizar la electroforesis de las muestras, desnaturalizarlas a 90°C durante cinco minutos en el termociclador del área de secuenciación. Pasar inmediatamente a hielo.

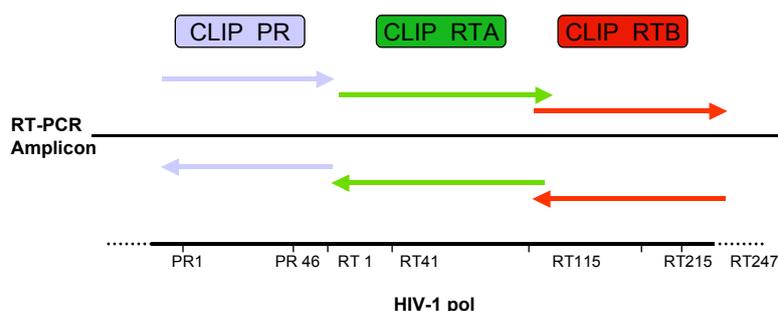


Figura 3.2. Secuenciación

5' ACTGTCAAAGTCATGCTACATGCATGCTACGATCGATAGCTACATGACCATGCTAATGACTA 3'
 3' **A**CTGGTACGATTACTG **Cy5.0**
 3' **A**TGTACTGGTACGATTACTG **Cy5.0**
 3' **A**TCGATGTACTGGTACGATTACTG **Cy5.0**
 3' **A**GCTATCGATGTACTGGTACGATTACTG **Cy5.0**
 3' **A**TGCTAGCTATCGATGTACTGGTACGATTACTG **Cy5.0**
 3' **A**CGATGCTAGCTATCGATGTACTGGTACGATTACTG **Cy5.0**
 3' **A**CGTACGATGCTAGCTATCGATGTACTGGTACGATTACTG **Cy5.0**
 3' **A**TGTACGTACGATGCTAGCTATCGATGTACTGGTACGATTACTG **Cy5.0**
 3' **A**CGATGTACGTACGATGCTAGCTATCGATGTACTGGTACGATTACTG **Cy5.0**
 3' **A**GTACGATGTACGTACGATGCTAGCTATCGATGTACTGGTACGATTACTG **Cy5.0**
 3' **A**GTTCAGTACGATGTACGTACGATGCTAGCTATCGATGTACTGGTACGATTACTG **Cy5.0**
 3' **A**CAGTTCAGTACGATGTACGTACGATGCTAGCTATCGATGTACTGGTACGATTACTG **Cy5.0**

Figura 3.3 (a) Después de 30 ciclos.

```

3' TGACAGTTTCAGTACGATGTACGTACGATGCTAGCTATCGATGTACTGGTACGATTACTGAT 5'
Cy5.5 TGTCAAAGTCA 3'
Cy5.5 TGTCAAAGTCATGCTA 3'
Cy5.5 TGTCAAAGTCATGCTACA 3'
Cy5.5 TGTCAAAGTCATGCTACATGCA 3'
Cy5.5 TGTCAAAGTCATGCTACATGCATGCTACGA 3'
Cy5.5 TGTCAAAGTCATGCTACATGCATGCTACGATCGA 3'
Cy5.5 TGTCAAAGTCATGCTACATGCATGCTACGATCGATA 3'
Cy5.5 TGTCAAAGTCATGCTACATGCATGCTACGATCGATAGCTA 3'
Cy5.5 TGTCAAAGTCATGCTACATGCATGCTACGATCGATAGCTACA 3'
Cy5.5 TGTCAAAGTCATGCTACATGCATGCTACGATCGATAGCTACATGA 3'
Cy5.5 TGTCAAAGTCATGCTACATGCATGCTACGATCGATAGCTACATGACCA 3'
Cy5.5 TGTCAAAGTCATGCTACATGCATGCTACGATCGATAGCTACATGACCATGCTA 3'
Cy5.5 TGTCAAAGTCATGCTACATGCATGCTACGATCGATAGCTACATGACCATGCTAA 3'
Cy5.5 TGTCAAAGTCATGCTACATGCATGCTACGATCGATAGCTACATGACCATGCTAATGA 3'
Cy5.5 TGTCAAAGTCATGCTACATGCATGCTACGATCGATAGCTACATGACCATGCTAATGACTA 3'

```

Figura 3.3 (b) Después de 30 ciclos.

Electroforesis de los productos de secuenciación

Al final de los 30 ciclos de la reacción de secuenciación, para cada muestra disponemos de 12 tubos: 4 de la CLIP PR (uno con ddATP; otro con ddCTP; otro con ddGTP; y otro con ddTTP), 4 de la CLIP RTA y 4 de la CLIP RTB. En cada uno de esos tubos tenemos: *primers* marcados y no incorporados, los de menor tamaño; distintos fragmentos con distinto peso molecular y con *primers* marcados incorporados; productos de secuenciación completos, con *primers* incorporados, los de mayor tamaño; y cDNA en exceso sin secuenciar.

Cuando se realiza la electroforesis estos componentes se separan en función de su peso molecular. Disponemos de todos los fragmentos con incrementos en su tamaño, de base en base, y marcados con Cy5.5 si se sintetizaron en dirección 5', y con Cy5.0 si se sintetizaron en dirección 3'.

- Tomar un cristal y colocarle el peine de 16 pocillos. Asegurarlo en su posición correcta en la tostadora (*gel toaster*) y llenar con la pistola de gel de poliacrilamida con cuidado de no formar burbujas.
- Conectar la tostadora y, transcurridos tres minutos de exposición a luz UV, 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 del gel.

- Colocar el cristal en el secuenciador (Long-Read Tower™) con cuidado de hacer coincidir los carriles con el lector de láser; llenar las cámaras superior e inferior con 1 ml de buffer TBE 1x.
- Hacer un *pre-run* para que el buffer TBE comience a pasar por los carriles.
- Lavar los pocillos con TBE 1x. Cargar en cada pocillo 1,5 µL de muestra desnaturalizada.
- Correr las muestras durante 50 minutos a 60 °C y con 2000 voltios de corriente.

Antes de cargar los pocillos se ha de programar el secuenciador introduciendo en el software los datos de la muestra, de las regiones y direcciones que se van a cargar en cada uno de los pocillos del gel y los parámetros de electroforesis.

Tras finalizar el tiempo de electroforesis, el aparato recoge todas las señales emitidas en cada carril y las transforma en un cromatograma. De este modo disponemos de 8 cromatogramas para cada región que se secuencia: 4 correspondientes a las bases A, C, G y T en dirección 5' y otros 4 en dirección 3'.

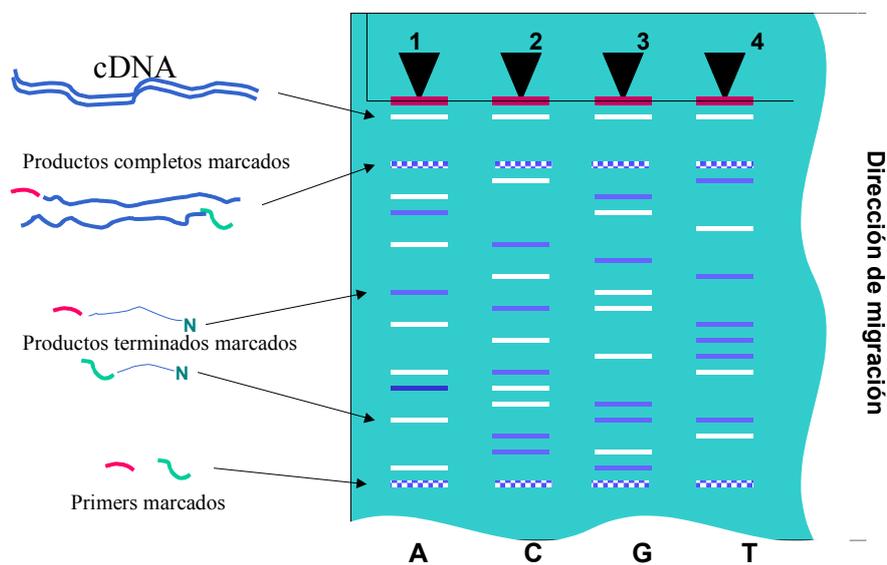


Figura 3.4. Migración en el gel.

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

El paso final para la secuenciación consiste en el alineamiento de las secuencias. Mediante este procedimiento el software integra los 4 cromatogramas obtenidos para cada región secuenciada (PR, RTA y RTB) y para cada dirección (5' y 3'). Tras hacer la asignación de bases (*base calling*), podemos visualizar la secuencia correspondiente a cada una de la regiones y cada una de las direcciones.

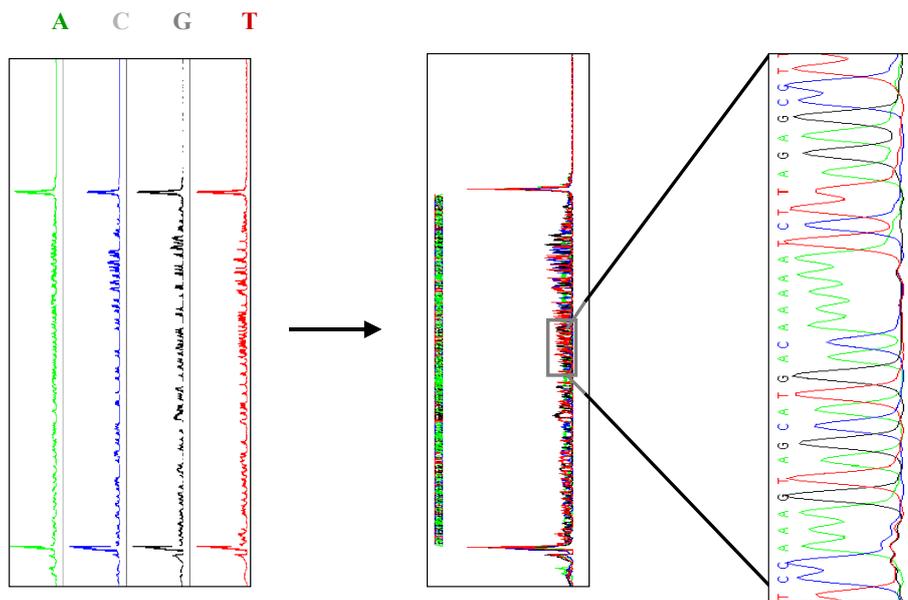


Figura 3.5. Alineamiento y denominación de las bases.

Después de revisar la calidad de las secuencias es necesario combinar las secuencias obtenidas en las direcciones 5' y 3' de cada región secuenciada, y además combinar todas las regiones una tras otra (PR, RTA y RTB). Asimismo, enfrentamos las secuencias obtenidas con una cepa de referencia en la que no existen mutaciones de resistencia (cepa salvaje, *wild type* o WT, HIV-1 B LAV-1) (Erali *et al.*, 2001).

A continuación, revisamos la secuencia completa, viendo las bases en las que no existe concordancia entre las direcciones 5' y 3' o con la secuencia *wild type* y revisando todas las posiciones de resistencia. En estos pasos debemos ser extremadamente cautelosos, ya que somos nosotros los que vamos a decidir si estamos o no de acuerdo con la interpretación que el software realiza.

Finalmente, comprobamos que no existen posibles contaminaciones cruzadas con otras muestras (*fingerprinting*).

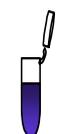
Las secuencias obtenidas pueden ser transformadas a formato de texto para ser exportadas y de esta manera realizar subtipado, análisis de mutaciones de resistencia mediante otros algoritmos de interpretación diferentes, etc.

Trabajar siempre a 4°C (en hielo)

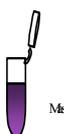
RE-PCR

Área de preparación de reactivos

1º Paso: Preparación de Mister Mixes (volumen µl)



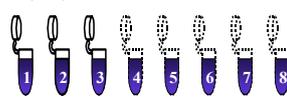
Mister Mix I



Mister Mix II

No Reacción	3	4	5	6*	7	8
RE-PCR Primer	21	27	36	42	48	54
dNTP	53	68	9	105	12	135
DTT	35	45	6	7	8	9
RNase Inhibitor	18	23	3	35	4	45

No Reacción	3	4	5	6*	7	8
RE-PCR Buffer I	35	45	60	70	80	90
RNase Inhibitor	18	23	3	35	4	45
RE-Fluore	35	45	6	7	8	9
DNA Polymerase	88	113	15	175	20	225



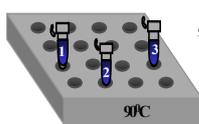
9 µl Mister Mix I
17 µl RNA
17 µl acetato mineral**

Pr tubo

* Mínimo número de reacciones que se pueden realizar en una microplaca de 96 pocillos
** Añadir si el termociclador no tiene tapa caliente

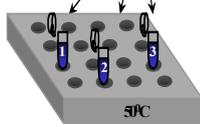
Área de PCR

2º Paso: Añadir la Mister Mix II e iniciar la PCR



90°C

90°C 2min
50°C 5min



50°C

14 µl de Mister Mix II por cada tubo de PCR

Programa

- 90°C 2min	
- 50°C 5+5min	
- 90°C 2min	
- 94°C 30sec	- 94°C 30sec
- 57°C 30sec	- 60°C 30sec x17
- 68°C 2min	- 68°C 25min
- 68°C 7min	
- 4°C ON	

Rampa 1°/sec



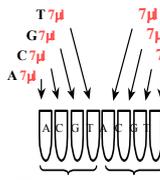
Cie Card HIV Genotyping Kit / Version 20 / F&O1 / LH-AM

Trabajar siempre a 4°C (en hielo)

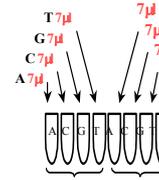
CLIP™ Reaction

Área de preparación de reactivos

1º Paso: Alicutar los Terminadores (Pr muestra)



CLIP™ RT/Begining

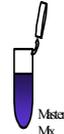


CLIP™ RT/Middle

T 7µl, G 7µl, C 7µl, A 7µl, 7µl A, 7µl C, 7µl G, 7µl T

2º Paso: Preparar y Alicutar Mister Mix (volumen µl)

No Reacciones	3	4	5	6	7	8
Water	246	328	437	475	530	626
CLIP™ Buffer I	62	83	111	120	139	158
AmpliTaq FS	117	156	208	225	261	297



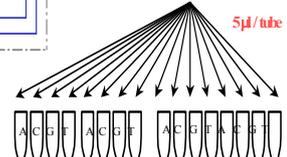
Mister Mix

Alicutar 95 µl / sample

Añadir 5 µl RE-PCR

Work Station

5 µl / tube



Área de PCR

Programa Termociclador:

- 94°C 5min	30
- 94°C 20sec	
- 56°C 20sec	
- 70°C 15min	
- 70°C 5min	
- 4°C ON	

Rampa 1°/sec

- Añadir 14 µl de Stop Loading Dye
- Calentar a 70-95°C durante 2 min
- Guardar a 4°C.

Parámetros de electroforesis

- MicroChip™: 50	- Resolución: 0.5 sec muestra
- Temperatura: 60°C	- Tiempo: 50 min
- Voltaje: 200 V	- Distancia pocios: 10
- Laser Power: 50%	- Surefill™: 0%



Cie Card HIV Genotyping Kit / Version 20 / F&O1 / LH-AM

Figura 3.6. TRUGENE™ HIV-1 Genotyping Kit

3.2.3. Interpretación de las mutaciones de resistencia.

En los pacientes a los que se realizó el estudio de resistencias se investigó la presencia de las mutaciones de resistencia incluidas en el software de TruGene™ HIV-1 (*GuideLines* 6.0, Visible Genetics), las publicadas por la Internacional AIDS Society en 2004 (Johnson VA *et al.* 2004; disponibles en: <http://www.iasusa.com>) y la versión nº 12 de los algoritmos de la ANRS (ANRS AC-11, Septiembre 2004; disponible en: <http://www.hivfrenchresistance.org>). Las mutaciones investigadas, clasificadas por familias de fármacos, se resumen en la **tabla 3.5**.

Mutaciones de resistencia a ITIAN	Mutaciones de resistencia a ITINAN	Mutaciones de resistencia a IP
M41L	A98G/S	L10FIRV
E44D	L100I	K20MRTI
A62V	K101E/H/P/Q	L24I
K65R	K103N	D30N
D67N	V106A/I	V32I
T69D/N/G/S	V108I	L33F/I/V
INSER69	V179D/E/N	M36I
K70R/E	Y181C/I/V	M46I/L/P
K70E	Y188C/H/I/L	I47V
L74V	G190A/E/S	G48I/V
V75I/T/M/S/A	P225H	I50VL
F77L	F227L	F53L
Y115F	M230L	I54L/M/S/V/T
F116Y	P236L	M58E
V118I	M238T	L63P
Q151M		A71I/L/T/V
M184V/I		G73A/C/S/T
M208Y		M74S
L210W		V77I
T215Y/F/C		V82A/F/S/T
K219Q/E/R		I84V
M221Y		N88D/S
		L90M

Tabla 3.5. Mutaciones de resistencia investigadas.

La página web de la Universidad de Stanford (<http://hivdb.stanford.edu/>) dispone de un programa de acceso libre y gratuito (*HIVdb Program*), que realiza una interpretación de la resistencia a los diferentes antirretrovirales al introducir una

secuencia completa o una lista de mutaciones de la RT o PR de la cepa problema. El algoritmo de interpretación de la Universidad de Stanford es el más difundido entre la comunidad científica, ya que se actualiza de forma continua basándose en trabajos científicos de calidad. Con el fin de determinar el grado de resistencia de nuestra población a los antirretrovirales disponibles creamos la variable “**Numero de fármacos activos**”. Introduciendo en el programa las mutaciones detectadas en cada paciente (entre las de la tabla 3.5) obtuvimos una interpretación de la resistencia a cada fármaco, con varias categorías: “sensibilidad”, “actividad disminuida”, “posible resistencia”, “resistencia”. Nosotros consideramos “fármacos activos” sólo los clasificados como “**sensibles**” por la aplicación, sin tener en cuenta aquellos en los que se preveía algún grado, aunque fuera mínimo, de resistencia. Es importante destacar que nosotros **no** hemos utilizado este programa como **una interpretación de la resistencia a los fármacos del tratamiento de rescate**, sino como una herramienta más para describir las características basales de la población estudiada, que nos permite conocer cuántos fármacos no se verían afectados por las mutaciones detectadas.

3.2.3.1. Algoritmos para la interpretación de la resistencia a fármacos antirretrovirales.

Las mutaciones detectadas fueron interpretadas mediante seis algoritmos, cuatro algoritmos genotípicos y dos interpretaciones (continua y dual) del fenotipo virtual:

- **Algoritmo Andalucía.**

Se trata de un algoritmo genotípico, aplicado por los distintos centros que forman parte de la Red Andaluza para el Estudio de Resistencias a Antirretrovirales (RAERA) para interpretar las mutaciones de resistencia a los antirretrovirales. Está compuesto por las reglas de interpretación de la resistencia a ITIANs, ITINANs e IPs que se muestran en las **tablas 3.5, 3.8 y 3.9**, basadas en los algoritmos de la ANRS (IPs), Detroit Medical Center (<http://www.ablsa.com/>), Universidad de Stanford y diversas publicaciones científicas de relevancia internacional (Bacheler *et al.*, 2001; Casado *et al.*, 2000; Conway *et al.*, 2001; Chantret *et al.*, 2002; Colonna *et al.*, 2002; Doyon *et al.*, 2003, Marcelin *et al.*, 2003a; Underwood *et al.*, 2005; Whitcomb *et al.*,

2003). La resistencia esperada frente a cada fármaco integrante del tratamiento se clasificó en 3 categorías: “sensibilidad”, “actividad disminuida” y “resistencia”.

- **Algoritmo Andalucía-DTL.**

Este algoritmo es una variante del anterior: las mutaciones de resistencia a todos los fármacos, excepto didanosina, tenofovir y lopinavir/ritonavir, fueron interpretadas según las mismas reglas que el algoritmo Andalucía, pero estos 3 fármacos fueron interpretados mediante reglas desarrolladas por nuestro grupo de investigación en trabajos previos (Álvarez *et al.*, 2004; Álvarez *et al.*, 2005; Martínez, 2004) con el fin de validar su utilidad. La resistencia esperada frente a cada fármaco integrante del tratamiento se clasificó en 3 categorías: “sensibilidad”, “actividad disminuida” y “resistencia” (**tablas 3.6, 3.8 y 3.10**).

- **Algoritmo ANRS-DTL.**

Este algoritmo genotípico interpretó la resistencia a los antirretrovirales según las reglas publicadas en el documento AC-11, de Septiembre de 2003, de la Agence Nationale de Recherches sur le SIDA (ANRS, Francia. Disponible en: <http://www.hivfrenchresistance.org>), excepto en el caso de didanosina, tenofovir y lopinavir/ritonavir, que fueron interpretados mediante las mismas reglas que el algoritmo Andalucía-DTL para valorar su capacidad de predicción de la respuesta. Las reglas para las distintas familias de fármacos se muestran en las **tablas 3.7, 3.8 y 3.11**. La resistencia esperada frente a cada fármaco integrante del tratamiento se clasifica en 3 categorías: “sensibilidad”, “actividad disminuida” y “resistencia”.

Tabla 3.5. Algoritmo Andalucía: interpretación de las mutaciones de resistencia a ITIAN.		
FÁRMACO	RESISTENCIA	ACTIVIDAD DISMINUIDA
AZT	- T215Y/F (pero T215Y/F+M184V = SENSIBLE) - 3 NAMs sin la 215Y/F - 5 NAMs sin 215Y - Q151M - Inserción 69	- 2 NAMs sin la 215 Y/F - 3 de M41L, D67N, K70R, L210W, 215 no Y/F + M184V
3TC	- M184V/I - Inserción 69 - M41L + L210W + T215Y/F + E44D, V118I	- K65R - Q151M
ddl	- L74I/V+184V - Q151M - Inserción 69 - K65R - M41L + D67N + L210W + T215Y + 1 de E44D, T69D/N/S, L74V, V118I	- L74V - M41L+D67N+L210W+ T215Y - M41L + D67N + L210W + T215Y + 1 de E44D, T69D/N/S, L74I/V, V118I + M184V
d4T	- V75M/S/A/T - Q151M - Inserción 69 - M41L + L210W + T215Y - ≥ 4 de M41L, D67N, K70R, L210W, T215F, K219Q/E	- 3 de M41L, D67N, K70R, L210W, 215F, K219Q/E - 4 de M41L, D67N, K70R, L210W, T215F, K219Q/E + M184V
ABC	- ≥ 5 de : M41L, D67N, L74V, M184V/I, L210W, T215Y/F - Q151M - Inserción 69 - L74V+ M184V - K65R+ M184V	- 4 de : M41L, D67N, L74V, M184V/I, L210W, T215Y/F - K65R
TDF	- K65R - Inserción 69 - 41L, 210W, 215Y - 5 NAMs sin 215Y	- K65R + M184V - 4 NAMs sin T215Y - 5 NAMs sin T215Y + M184V

Tabla 3.6. Algoritmo Andalucía-DTL: interpretación de las mutaciones de resistencia a ITIAN.		
FARMACO	RESISTENCIA	ACTIVIDAD DISMINUIDA
AZT	<ul style="list-style-type: none"> - T215Y/F (pero T215Y/F + M184V = SENSIBLE) - 3 NAMs sin la 215Y/F - 5 NAMs sin 215Y - Q151M - Inserción 69 	<ul style="list-style-type: none"> - 2 NAMs sin la 215 Y/F - 3 de M41L, D67N, K70R, L210W, 215 no Y/F + M184V
3TC	<ul style="list-style-type: none"> - M184V/I - Inserción 69 - M41L + L210W + T215Y/F + E44D, V118I 	<ul style="list-style-type: none"> - K65R - Q151M
ddl	<ul style="list-style-type: none"> - L74I/V + M184V - Q151M - Inserción 69 - K65R - M41L+ D67N + V118I + L210W + T215Y - K70R - M184V ≥ 2 	<ul style="list-style-type: none"> - L74V
d4T	<ul style="list-style-type: none"> - V75M/S/A/T - Q151M - Inserción 69 - M41L + L210W + T215Y - M41L + D67N + K70R + L210W + T215F + K219Q/E ≥ 4 	<ul style="list-style-type: none"> - 3 de M41L, D67N, K70R, L210W, 215F, K219Q/E - 4 de M41L, D67N, K70R, L210W, T215F, K219Q/E + M184V
ABC	<ul style="list-style-type: none"> - ≥ 5 de : M41L, D67N, L74V, M184V/I, L210W, T215Y/F - Q151M - Inserción 69 - L74V+ M184V - K65R+ M184V 	<ul style="list-style-type: none"> - 4 de : M41L, D67N, L74V, M184V/I, L210W, T215Y/F - K65R
TDF	<ul style="list-style-type: none"> - K65R - Inserción 69 - M41L + E44D + D67N + V118I + L210W +T215Y - M184V/I ≥ 4 	<ul style="list-style-type: none"> - K65R + M184V - M41L + E44D + D67N + V118I + L210W +T215Y - M184V/I = 3

Tabla 3.7. Algoritmo ANRS-DTL: interpretación de las mutaciones de resistencia a ITIAN.		
FARMACO	RESISTENCIA	ACTIVIDAD DISMINUIDA
AZT	- T215Y/F (T215Y/F + M184V = SENSIBLE) - 3 NAMs sin la 215Y/F - 5 NAMs sin 215Y - Q151M - Inserción 69	- 2 NAMs sin la 215 Y/F - 3 de M41L, D67N, K70R, L210W, 215 no Y/F + M184V
3TC	- M184V/I - Inserción 69 - M41L + L210W + T215Y/F + E44D, V118I	- K65R - Q151M
ddl	- Q151M - K65R - Insertion at codon 69 - M41L + T69D + L74V + T215Y/F + K219Q/E - K70R - M184 V/I ≥ 2	- L74V
d4T	- V75M/S/A/T - Q151M - Inserción 69 - M41L + L210W + T215Y - M41L + D67N + K70R + L210W + T215F + K219Q/E ≥ 4	- M41L + D67N + K70R + L210W + T215F + K219Q/E = 3 - 4 de M41L, D67N, K70R, L210W, T215F, K219Q/E + M184V
ABC	- M41L + D67N + L74V + M184V/I + L210W + T215Y/F ≥ 5 - Q151M - Inserción 69 - L74V + M184V - K65R + M184V	- M41L + D67N + L74V + M184V/I + L210W + T215Y/F = 4 - K65R
TDF	- K65R - Inserción 69 - M41L + E44D + D67N + T69D/N/S + L74V + L210W + T215Y/F ≥ 6	- M41L + E44D + D67N + T69D/N/S + L74V + L210W + T215Y/F = 3-5

Tabla 3.8. Interpretación de las mutaciones de resistencia a ITINAN mediante los algoritmos Andalucía, Andalucía-DTL y ANRS-DTL.

Mutaciones	EFV	NVP
A98G	AD	AD
L100I	AD	S
K101E/Q	R	R
K103N/S	R	R
K103S + V179D	R	R
V106A	S	R
V106M	R	R
V108I	AD	AD
G190A	R	R
G190S	R	R
Y181C/I	R	R
Y188C/H	S	R
Y188L	R	R
E225H	R	R
M230L	R	R
≥ 2 de L100I, K106E, V106A, Y181C/I, G190A/S, M230L	R	R

R= Resistencia; AD= Actividad disminuida; S= Sensibilidad.

Tabla 3.9. Algoritmo Andalucía: interpretación de las mutaciones de resistencia a IPs.		
FÁRMACO	RESISTENCIA	ACTIVIDAD DISMINUIDA
IDV/r	≥ 3 de: L10F/I/R/V, K20M/R, V32I, L33F, M46L, I47V, G48V, I50V, I54M/L/T/V, A71I/L/V/T, G73S, 77, V82A/F/S/T, I84V, N88S/D, L90M	
NFV	- D30N - L90M	V82A/F/S/T ó I84A/V ó N88S/D y ≥ 2 de: L10I, M36I, M46I/L, I54V/L/M/T, A71V/T, V77I
SQV/r	- G48V - 2 de: L24I, I54VL, I62V, V82A/F/S/T, I84V, L90M	
FosAPV/r	- I50V - V32I + I47V - ≥ 6 de: L10F/I/V, K20M/R, E35D, R41K, I54V, L63P, 82A/F/S/T, I84V	
LPV/r	- V32I + I47A - ≥ 6 mutaciones de: L10F/I/R/V, K20M/R, L24I, L33F, M46I/L, I50V, F53L, I54M/L/T/V, L63P, A71I/L/V/T, G73S, V82A/F/S/T, I84V, L90M	5 mutaciones de: L10F/I/R/V, K20M/R, L24I, L33F, M46I/L, I50V, F53L, I54M/L/T/V, L63P, A71I/L/V/T, G73S, V82A/F/S/T, I84V, L90M
ATZ/r	- I50L - ≥ 6 mutaciones de: L10F/I/V, K20I/M/R, L24I, L33F/I/V, M36I/L/V, M46I/L, G48V, I54L/V, L63P, A71I/T/V, G73A/C/S/T, V82A/F/S/T, I84V, N88S, L90M.	
TPV/r	≥ 8 mutaciones de: L10V, I13V, K20M/R/V, L33F, E35G, M36I, K43T M46L, I47V, I54A/M/V, Q58E, H69K, T74P, V82L/T, N83D, I84V.	4-7 mutaciones de: L10V, I13V, K20M/R/V, L33F, E35G, M36I, K43T M46L, I47V, I54A/M/V, Q58E, H69K, T74P, V82L/T, N83D, I84V.

Tabla 3.10. Algoritmo Andalucía-DTL: interpretación de las mutaciones de resistencia a IPs.		
FÁRMACO	RESISTENCIA	ACTIVIDAD DISMINUIDA
IDV/r	≥ 3 de: L10F/I/R/V, K20M/R, V32I, L33F, M46L, I47V, G48V, I50V, I54M/L/T/V, A71I/L/V/T, G73S, 77, V82A/F/S/T, I84V, N88S/D, L90M	
NFV	- D30N - L90M	V82A/F/S/T ó I84A/V ó N88S/D y ≥ 2 de: L10I, M36I, M46I/L, I54V/L/M/T, A71V/T, V77I
SQV/r	- G48V - 2 de: L24I, I54VL, I62V, V82A/F/S/T, I84V, L90M	
FosAPV/r	- I50V - V32I + I47V - ≥ 6 de: L10F/I/V, K20M/R, E35D, R41K, I54V, L63P, 82A/F/S/T, I84V	
LPV/r	- V32I + I47A - ≥ 3 de L10F/I/R/V, M46L, I54V, V82A/F/S/T, I84V	
ATZ/r	- I50L - ≥ 6 mutaciones de: L10F/I/V, K20I/M/R, L24I, L33F/I/V, M36I/L/V, M46I/L, G48V, I54L/V, L63P, A71I/T/V, G73A/C/S/T, V82A/F/S/T, I84V, N88S, L90M.	
TPV/r	≥ 8 mutaciones de: L10V, I13V, K20M/R/V, L33F, E35G, M36I, K43T M46L, I47V, I54A/M/V, Q58E, H69K, T74P, V82L/T, N83D, I84V.	4-7 mutaciones de: L10V, I13V, K20M/R/V, L33F, E35G, M36I, K43T M46L, I47V, I54A/M/V, Q58E, H69K, T74P, V82L/T, N83D, I84V.

Tabla 3.11. Algoritmo ANRS-DTL: interpretación de las mutaciones de resistencia a IPs.		
FÁRMACO	RESISTENCIA	ACTIVIDAD DISMINUIDA
IDV/r	≥ 3 de: L10F/I/R/V, K20M/R, V32I, L33F, M46L, I47V, G48V, I50V, I54M/L/T/V, A71I/L/V/T, G73S, 77, V82A/F/S/T, I84V, N88S/D, L90M	
NFV	- D30N - L90M	V82A/F/S/T ó I84A/V ó N88S/D y ≥ 2 de: L10I, M36I, M46I/L, I54V/L/M/T, A71V/T, V77I
SQV/r	- G48V - 2 de: L24I, I54VL, I62V, V82A/F/S/T, I84V, L90M.	
FosAPV/r	- I50V - V32I + I47V - ≥ 6 de: L10F/I/V, K20M/R, E35D, R41K, I54V, L63P, 82A/F/S/T, I84V	
LPV/r	- V32I + I47A - ≥ 8 de: L10F/I/R/V, K20M/R, L24I, L33F, M46I/L, I50V, F53L, I54M/L/T/V, L63P, A71I/L/V/T, V82A/F/S/T, I84V, L90M.	6-7 de: L10F/I/R/V, K20M/R, L24I, L33F, M46I/L, I50V, F53L, I54M/L/T/V, L63P, A71I/L/V/T, V82A/F/S/T, I84V, L90M.
ATZ/r	- I50L - ≥ 6 mutaciones de: L10F/I/V, K20I/M/R, L24I, L33F/I/V, M36I/L/V, M46I/L, G48V, I54L/V, L63P, A71I/T/V, G73A/C/S/T, V82A/F/S/T, I84V, N88S, L90M.	
TPV/r	≥ 8 mutaciones de: L10V, I13V, K20M/R/V, L33F, E35G, M36I, K43T M46L, I47V, I54A/M/V, Q58E, H69K, T74P, V82L/T, N83D, I84V.	4-7 mutaciones de: L10V, I13V, K20M/R/V, L33F, E35G, M36I, K43T M46L, I47V, I54A/M/V, Q58E, H69K, T74P, V82L/T, N83D, I84V.

▪ **Algoritmo Visible Genetics.**

Este algoritmo genotípico interpretó las mutaciones de resistencia del VIH, detectadas mediante el sistema TRUGENE™ HIV-1 Genotyping Test, gracias a un software de última generación que aplicó las *GuideLines*® 6.0 (Visible Genetics Inc., Toronto, Ontario, Canadá). Las *GuideLines*® consisten en un sofisticado algoritmo (dada su gran extensión, no se muestra), desarrollado y actualizado regularmente por un panel internacional de expertos en VIH para incorporar nuevas mutaciones de resistencia o añadir nuevos antirretrovirales aprobados, de forma que la toma de decisiones se base en una información lo más actualizada posible.

El informe de mutaciones (**figura 3.7**) está formado por 4 columnas, en las que se muestran:

- Mutaciones de resistencia.
- Mutaciones silentes en todas las posiciones, es decir, cambios en las bases que codifican el mismo aminoácido.
- Polimorfismos: mutaciones no localizadas en posiciones de resistencia.
- Mutaciones en posiciones de resistencia que no disminuyen la sensibilidad a los fármacos.

El informe de resistencias, según la interpretación realizada por el software (*GuideLines*® 6.0), clasifica la actividad de los fármacos prevista por el algoritmo en las categorías “Resistencia”, “Resistencia parcial” y “No evidencia de resistencia” (**figura 3.8**).

HIV-1 PROTEASE AND REVERSE TRANSCRIPTASE MUTATION IDENTIFICATION

SAMPLE ID: LA-PA1-0002
 PATIENT ID: tutorial
 DATE DRAWN: 3 Mar 1999
 DATE of REPORT: Tue 02/06/01 06:49 PM

Resistance mutations	Silent Mutations (at all positions)	Polymorphisms: coding changes not at resistant sites	Unexpected mutations at resistant sites
PR 28 (CTC)L10IV (RTA) 58 (AAG)K20R (AGG) 106 (ATG)M36I (ATA) 136 (ATG)M46I (ATA) 160 (ATC)I54V (GTC) 211 (GCT)A71V (GTT) 244 (GTC)V82NT (AMC) 250 (ATA)I84V (GTA) RT 121 (ATG)M41L (TTG) 199 (GAC)D67N (AAT) 205 (ACT)T69D (GAT) 550 (ATG)M184V (GTG) 628 (TTG)L210W (TGG) 643 (ACC)T215Y (TAC)	PR 52 (CAA)Q18Q (CAG) 97 (TTA)L33L (VTA) ^{***} 151 (GGA)G51G (GGG) 280 (GGT)G94G (GGC) RT 133 (GGG)G45G (GGA) 193 (AAA)K65K (AAG) ^{***} 232 (AGA)R78R (AGG) 250 (ACT)T84T (ACC) 289 (CCC)P97P (CCT) 310 (AAA)K104K (AAG) 319 (ACA)T107T (ACG) 346 (TTT)F116F (TTY) ^{***} 394 (ATA)I132I (ATW) 418 (CCA)P140P (CCR) 502 (TTA)L168L (CTA) 580 (GAA)E194E (GAG) 589 (CAG)Q197Q (CAA) 610 (GAG)E204E (GAA) 637 (GGA)G213G (GGG) 658 (AAA)K220K (AAG) 679 (TTC)F227F (TTT) 709 (GAT)D237D (GAC)	PR 43 (ATA)I15V (GTA) 103 (GAA)E35E/D (GAM) 109 (AGT)S37N (AAT) 157 (TTT)F53L (CTT) 172 (CAG)Q58E (GAG) 208 (AAA)K70K/E (RAA) 214 (ATA)I72V (GTA) 292 (AAT)N88N/I (AWT) RT 112 (TGT)C38G/C (KGT) 127 (AAG)K43Q (CAG) 130 (GAA)E44D (GAC) 178 (GTA)V80I (ATA) 352 (GTT)V118I (ATT) 361 (GAT)D121Y (TAT) 403 (ATA)I135T (ACA) 484 (AGT)S162A (GCT) 586 (GGG)G196E (GAG) 607 (GAG)E203K (AAG) 619 (CAA)Q207E (GAA) 631 (AGG)R211K (AAG) 640 (CTT)L214F (TTT) 724 (CAG)Q242Q/X (VAG)	PR 244 (GTC)V82NT (AMC)

Figura 3.7. Ejemplo de informe de mutaciones detectadas en la RT y PR mediante el sistema TRUGENE™.



Sample ID: LA-PA1-0002
 Patient ID: **not valid**
 Report Date: Jan 19, 2001, 16:01:33 -0500
 Laboratory: <NA>
 Contact: <NA>

Date Drawn: 03 Mar 2000
 Patient Name: <NA>
 Physician:
 Institution: <NA>

Relevant RT Mutations: M41L E44D D67N T69D V118I M184V L210W T215Y

Nucleoside RT Inhibitors

Resistance Interpretation

zidovudine	Resistance
didanosine	Resistance
zalcitabine	Resistance
lamivudine	Resistance
stavudine	Resistance
abacavir	Resistance
tenofovir	Insufficient Data
foscarnet	Insufficient Data

NonNucleoside RT Inhibitors

Resistance Interpretation

nevirapine	No Evidence of Resistance
delavirdine	No Evidence of Resistance
efavirenz	No Evidence of Resistance

Relevant Protease Mutations: L10I L10V K20R M36I M46I I54V A71V V82T I84V

Protease Inhibitors

Resistance Interpretation

saquinavir	<i>Partial Resistance</i>
indinavir	Resistance
ritonavir	Resistance
nelfinavir	Resistance
amprenavir	Resistance

Resistance Interpretation is based upon an international expert panel interpretation of *in vitro* phenotypic and *in vivo* virologic response data available as of February 2000 for correlation of Protease and RT sequences to antiretroviral drug resistance. These include primary and secondary mutations.

Signature: _____

Date: _____

Name (Print): _____

Title: _____



The TRUGENE HIV-1 Resistance Report uses GuidLines™ rules developed by an international expert panel. Not for use in the United States of America, Canada, Japan, or Australia.

DR 3.1.3E HFNA(2000/09/25) GuidLines 2.0 (v1.12) ©2000 Visible Genetics Inc.

<NA> / <NA>

Page 1 of 4

Figura 3.8. Ejemplo de informe de resistencias de Visible Genetics.

Cálculo del score genotípico de susceptibilidad (GSS):

La interpretación de las mutaciones realizada por cada uno de los 4 algoritmos genotípicos descritos, para cada fármaco del nuevo régimen terapéutico, se transformó en **valores numéricos**, según el método descrito por De Luca *et al.* (2004): “Resistencia” = 0; “Actividad disminuida”, “Posible resistencia” o “Resistencia parcial” = 0,5; “Sensibilidad” o “No evidencia de resistencia” = 1.

La actividad que se esperaba obtener con el régimen completo se calculó como la suma aritmética del score de cada fármaco. Por ejemplo, si, según uno de los algoritmos, ddl=resistencia, TDF= sensibilidad y LPV/RTV= actividad disminuida, la actividad del régimen completo tendrá un valor = 0 + 1 + 0,5 = 1,5. El valor 1,5 es la puntuación o **score genotípico de susceptibilidad (GSS)** que dicho algoritmo otorga al régimen terapéutico administrado, en función de su interpretación del genotipo del paciente. En este caso, el régimen incluiría menos de 2 fármacos activos.

▪ **Fenotipo Virtual (FV).**

La interpretación de la resistencia mediante Fenotipo Virtual (VircoNET™ Versión 1.6.1) se realizó de dos formas, **cuantitativa y dual**, obteniéndose dos **scores** fenotípicos de sensibilidad: **FVSS-continuo** y **FVSS-dual**.

En los informes del FV (**figura 3.8**) se muestra la proporción de casos en los que el genotipo estudiado se asocia con susceptibilidad a cada uno de los antirretrovirales (barras en verde). El cálculo del FVSS-continuo de cada régimen terapéutico se realizó mediante la suma aritmética de dicho valor en todos los fármacos del tratamiento. En el informe de la figura 3.8, si el paciente es tratado con 3TC, TDF y EFV:

$$\text{FVSS-continuo} = 0,05 + 0,90 + 0,95 = 1,90$$

El valor de FVSS-dual para cada fármaco del régimen se calculó otorgando las categorías “Sensible” (valor 1) o “Resistente” (valor 0) a cada fármaco del régimen, según la proporción indicada por las barras en verde; a continuación se realizó la suma aritmética del valor de todos los fármacos del régimen. Por ejemplo, según el informe de la figura 3.8, para un paciente tratado con 3TC, TDF y EFV el valor FVSS-dual sería:

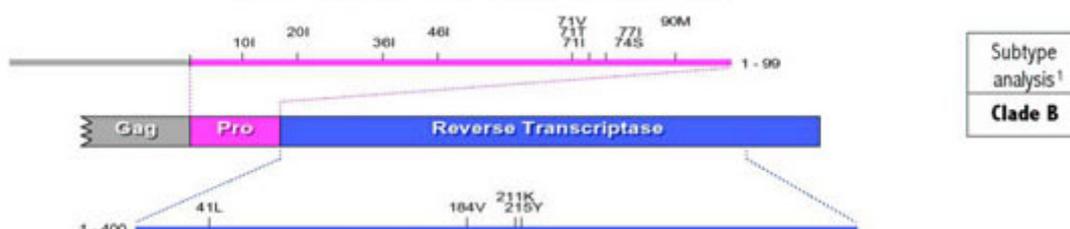
$$\text{FVSS-dual: } 0 + 1 + 1 = 2$$

VirtualPhenotype™

Genotype with quantitative phenotypic analysis

Patient/Sample Details		Test Details		Physician Details	
Patient Name	PATIENT_LAST_NAME, FIRST	Sample Type	SAMPLE	Hospital X	
Subject ID	SUBJECT ID	Collection Date	Feb 24, 2002 10:31	Address	
Sample ID	SAMPLE ID	Receipt Date	Feb 24, 2002	City ZIP	
Patient ID	PATIENT_ID	Session	SESSION	State	
Birth Date	Apr 4, 1980	Report Date	Mar 1, 2002	Physician/Site Code	
Gender	X	Virco ID	VIRCO ID	Project	
		Lab ID			

Resistance-associated mutations identified:



Drug	Trade name	Generic name	Matches in database	Proportion of matched samples:			Fold change in IC ₅₀ (Cut-off for normal susceptible range)	Ref.
				within normal susceptible range ²	above normal susceptible range ²	above normal susceptible range but below clinical cut-off ^{2, 3, 4}		
				25	50	75 (%)		
NRTI								
	Retrovir®	Zidovudine	2,600				4.0 (4.0)	
	Epivir®	Lamivudine	3,396				48.1 (4.5)	
	Videx®	Didanosine	2,092				1.4 (2.0)	
	Hivid®	Zalcitabine	1,524				1.7 (2.0)	
	Zerit®	Stavudine	3,220				1.0 (1.75)	
	Zagen®	Abacavir	1,083				2.6 (3.0)	
NtRTI								
	Viread™	Tenofovir DF	1,094				1.3 (3.0)	4
NNRTI								
	Viramune®	Nevirapine	12,574				1.4 (8.0)	
	Rescriptor®	Delavirdine	11,723				1.6 (10.0)	
	Sustiva®, Stocrin®	Efavirenz	11,517				1.1 (6.0)	
PI								
	Crixivan®	Indinavir	1,671				9.3 (3.0)	
	Norvir®	Ritonavir	1,783				10.8 (3.5)	
	Viracept®	Nelfinavir	2,050				24.1 (4.0)	
	Invirase®, Fortovase®	Saquinavir	1,975				4.9 (2.5)	
	Agenerase®	Amprenavir	1,689				2.3 (2.0)	
	A component of Kaletra®	Lopinavir	1,026				2.5 (2.5)	3

Version 3.5.0
Copyright Virco NV 2001. All rights reserved.

Figura 3.8. Informe de Fenotipo Virtual.

▪ **Ejemplo práctico sobre el cálculo del score del tratamiento:**

Paciente VIH+ en situación de fracaso terapéutico al que se realizó genotipado de VIH, en el que se detectaron las siguientes mutaciones:

- Mutaciones de resistencia a ITIAN: M41L, D67N, L74V, M184V, L210W, T215Y, Q219E.
- Mutaciones de resistencia a ITINAN: A98S, K103N, V108I.
- Mutaciones de resistencia a IP: L10I, L24I, M36I, M46I, A71V, V82T, I84V.

En función de la interpretación del genotipo realizada en su Centro de Referencia se instauró un tratamiento, compuesto por ddl, TDF y LPV/RTV.

En nuestro centro se reinterpretó el genotipo según los seis algoritmos a valorar, cuatro de ellos genotípicos (GSS) y dos fenotípicos (FVSS), generándose 6 scores, que indican el número de fármacos activos en el régimen según la predicción realizada por cada algoritmo. En la tabla siguiente se muestra la interpretación realizada mediante los seis algoritmos, tanto por fármacos sueltos como por tratamiento completo.

Algoritmo	ddl	TDF	LPV	Total (ddl+TDF+LPV)
GSS-Andalucía	0	0	0	0
GSS-ANRS-DTL	0	0,5	0,5	1
GSS-Andalucía-DTL	0	0,5	0	0,5
GSS-Visible Genetics	0	0,5	0	0,5
FVSS-continuo	0,1	0,60	0,17	0,87
FVSS-dual	0	1	0	1,00

0= "Resistencia"; 0,5= "Actividad disminuida" / "Posible resistencia" / "Resistencia parcial"; 1= "Sensibilidad" / "No evidencia de resistencia".

3.2.3.2. Capacidad de los algoritmos para predecir la respuesta virológica.

Tanto a nivel basal como a los 3 y/o 6 meses del inicio del tratamiento se realizaron determinaciones de la CV. En base a estos valores se definieron 4 tipos de respuesta:

- Variación de logaritmo de la carga viral a los 3 meses con respecto al nivel basal ($\Delta\log CV_{3m}$).
- Variación de logaritmo de la carga viral a los 6 meses con respecto al nivel basal ($\Delta\log CV_{6m}$).
- Supresión o no de la carga viral (CV indetectable/detectable) a los 3 meses (CVind3m).
- Supresión o no de la carga viral (CV indetectable/detectable) a los 6 meses (CVind6m).

La metodología estadística seguida para estudiar la capacidad de predicción de estas respuestas por los algoritmos se detallará a continuación, en el apartado 3.4. El mismo procedimiento seguido en el conjunto de los pacientes se repitió a continuación en subgrupos formados por pacientes que incluyeron en su tratamiento:

- ddl, TDF y/o LPV/RTV.
- ddl.
- TDF.
- LPV/RTV.

De esta manera se pretendía determinar si la capacidad de predicción de los algoritmos mejoraba en alguno(s) de estos grupos. Por ejemplo, si un algoritmo mejora su capacidad de predicción de la respuesta en el subgrupo tratado con ddl, TDF y/o LPV/RTV y más aún en el subgrupo tratado con TDF, podemos suponer que la interpretación de la resistencia a TDF mediante dicho algoritmo es mejor que en los demás.

3.2.4. Metodología estadística.

El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo mediante la prueba U de Mann-Whitney, el test exacto de Fisher y regresión lineal y logística univariante y multivariante (paquete estadístico SPSS, versión 14.0).

3.2.4.1. Metodología estadística para determinar la capacidad de predicción de la variación del logaritmo de carga viral a los 3 y 6 meses del inicio del tratamiento por los algoritmos.

La asociación entre la puntuación o *score* otorgada al nuevo tratamiento por cada algoritmo y la respuesta virológica $\Delta\log CV_{3m}$ y $\Delta\log CV_{6m}$ (diferencia entre el logaritmo de la CV a nivel basal y a los 3 y/o 6 meses), se realizó mediante **análisis univariante** por **regresión lineal**. Se consideró que la capacidad de predicción del algoritmo era estadísticamente significativa cuando el valor de $p < 0,05$. En los algoritmos que cumplieron este criterio, el coeficiente de determinación, R^2 , indicaba el porcentaje de la varianza de la respuesta explicado por cada uno.

La **asociación entre otras variables** y las distintas respuestas se valoró en primer lugar con un análisis univariante (**tabla 3.12**), mediante regresión lineal para las variables cuantitativas o mediante la prueba de la U de Mann-Whitney para variables dicotómicas.

Con el fin de investigar la capacidad de cada algoritmo para predecir cada respuesta de predicción con independencia de otras variables se realizó a continuación un **análisis multivariante** con los algoritmos y variables cuya p fue $\leq 0,20$ en el análisis univariante; de esta manera evitamos perder alguna variable o algoritmo que podría ser potencialmente relevante. Entre las *variables relativas al nuevo tratamiento* se realizó un subanálisis multivariante mediante regresión lineal múltiple y se seleccionó la variable con menor valor de p en el modelo con el fin de evitar la colinealidad entre variables similares, que podría conducir a modelos inestables. En cuanto a las *variables relativas a mutaciones de la RT y la PR*, no fueron incluidas en el posterior análisis multivariante, pues su efecto ya es valorado por los algoritmos.

Tabla 3.12: Variables cuya influencia en la respuesta virológica se ha evaluado.	
Edad	
Sexo	
Número de fracasos virológicos previos (≤ 2 fracasos / > 2 fracasos)	
Adherencia ($>80\%$ / $<80\%$)	
$\text{Log}_{10} \text{CV}_{\text{basal}}$	
Número de $\text{CD4}_{\text{basal}}$ /ml	
Variables relativas a mutaciones de la RT	Número de mutaciones de resistencia en la RT
	Número de mutaciones de resistencia a ITIANs
	Número de mutaciones de resistencia a ITINANs
	Número de mutaciones de resistencia a análogos de la timidina (TAMs)
	Número de mutaciones de M41L, L210W y T215Y
	Número de mutaciones de K70R, T215F y Q219E
Variables relativas a mutaciones de la PR	Número de mutaciones de resistencia en la PR
	Número de mutaciones de resistencia a múltiples IPs
	Número de mutaciones de L33I, V82A/F/T/S, I84V y L90M
Variables relativas al nuevo tratamiento	Número de fármacos.
	Número de fármacos nuevos
	Número de familias nuevas (ITIANs, ITINANs, IPs, Inhibidores de la fusión)
	Número de ITIANs
	Presencia de ITINANs (si/no)
	Presencia de IPs (si/no)
Número de familias previas	

El **análisis multivariante** con los algoritmos y variables seleccionados se realizó mediante **regresión lineal múltiple**, siguiendo el método “**pasos sucesivos**”, que consiste en ir añadiendo al modelo cada variable cuando su aporte al mismo es significativo, $p \leq 0,05$, hasta que no se encuentra ninguna más que aporte algo al modelo; cada vez que se introduce una variable nueva en un paso se chequean de nuevo todas las demás y si alguna da un valor de $p \geq 0,10$ es eliminada del modelo. Este proceso lo hace automáticamente el programa estadístico SPSS, una vez introducidas las variables y seleccionado el método a seguir. Finalmente el programa muestra el modelo final, con las variables que han entrado en cada paso, el valor de R^2 o porcentaje de la varianza de la respuesta que el modelo es capaz de explicar y los coeficientes y significación de las variables incluidas en el modelo en cada paso.

En las tablas siguientes podemos ver un **ejemplo** del proceso seguido. En la **tabla 3.13** se observa que el *score 1* es la primera variable que entra en el modelo, pero en los pasos siguientes se añaden otras dos más que cumplen las condiciones. En la **tabla 3.14** vemos que el *score 1* por sí solo explica el 12,2% de la varianza de la respuesta $\Delta\log CV3m$ (R^2 en el paso 1), pero junto con las variables *x* e *y* el modelo mejora hasta explicar el 18,0% de la respuesta (R^2 en el paso 3). Finalmente, en la **tabla 3.15** se muestran los coeficientes de cada variable, observándose que el *score 1* y la variable *y* se asocian influyen positivamente sobre la respuesta, de forma que, por cada unidad que aumenta el *score* o la variable *y*, $\Delta\log CV3m$ aumenta en 0,082 y 0,346 unidades, respectivamente; sin embargo, la variable *x* tiene un efecto negativo sobre la respuesta ya que, cuando *x* aumenta en una unidad, $\Delta\log CV3m$ disminuye en 0,074. Esta influencia es independiente de las demás variables, cuyo efecto ya ha sido descontado. Si un algoritmo (o cualquier otra variable) no entra en el modelo significa que, una vez descontando el efecto de las variables introducidas, no está asociado con $\Delta\log CV3m$ o, expresado de otra forma, que no es capaz de predecir esta respuesta con independencia de las demás variables.

Tabla 3.13. Variables introducidas/eliminadas(a)

Modelo	Variables introducidas	Variables eliminadas	Método
1	Score 1	.	Por pasos (criterio: Prob. de F para entrar $\leq 0,050$, Prob. de F para salir $\geq 0,100$).
2	Variable <i>x</i>	.	Por pasos (criterio: Prob. de F para entrar $\leq 0,050$, Prob. de F para salir $\geq 0,100$).
3	Variable <i>y</i>	.	Por pasos (criterio: Prob. de F para entrar $\leq 0,050$, Prob. de F para salir $\geq 0,100$).

a Variable dependiente: $\Delta\log CV3 m$

Tabla 3.14. Resumen del modelo

Modelo	R	R^2	R^2 corregida	Error típico de la estimación
1	,349(a)	,122	,117	1,07349
2	,400(b)	,160	,150	1,05298
3	,424(c)	,180	,166	1,04334

a Variables predictoras: (Constante), **score**

b Variables predictoras: (Constante), **score**, variable *x*

c Variables predictoras: (Constante), **score**, variable *x*, variable *y*

Tabla 3.15. Coeficientes(a)

Modelo		Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados	t	Sig.
		B	Error típ.	Beta		
1	(Constante)	,347	,179		1,935	,055
	score	,099	,019	,374	5,258	,000
2	(Constante)	,791	,245		3,227	,002
	score	,086	,019	,325	4,494	,000
	Variable x	-,074	,029	-,189	-2,607	,010
3	(Constante)	,630	,254		2,485	,014
	score	,082	,019	,310	4,301	,000
	Variable x	-,074	,028	-,187	-2,612	,010
	Variable y	,346	,160	,151	2,168	,032

a Variable dependiente: diferencia log CV b-3 m

3.2.4.2. Metodología estadística para determinar la capacidad de predicción de la supresión de la CV a los 3 y 6 meses del inicio del tratamiento por los algoritmos.

Además de la diferencia de CV a los 3 y 6 meses del inicio del tratamiento ($\Delta\log CV_{3m}$, $\Delta\log CV_{6m}$) se empleó otro tipo de medida de la respuesta virológica: en los mismos periodos de tiempo se observó si el paciente conseguía o no unos niveles de CV indetectable, es decir, por debajo del límite de sensibilidad de la técnica (CVind3, CVind6). Como estas respuestas son variables dicotómicas (CV indetectable: si/no) la metodología estadística a seguir fue diferente que en el caso anterior.

En primer lugar se realizó un **análisis univariante** mediante **regresión logística**, con el objeto de determinar la probabilidad de conseguir carga viral indetectable a los 3/6 meses del inicio del nuevo tratamiento (CVind3m, CVind6m) en función de la puntuación (*score*) otorgada al nuevo tratamiento por cada algoritmo. Cuando existe una asociación significativa entre un algoritmo y la respuesta ($p < 0,05$) el valor de la odds-ratio (Exp(B) en SPSS) nos indica cuánto aumenta o disminuye la probabilidad de alcanzar CV indetectable por cada unidad que aumenta dicha puntuación.

La **asociación entre otras variables (tabla 3.12)** y las distintas respuestas se valoró en primer lugar con un análisis univariante (**tabla 3.12**), mediante la prueba exacta de Fisher para las variables dicotómicas o la prueba de la U de Mann-Whitney para variables cuantitativas.

Con el fin de investigar la capacidad de cada algoritmo para predecir cada respuesta de predicción con independencia de otras variables se realizó a continuación un **análisis multivariante** con los algoritmos y variables cuya p fue $\leq 0,20$ en el análisis univariante, de esta manera evitamos perder alguna variable o algoritmo potencialmente relevante. Entre las *variables relativas al nuevo tratamiento* se realizó un subanálisis multivariante mediante regresión logística y se seleccionó la variable con menor valor de p en el modelo, con el fin de evitar la colinealidad entre variables similares, que podría conducir a modelos inestables. En cuanto a las *variables relativas a mutaciones de la RT y la PR*, no fueron incluidas en el posterior análisis multivariante, pues su efecto ya es valorado por los algoritmos.

El procedimiento seguido para realizar el **análisis multivariante** fue **regresión logística** por el método **adelante (condicional)**, similar al “por pasos” descrito en el apartado 3.4.1 y con las mismas condiciones de entrada y salida de las variables en el modelo. Un ejemplo del modelo construido de esta manera se muestra en la **tabla 3.16**. Observamos que en el modelo han entrado dos de las variables, el *score 1* y la variable x , las cuales son capaces de predecir la respuesta independientemente del resto de las variables ($p = 0,002$ y $0,015$, respectivamente). Se observa asimismo que la variable x influye negativamente sobre la posibilidad de lograr CV indetectable, puesto que $\text{Exp}(B)$ o, lo que es igual, la odds ratio es menor de 1, mientras que el *score 1* tiene una influencia positiva sobre la respuesta: al aumentar en una unidad la puntuación que el algoritmo da al tratamiento, aumenta 1,607 veces la posibilidad de alcanzar CV indetectable.

Tabla 3.16. Variables en la ecuación

	B	E.T.	Wald	gl	Sig.	Exp(B)	I.C. 95% para EXP(B)	
							Inferior	Superior
Paso 1(a) Variable x	-1,204	,364	10,958	1	,001	,300	,147	,612
Constante	,236	,244	,937	1	,333	1,267		
Paso 2(b) Variable x	-1,149	,372	9,523	1	,002	,317	,153	,658
Score 1	,474	,196	5,872	1	,015	1,607	1,095	2,359
Constante	-,768	,483	2,536	1	,111	,464		

a Variable(s) introducida(s) en el paso 1: variable x .

b Variable(s) introducida(s) en el paso 2: **score**.

4. RESULTADOS

4.1. CARACTERÍSTICAS BASALES DE LOS PACIENTES.

Las características epidemiológicas y clínicas de los pacientes con los que se ha realizado este trabajo de investigación se describen en la **tabla 4.1**. Fueron 234 pacientes, en su mayoría varones, con una media de 40 años, un historial de al menos un fracaso terapéutico y una CV basal media de 4 logaritmos. La media de linfocitos CD4+/mm³ fue de 354 en los 168 pacientes con datos disponibles.

Tabla 4.1. Características basales de los pacientes (N=234)		
Edad (años)		40,29 ± 7,649.
Sexo	Varón	187 (79,9%)
	Mujer	47 (20,1%)
Nº fracasos previos (N= 226)	1 fracaso	43 (19,1%)
	2 fracasos	79 (34,9%)
	>2 fracasos	104 (46,0%)
Nº CD4+ basal/ml (N=168)		351 ± 232
Carga Viral basal (log₁₀ nº copias/ml)		4,09 ± 0,78
Líneas de tratamiento (N=75)	> 5	38 (50,7%)
	≤ 5	37 (49,3%)
Nº de familias de fármacos administradas con anterioridad		2,29 ± 0,628

4.2. PREVALENCIA DE MUTACIONES DE RESISTENCIA EN RT Y PR.

Ninguna de las 234 cepas a las que se realizó genotipado fue *wild-type*; por el contrario, todas ellas presentaron alguna mutación en la RT (0-11; mediana = 4) y/o en la PR (0-11; mediana = 5). Únicamente un 0,9% (n=2) de las cepas carecía de mutaciones en la RT y un 9,8% (n=23) en la PR (**figura 4.1 y tabla 4.2(a)**).

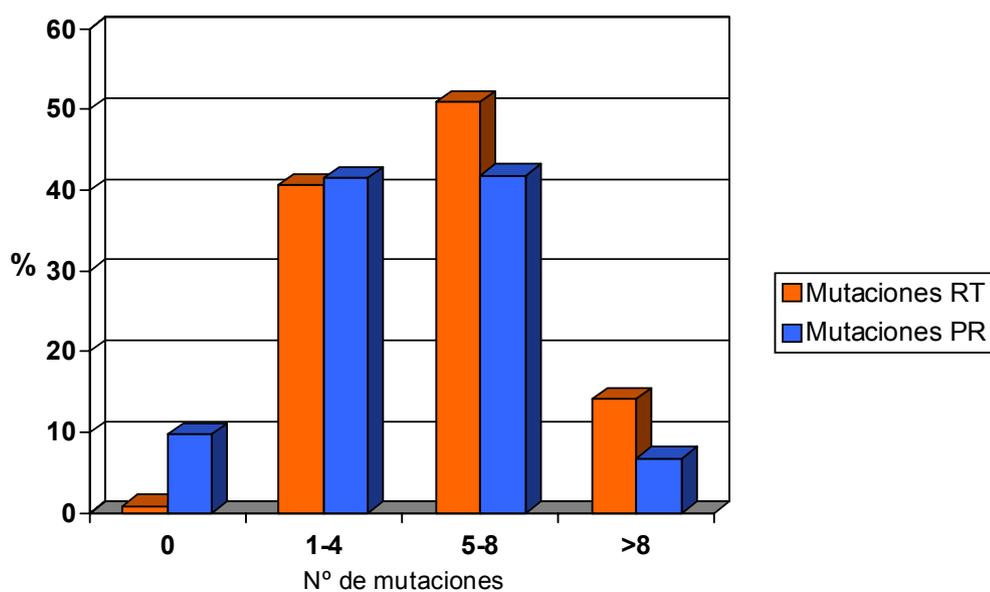


Figura 4.1. Distribución del número de mutaciones en la RT y PR en el total de genotipos realizados (N=234).

Nº Mutaciones	N (%)	
	RT	PR
0	2 (0,9)	23 (9,8)
1	12 (5,1)	27 (11,5)
2	17 (7,3)	24 (10,3)
3	31 (13,2)	21 (9,0)
4	35 (15,0)	25 (10,7)
5	37 (15,8)	18 (7,7)
6	35 (15,0)	30 (12,8)
7	32 (13,7)	30 (12,8)
8	15 (6,4)	20 (8,5)
9	7 (3,0)	10 (4,3)
10	10 (4,3)	5 (2,1)
11	1 (0,4)	1 (0,4)

La **tabla 4.2(b)** muestra que cerca del 90% de los pacientes presentaron 3 o más mutaciones en la RT (sombreados en gris) y, de estos, alrededor de la mitad (en **negrita**) tenía 5 o más mutaciones en la PR.

Tabla 4.2(b). Prevalencia de mutaciones en la RT para cada rango de mutaciones en la PR						
		Prevalencia mutaciones PR N (%)				Total N (%)
		0	1-4	5-8	>8	
Prevalencia mutaciones RT N (%)	0	-	2 (0,9)	-	-	2 (0,9)
	1	1 (0,4)	5 (2,1)	5 (2,1)	1 (0,4)	12 (5,1)
	2	-	9 (3,8)	7 (3,0)	1 (0,4)	17 (7,3)
	3	1 (0,4)	16 (6,8)	13 (5,6)	1 (0,4)	31 (13,2)
	4	8 (3,4)	13 (5,6)	12 (5,1)	2 (0,9)	35 (15,0)
	>4	13 (5,6)	52 (22,2)	61 (26,0)	11 (4,7)	137 (58,5)
Total N (%)		23 (9,8)	97 (41,5)	98 (41,8)	16 (6,8)	234 (100)

Como se observa en las **figuras 4.2 y 4.3**, las mutaciones más prevalentes en la RT fueron T215Y/F (69,2%), M41L (57,3%), M184V/I (47,0%), D67N (41,9%) y K103N (41,9%), mientras que las mutaciones primarias con una prevalencia superior al 10% en la PR fueron L90M (49,1%), M46I/L (35,5%), V82 A/F/T/S (27,8%), I54L/M/T/V (26,5%) e I84V/A/C (17,5%).

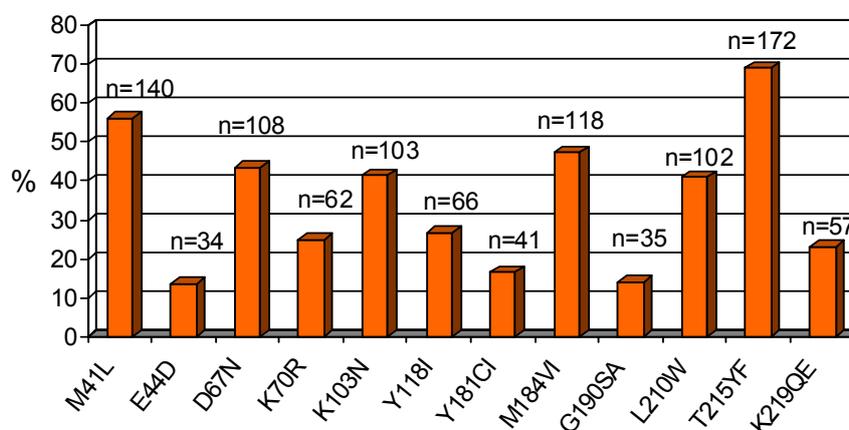


Figura 4.2: Mutaciones de la RT con prevalencia superior al 10 %.

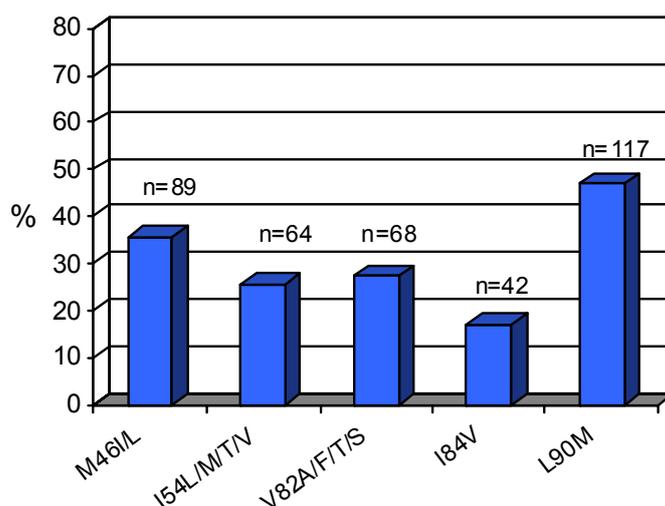


Figura 4.3: Mutaciones primarias de la PR con prevalencia superior al 10%.

En la **tabla 4.3** se muestra el número de TAMs (mutaciones M41L, D67N, K70R, L210W, T215Y/F y Q219E), así como las mutaciones específicas de cada una de las rutas de TAMs.

	Media	Rango
Nº de TAMs	2	0-6
Nº TAMs tipo 1 (41-210-215)	1	0-3
Nº TAMs tipo 2 (70-215-219)	0	0-3

En las **tablas 4.4, 4.5 y 4.6** se pueden observar las mutaciones de resistencia a ITIANs, ITINANs e IPs más frecuentemente detectadas (>10%), referidas tanto al total de pacientes como al número de fracasos terapéuticos previos (variable ésta recogida en 226 de los 234 pacientes). La mutación Q151M y la inserción en el codón 69 sólo se detectaron en un 2% (n=5) y 0,8% (n=2) de los casos, respectivamente. Mientras que las mutaciones de resistencia a ITINAN no variaron significativamente en relación al número de fracasos terapéuticos (tabla 4.5), sí lo hicieron las de ITIAN (tabla 4.4) e IPs (tabla 4.6): así, se observó un incremento de M41L, V118I y L210W en la RT y de L10FIRV, I54LMTVS, V82AFTS, I84V y L90M

en la PR, significativamente asociado con el número de fracasos previos, así como un descenso significativo de K70R y M184VI en la RT.

Tabla 4.4. Prevalencia de mutaciones de resistencia a ITIAN (>10%) según el tipo de fracaso.									
	TOTAL (N=234)		1 ^{er} FRACASO (N=43)		2 ^o FRACASO (N=79)		MULTIFRACASO (N=104)		p*
	N	%	N	%	N	%	N	%	
M41L	134	57,3	18	42,9	43	52,3	69	65,7	0,034
E44D	32	13,7	1	2,3	14	17,7	16	15,4	n.s.
D67N	98	41,9	20	46,5	32	40,5	45	43,3	n.s.
K70R	54	23,1	17	39,5	21	26,6	15	14,4	0,009
V118I	64	27,4	4	9,3	23	29,1	34	32,7	0,010
M184VI	110	47,0	27	62,8	38	48,1	41	39,4	0,049
L210W	97	41,5	11	25,6	31	39,2	52	50,0	0,028
T215YF	162	69,2	27	62,8	52	65,8	79	76,0	n.s.
K219QE	51	21,8	10	23,3	19	24,1	22	21,2	n.s.

(*) Prueba de chi-cuadrado.

Tabla 4.5. Prevalencia de mutaciones de resistencia a ITINAN (>10%) según n° fracasos.									
	TOTAL (N=234)		1 ^{er} FRACASO (N=43)		2 ^o FRACASO (N=79)		MULTIFRACASO (N=104)		p*
	N	%	N	%	N	%	N	%	
A98GS	25	10,6	3	7,0	6	7,6	15	14,4	n.s.
K103N	98	41,9	13	30,3	33	41,8	49	47,1	n.s.
V108I	24	10,3	5	11,6	10	12,7	8	7,7	n.s.
Y181CI	36	15,4	2	4,7	13	16,5	21	20,2	n.s.
G190SA	38	16,2	4	9,3	11	13,9	18	17,3	n.s.

(*) Prueba de chi-cuadrado.

Tabla 4.6. Prevalencia de mutaciones de resistencia a IPs (>10%) según n° fracasos									
	TOTAL (N=234)		1 ^{er} FRACASO (N=43)		2 ^o FRACASO (N=79)		MULTIFRACASO (N=104)		p*
	N	%	N	%	N	%	N	%	
L10FIRV	116	49,6	13	30,2	38	48,1	62	59,6	0,009
K20MRTIV	48	20,6	3	7,0	17	21,5	27	26,0	n.s.
M36I	80	34,2	10	23,3	27	34,2	41	39,4	n.s.
M46IL	83	35,5	9	20,9	29	36,7	44	42,3	n.s.
I54LMTVS	63	26,9	4	9,3	18	22,8	37	35,6	0,007
L63P	98	41,9	12	27,9	32	40,5	50	48,1	n.s.
A71VTIL	119	50,8	18	41,9	36	45,6	61	58,7	n.s.
G73SATC	42	17,9	8	18,6	15	19,0	17	16,3	n.s.
V77I	37	15,8	10	23,3	12	15,2	15	14,4	n.s.
V82AFTS	65	27,8	3	7,0	16	20,3	44	42,3	<0,001
I84V	41	17,5	-	-	13	16,5	28	26,9	0,002
L90M	115	49,1	11	25,6	43	54,4	56	53,8	0,006

(*) Prueba de chi-cuadrado.

Una vez descritas las mutaciones presentes en la población estudiada mediante las tablas y figuras anteriores, su interpretación mediante el algoritmo de la Universidad de Stanford (<http://hivdb.stanford.edu/>) permitió determinar el **número de fármacos activos (tabla 4.7)**, tanto totales como por familias. Hay que recordar, como se expuso en el apartado 4.2 de *Pacientes y Métodos*, que esta variable **no está referida a los fármacos del nuevo régimen**, sino a todos los antirretrovirales disponibles en el momento del estudio: así, se han considerado “fármacos activos” todos los antirretrovirales frente a los que no existiría **ningún grado de resistencia** según dicho algoritmo. La mitad de los pacientes eran sensibles al menos a 3 antirretrovirales pero cerca de la tercera parte de los pacientes (30,3%) presentaban algún grado de resistencia a todos ellos. En cuanto a las distintas familias de fármacos, se observó alrededor de un 40% de pacientes susceptibles al menos a un ITIAN y cerca del 35% al menos a un ITINAN o a un IP.

Tabla 4.7. N° de fármacos activos según algoritmo de Universidad de Stanford.				
	N° fármacos activos	N° ITIAN activos	N° ITINAN activos	N° IP activos
	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)
0	71 (30,3)	140 (59,8)	153 (65,4)	156 (66,7)
1	22 (9,4)	53 (22,6)	3 (1,3)	2 (0,9)
2	28 (12,0)	4 (1,7)	78 (33,3)	2 (0,9)
3	19(8,1)	12 (5,1)	-	6 (2,6)
4	8 (3,4)	18 (7,7)	-	-
5	3 (1,3)	-	-	4 (1,7)
6	28 (12,0)	7 (3,0)	-	64 (27,4)
>7	55 (23,5)	-	-	-
Mediana (IC)	2 (0-6)	0 (0-1)	0 (0-2)	0 (0-6)

Cuando se estudió la relación entre el número de fracasos terapéuticos previos y el número de fármacos activos (**tabla 4.8**) se observó que el número de pacientes con al menos 3 fármacos activos disminuía de forma estadísticamente significativa ($p < 0,001$) conforme aumentaba el número de fracasos.

Tabla 4.8. Número de fármacos activos (según algoritmo de Stanford) en función del número de fracasos terapéuticos previos ($p < 0,001$).			
N° fármacos activos	1 fracaso (N=43)	2 fracasos (N=79)	>2 fracasos (N=104)
0-2	9 (20,9%)	40 (50,6%)	70 (67,3%)
≥ 3	34 (79,1%)	39 (49,4%)	34 (32,7%)

4.3. CARACTERÍSTICAS DE LOS TRATAMIENTOS ANTIRRETROVIRALES ADMINISTRADOS TRAS EL ESTUDIO DE RESISTENCIAS.

Una vez realizado el estudio de resistencias se modificó el tratamiento de la mayor parte de los pacientes (89%) incluyendo uno o más fármacos no administrados previamente, generalmente 2 (41%). Los nuevos tratamientos estuvieron constituidos en su mayoría (85,9%) por 3 antirretrovirales, aunque en algunos casos se administraron 2, 4 o hasta 5, pertenecientes generalmente a 2 familias diferentes (81,5%). En poco más de la mitad de los tratamientos (58,7%) se introdujeron fármacos pertenecientes a familias con las cuales el paciente no había sido tratado previamente (**tabla 4.9**).

Tabla 4.9. Características del tratamiento administrado tras el estudio de resistencias	
Nº ITIAN: Mediana: 2. Rango: 1-4 ITINAN: 21,8% IP: 76,5% Inhibidores de la fusión: 2,0%	
Nº Fármacos: Mediana: 3. 2.....1,3% 3..... 85,9% 4.....11,1% 5.....1,7%	Nº Fármacos nuevos: Mediana: 2. 0.....10,7% 1.....18,4% 2.....41,0% 3.....26,9% 4.....1,7%
Nº Familias: Mediana: 2. 1.....9,4% 2.....81,2% 3.....9,0% 4.....0,4%	Nº Familias nuevas: Mediana: 1. 0.....42,7% 1..... 43,5% 2.....13,4% 3.....0,4%

Como se muestra en las **figuras 4.4, 4.5 y 4.6**, en todos los nuevos tratamientos se incluyó algún ITIAN, generalmente 2 (75,5%). En cuanto a los ITINANs e IPs, se administraron en alrededor del 20% y el 75% de éstos, respectivamente.

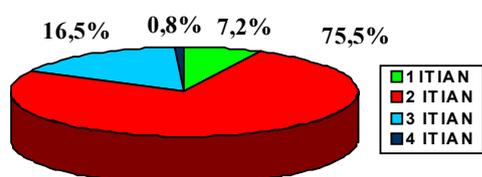


Fig. 4.4. N° de ITIAN en el nuevo tratamiento.

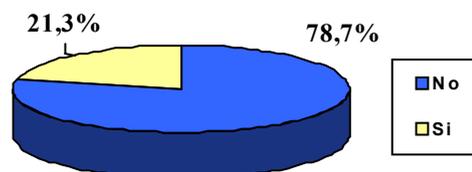


Fig. 4.5. Presencia de ITINAN en el nuevo tratamiento.

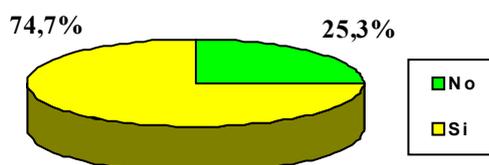


Fig. 4.6. Presencia de IP en el nuevo tratamiento.

En la **tabla 4.10** se muestra la prevalencia de los diferentes antirretrovirales en los nuevos regímenes: ddi, TDF y LPV fueron los fármacos más utilizados, administrándose cada uno de ellos en más de la mitad de los pacientes.

ITIAN (%)		ITINAN (%)		IP (%)		Inhibidores de la fusión (%)	
AZT	12,9	EFV	16,1	IDV	1,6	ENF	2,0
3TC	24,9	NVP	5,6	NFV	6,4		
D4T	31,7	ETV	0,4	SQV	6,0		
ddl	55,0			LPV/RTV	54,2		
ABC	20,5			APV	7,6		
TDF	65,9			ATZ	1,6		

Tabla 4.10. Prevalencia de los fármacos antirretrovirales presentes en los tratamientos de rescate.

4.4. RESPUESTA TRAS EL CAMBIO DE TRATAMIENTO.

▪ Respuesta inmunológica. Adherencia al tratamiento.

En la **tabla 4.11** se muestra la respuesta **inmunológica** observada a los 3 y 6 meses del inicio del nuevo tratamiento, expresada en función del recuento de linfocitos CD4+. El aumento de la media de linfocitos CD4 con respecto a su valor basal (351 CD4/mm^3 ; ver tabla 4.1) fue superior a mayor periodo de seguimiento, incrementando en 22 CD4/mm^3 a los 3 meses de tratamiento y en 44 CD4/mm^3 a los 6 meses, y aproximándose a 400 CD4/mm^3 .

En la misma tabla se muestra también el grado de **adherencia** al tratamiento: en la mayor parte de los 176 pacientes con adherencia conocida, ésta fue superior al 80%.

Tabla 4.11. Respuesta inmunológica y adherencia		
N° CD4+/mm³ (media ± DS)	3 meses (N=219)	373 ± 238
	Δ media CD4 3 meses-basal	22
	6 meses (N=163)	395 ± 271
	Δ media CD4 6 meses	44
Adherencia (N=176)	>80%	138 (78,4%)
	<80%	38 (21,6%)
Carga Viral (log ₁₀ copias / ml)	3 meses (N=227)	2,89 ± 1,20
	Δ media CV 3 meses	1,2
	6 meses (N=170)	2,89 ± 1,27
	Δ media CV 6 meses	1,2

▪ Respuesta virológica.

Según se observa en la tabla 4.11, el descenso medio del log CV a los 3 y 6 meses del inicio del nuevo tratamiento, con respecto al nivel basal (4,09 log, ver tabla 4.1), fue igual (1,2 log). En la **figura 4.7** se observa que de los 227 pacientes en los que se determinó la CV a los 3 meses de iniciar el tratamiento, un 58% alcanzó un descenso de al menos 1 logaritmo en este periodo y en el 38 % la CV fue inferior al límite de sensibilidad de la técnica (CV indetectable). Por otra parte, y como se deduce de la **figura 4.8**, los datos de CV a los 6 meses, disponibles en 170 pacientes, indican que en un 57% de ellos la CV descendió en, al menos, 1 logaritmo en dicho periodo y que en un 45% de los pacientes la CV fue indetectable.

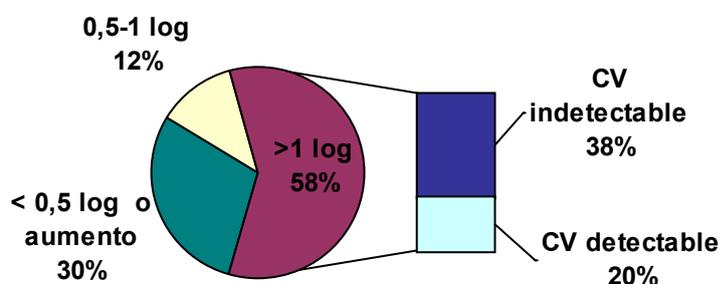


Figura 4.7. Respuesta virológica a los 3 meses
(log CV basal-log CV 3m; N=227)

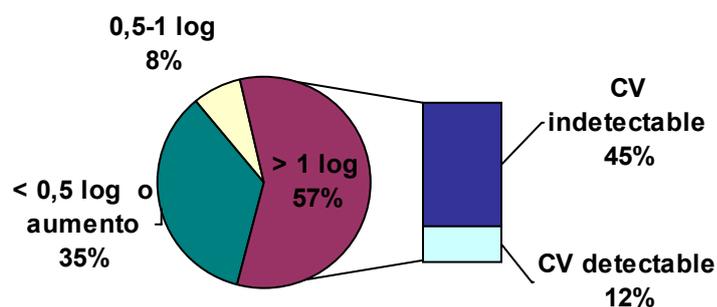


Figura 4.8. Respuesta virológica a los 6 meses
(log CV basal-log CV 6m; N=170)

En 163 pacientes se dispuso de los datos de CV tanto a los 3 como a los 6 meses del inicio del nuevo tratamiento. De los 98 pacientes que habían conseguido un $\Delta\log CV_{3m} \geq 1$ log, un 84,7% mantuvo esta respuesta a los 6 meses; sin embargo, entre los 44 pacientes que a los 3 meses habían mostrado un descenso en su CV inferior a 0,5 log o un aumento de ésta, sólo 7 (15,9%) lograron un descenso de CV ≥ 1 log a los 6 meses (**figura 4.9**).

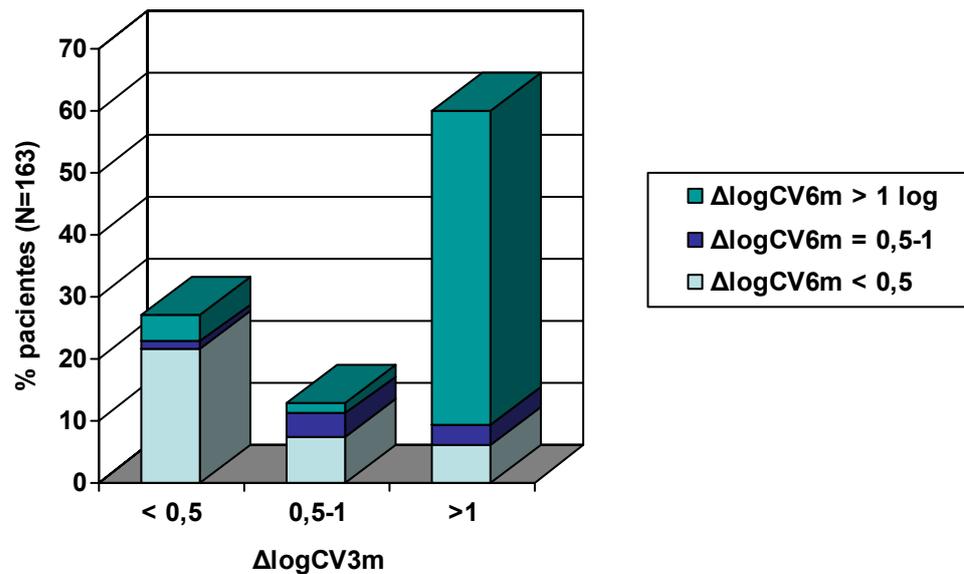


Figura 4.9. Respuesta virológica a los 3 meses del inicio del tratamiento ($\Delta\log CV_{3m}$). Las divisiones de las barras muestran el porcentaje de respuesta a los 6 meses ($\Delta\log CV_{6m}$).

4.5. CAPACIDAD DE LOS MODELOS PARA PREDECIR LA RESPUESTA VIROLOGICA EN LA TOTALIDAD DE LOS PACIENTES.

El número de fármacos activos en el nuevo régimen terapéutico, calculado en función de los GSS y FVSS de los distintos algoritmos de interpretación de la resistencia estudiados se muestra en la **tabla 4.12**. La media osciló entre 1,78 (algoritmo de Visible Genetics) y 2,40 (interpretación dual del Fenotipo Virtual). En cuatro de los pacientes no se dispuso de informe del Fenotipo Virtual.

Tabla 4.12. Características descriptivas de los algoritmos evaluados.			
	N	Media ± Desv. típica	Rango
GSS- Andalucía	234	2,09 ± 1,01	0,0 - 4,0
GSS-ANRS-DTL	234	2,17 ± 0,89	0,0 - 4,0
GSS- Andalucía-DTL	234	2,08 ± 0,97	0,0 - 4,0
GSS-Visible Genetics	230	1,78 ± 0,86	0,0 - 3,5
FVSS continuo	230	2,08 ± 0,64	0,05 - 3,71
FVSS dual	230	2,40 ± 0,79	0,0 - 4,0

4.5.1. Capacidad de predicción de la respuesta virológica por los distintos modelos (análisis univariante).

El resultado del **análisis univariante** realizado mediante regresión logística en relación a la asociación entre los distintos algoritmos y la supresión de la CV en los distintos puntos de corte se muestra en la **tabla 4.13**. El único algoritmo que fue capaz de predecir dicha respuesta a los 3 meses ($p < 0,05$) fue GSS-Andalucía-DTL, mientras que todos los modelos lo hicieron a los 6 meses, aunque fueron los algoritmos de Visible Genetics y Andalucía-DTL los que mostraron una mayor correlación con esta respuesta.

Tabla 4.13. Análisis univariante para la asociación entre los distintos algoritmos y las respuestas CVind3m y CVind6m.		
ALGORITMOS	CVind3m	
	O.R. (I.C. 95%)	p
GSS-Andalucía	1,308 (0,991-1,725)	0,058
GSS-ANRS-DTL	1,275 (0,938-1,733)	0,121
GSS-Andalucía-DTL	1,552 (1,152-2,090)	0,004
GSS-VG	1,303 (0,944- 1,798)	0,107
FVSS-continuo	1,338 (0,872-2,052)	0,183
FVSS-dual	1,292 (0,908-1,839)	0,154
ALGORITMOS	CVind6m	
	O.R. (I.C. 95%)	p
GSS-Andalucía	1,608 (1,172-2,205)	0,003
GSS-ANRS-DTL	1,782 (1,237-2,566)	0,002
GSS-Andalucía-DTL	1,872 (1,330-2,634)	$3,2 \cdot 10^{-4}$
GSS-VG	2,208 (1,477-3,300)	$1,1 \cdot 10^{-4}$
FVSS-continuo	2,198 (1,296-3,726)	0,003
FVSS-dual	1,587 (1,058-2,381)	0,025

En la **tabla 4.14** se muestra el resultado del análisis univariante llevado a cabo mediante regresión lineal entre los distintos algoritmos y la variación del logaritmo de la CV a 3 y 6 meses ($\Delta\log CV3m$, $\Delta\log CV6m$). Se observa que todos los algoritmos genotípicos, excepto el de Visible Genetics, mostraron una asociación significativa ($p < 0,05$) con $\Delta\log CV3m$; sin embargo, ninguna de las dos interpretaciones del fenotipo virtual se relacionó significativamente con dicha respuesta. Por otro lado, sólo los algoritmos genotípicos fueron capaces de predecir de forma significativa la variación del logaritmo de la CV a los 6 meses. El algoritmo Andalucía-DTL mostró la mayor capacidad de predicción de ambas respuestas.

Tabla 4.14. Análisis univariante para la asociación entre los distintos algoritmos y las respuestas $\Delta\log CV3m$ y $\Delta\log CV6m$.					
$\Delta\log CV3m$					
ALGORITMOS	R²	B	Error típico	t	Sig.
GSS-Andalucía	0,026	0,188	0,077	2,431	0,016
GSS-ANRS-DTL	0,020	0,187	0,087	2,158	0,032
GSS-Andalucía-DTL	0,052	0,278	0,079	3,519	0,001
GSS-VG	0,011	0,148	0,092	1,600	0,111
FVSS-continuo	0,001	0,053	0,123	0,431	0,667
FVSS-dual	<0,001	-0,019	0,100	-0,191	0,849
$\Delta\log CV6m$					
ALGORITMOS	R²	B	Error típico	t	Sig.
GSS-Andalucía	0,041	0,252	0,092	2,741	0,007
GSS-ANRS-DTL	0,037	0,274	0,106	2,587	0,010
GSS-Andalucía-DTL	0,052	0,298	0,096	3,091	0,002
GSS-VG	0,043	0,312	0,112	2,786	0,006
FVSS-continuo	0,019	0,285	0,156	1,824	0,070
FVSS-dual	0,003	0,083	0,122	0,677	0,499

4.5.2. Análisis univariante (otras variables).

Los resultados de los análisis univariantes relativos a la asociación entre otras variables y las distintas respuestas se exponen en la **tabla 4.15**. Como ya se ha explicado en el apartado 3.4 de “*Pacientes y métodos*”, todas las variables con $p < 0,20$ (resaltadas en negrita) se incluyeron inicialmente en el análisis multivariante;

sin embargo, posteriormente se excluyeron de éste todas las *Variables relativas a mutaciones en la RT y en la PR*, puesto que su efecto ya era tenido en cuenta por los propios algoritmos. Por idéntica razón, la variable *Número de fármacos activos*, calculada en base a las mutaciones de la RT y PR tampoco fue incluida.

Tabla 4.15. Asociación estadística <i>p</i> entre las covariables y las distintas respuestas (análisis univariante). En negrita, variables con $p \leq 0,20$.				
	CVind3m	CVind6m	$\Delta\log CV3m$	$\Delta\log CV6m$
Edad	0,752	0,239	0,139	0,058
Sexo masculino	0,504	0,329	0,870	0,795
Adherencia >80%	0,802	0,127	0,774	0,062
$\log_{10} CV_{\text{basal}}$	$4,4 \cdot 10^{-4}$	0,024	$5,9 \cdot 10^{-6}$	$1,2 \cdot 10^{-4}$
Nº CD4 _{basal} /ml	0,073	0,449	0,618	0,199
Más de 2 fracasos terapéuticos	$2,9 \cdot 10^{-6}$	$1,4 \cdot 10^{-5}$	$2,8 \cdot 10^{-4}$	0,010
Nº familias previas	0,422	0,302	0,177	0,745
Nº fármacos activos	0,002	0,003	0,015	0,030
Variables relativas a mutaciones en la RT:				
Nº mutaciones RT	0,398	0,022	0,611	0,281
Nº mutaciones ITIAN	0,588	0,057	0,608	0,238
Nº mutaciones ITINAN	0,403	0,157	0,881	0,914
Nº TAMs	0,113	0,008	0,069	0,033
Nº M41L, L210W, T215Y	0,115	$1,9 \cdot 10^{-4}$	0,105	0,012
Nº K70R, T215F y Q219E	0,491	0,238	0,834	0,642
Variables relativas a mutaciones en la PR:				
Nº mutaciones PR	$3,4 \cdot 10^{-5}$	0,002	$2,3 \cdot 10^{-4}$	0,011
Nº mutaciones múltiples IP	$1,1 \cdot 10^{-4}$	0,002	0,003	0,012
Nº de L33I, V82A/F/T/S, I84V, L90M	0,001	0,010	$3,9 \cdot 10^{-4}$	0,048
Variables relativas al tratamiento:				
Nº fármacos	0,002	0,014	0,261	0,254
Nº fármacos nuevos	$5,4 \cdot 10^{-5}$	0,002	$1,1 \cdot 10^{-4}$	0,001
Nº familias nuevas	0,009	0,082	0,002	0,024
Nº ITIAN	0,002	0,010	0,007	0,037
Presencia de ITINAN	0,230	0,893	0,878	0,183
Presencia de IP	0,922	0,126	0,006	0,001

En cuanto a las *Variables relacionadas con el nuevo tratamiento*, no todas fueron incluidas en el análisis multivariante, sino que se seleccionó mediante distintos subanálisis multivariantes (**tablas 4.16 a 4.19**) la más estrechamente relacionada con cada una de las respuestas (menor valor de *p*), que fue en todos los casos la variable *Nº de fármacos nuevos*.

Variables en la ecuación		B	E.T.	Wald	gl	Sig.	Exp(B)
Paso 1(a)	Nº ITIAN	0,003	0,709	0,000	1	0,997	1,003
	Presencia ITINAN	0,417	0,712	0,343	1	0,558	1,517
	Presencia IP	0,435	0,733	0,351	1	0,553	1,544
	Nº familias nuevas	0,102	0,238	0,184	1	0,668	1,108
	Nº fármacos	-1,935	0,804	5,787	1	0,016	0,144
	Nº fármacos nuevos	0,701	0,189	13,687	1	0,000	2,015
	Constante	3,612	1,767	4,178	1	0,041	37,050

Tabla 4.16. Variables relacionadas con el nuevo tratamiento: subanálisis multivariante para seleccionar la variable más fuertemente relacionada con la respuesta CVind3m.

Variables en la ecuación		B	E.T.	Wald	gl	Sig.	Exp(B)
Paso 1(a)	Nº ITIAN	0,838	0,899	0,868	1	0,352	2,311
	Presencia ITINAN	1,105	0,923	1,434	1	0,231	3,019
	Presencia IP	1,702	0,949	3,220	1	0,073	5,486
	Nº familias nuevas	-0,017	0,277	0,004	1	0,952	0,983
	Nº fármacos	-1,963	0,924	4,514	1	0,034	0,140
	Nº fármacos nuevos	0,606	0,206	8,678	1	0,003	1,833
	Constante	1,411	1,471	0,920	1	0,338	4,100

Tabla 4.17. Variables relacionadas con el nuevo tratamiento: subanálisis multivariante para seleccionar la variable más fuertemente relacionada con la respuesta CVind6m.

Modelo	Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados	t	p
	B	Error típico	Beta		
1 (Constante)	1,132	0,622		1,819	0,070
Nº ITIAN	0,199	0,323	0,085	0,615	0,539
Presencia ITINAN	0,399	0,329	0,138	1,211	0,227
Presencia IP	0,863	0,338	0,312	2,554	0,011
Nº familias nuevas	0,154	0,125	0,092	1,232	0,219
Nº fármacos	-0,553	0,326	-0,189	-1,696	0,091
Nº fármacos nuevos	0,268	0,089	0,221	3,025	0,003

a Variable dependiente: $\Delta\log CV3m$.

Tabla 4.18. Variables relacionadas con el nuevo tratamiento: subanálisis multivariante para seleccionar la variable más fuertemente relacionada con la respuesta $\Delta\log CV3m$.

Modelo	Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados	t	p
	B	Error típico	Beta		
1 (Constante)	0,987	0,726		1,358	0,176
Nº ITIAN	0,283	0,422	0,122	0,672	0,503
Presencia ITINAN	0,270	0,437	0,090	0,617	0,538
Presencia IP	1,034	0,444	0,354	2,330	0,021
Nº familias nuevas	0,079	0,155	0,042	0,508	0,612
Nº fármacos	-0,617	0,402	-0,213	-1,533	0,127
Nº fármacos nuevos	0,306	0,109	0,229	2,811	0,006

a Variable dependiente: $\Delta\log CV6m$.

Tabla 4.19. Variables relacionadas con el nuevo tratamiento: subanálisis multivariante para seleccionar la variable más fuertemente relacionada con la respuesta $\Delta\log CV6m$.

4.5.3. Análisis multivariante.

La asociación entre los distintos algoritmos con $p \leq 0,20$ en el análisis univariante y cada una de las respuestas virológicas medidas, ajustando por el resto de las variables, se muestra en las **tablas 4.20 a 4.23**. En los modelos ajustados obtenidos mediante regresión logística se observa que ninguno de los algoritmos fue capaz de predecir de forma independiente la supresión de la CV a los 3 meses (CVind3m, **tabla 4.20**), pero a los 6 meses (CVind6m) sí lo hicieron los cuatro algoritmos genotípicos, con valores de O.R. entre 1,747 (Visible Genetics, $p=0,014$) y 1,448 (Andalucía, $p=0,049$), como se observa en la **tabla 4.21**: esto significa que, por cada aumento en una unidad del GSS, la probabilidad de alcanzar CV indetectable a los 6 meses aumenta desde 1,747 veces para GSS-VG hasta 1,448 veces para GSS-Andalucía, siendo este efecto independiente del resto de las variables presentes en el modelo.

La asociación entre las distintas variables y algoritmos con la variación de la CV a los 3 y 6 meses ($\Delta\log CV3m$, $\Delta\log CV6m$) analizada mediante regresión lineal múltiple se muestra en las **tablas 4.22 y 4.23**. En la **tabla 4.22** se observa que tres de los algoritmos se asociaron independientemente con $\Delta\log CV3m$: Andalucía ($p=0,001$), ANRS-DTL ($p=0,006$) y Andalucía-DTL ($p=1,5 \cdot 10^{-4}$), en modelos que explican un 23,9%, 21,7% y 24,9% respectivamente de la varianza (R^2). Todos los algoritmos, excepto la interpretación dual del Fenotipo Virtual, fueron capaces de predecir $\Delta\log CV6m$ (**tabla 4.23**) de forma independiente, aunque los valores de R^2 de los modelos fueron bastante inferiores debido a que el resto de las variables no se asociaron significativamente ($p>0,05$) con esta respuesta en el modelo ajustado.

Tabla 4.20. Análisis multivariante: modelos ajustados de predicción de la supresión virológica a los 3 meses (CVind3m) por los algoritmos (*).		
Variables	OR (95% IC)	p
Algoritmo Andalucía		
Más de 2 fracasos previos	0,341 (0,144-0,809)	0,015
Nº CD4 _{basal} /mm ³	-	n.s.
Log ₁₀ CV _{basal}	0,396 (0,224-0,699)	0,001
Nº fármacos nuevos	1,811 (1,177-1,787)	0,007
GSS-Andalucía	-	n.s.
Algoritmo ANRS-DTL		
Más de 2 fracasos previos	0,341 (0,144-0,809)	0,015
Nº CD4 _{basal} /mm ³	-	n.s.
Log ₁₀ CV _{basal}	0,396 (0,224-0,699)	0,001
Nº fármacos nuevos	1,811 (1,177-1,787)	0,007
GSS-ANRS-DTL	-	n.s.
Algoritmo Andalucía-DTL		
Más de 2 fracasos previos	0,341 (0,144-0,809)	0,015
Nº CD4 _{basal} /mm ³	-	n.s.
Log ₁₀ CV _{basal}	0,396 (0,224-0,699)	0,001
Nº fármacos nuevos	1,811 (1,177-1,787)	0,007
GSS-Andalucía-DTL	-	n.s.
Algoritmo Visible Genetics		
Más de 2 fracasos previos	0,294 (0,118-0,733)	0,009
Nº CD4 _{basal} /mm ³	-	n.s.
Log ₁₀ CV _{basal}	0,438 (0,244-0,786)	0,006
Nº fármacos nuevos	1,734 (1,127-2,669)	0,012
GSS-VG	-	n.s.
Fenotipo Virtual: Interpretación CONTINUA		
Más de 2 fracasos previos	0,294 (0,118-0,733)	0,009
Nº CD4 _{basal} /mm ³	-	n.s.
Log ₁₀ CV _{basal}	0,438 (0,244-0,786)	0,006
Nº fármacos nuevos	1,734 (1,127-2,669)	0,012
FVSS-continuo	-	n.s.
Fenotipo Virtual: Interpretación DUAL		
Más de 2 fracasos previos	0,294 (0,118-0,733)	0,009
Nº CD4 _{basal} /mm ³	-	n.s.
Log ₁₀ CV _{basal}	0,438 (0,244-0,786)	0,006
Nº fármacos nuevos	1,734 (1,127-2,669)	0,012
FVSS dual	-	n.s.

n.s.: no significativo ($p > 0,05$).

(*): Al sustituir en el análisis multivariante la variable *Nº fármacos nuevos* por *Nº familias nuevas* se observó que en los modelos ajustados ninguno de los algoritmos valorados se asocian con la respuesta CVind3m con independencia de las demás variables (datos no mostrados).

Tabla 4.21. Análisis multivariante: modelos ajustados de predicción de la supresión virológica a los 6 meses (CVind6m) con los algoritmos estudiados.		
Variables	OR (95% IC)	p
Algoritmo Andalucía		
Adherencia >80%	-	n.s.
Log ₁₀ CV _{basal}	-	n.s.
Nº fármacos nuevos	-	n.s.
Más de 2 fracasos previos	0,298 (0,144-0,615)	0,001
GSS-Andalucía	1,448 (1,002-2,093)	0,049
Algoritmo ANRS-DTL		
Adherencia >80%	-	n.s.
Log ₁₀ CV _{basal}	-	n.s.
Nº fármacos nuevos	-	n.s.
Más de 2 fracasos previos	0,307 (0,149-0,633)	0,001
GSS-ANRS-DTL	1,515 (1,000-2,297)	0,050
Algoritmo Andalucía-DTL		
Adherencia >80%	-	n.s.
Log ₁₀ CV _{basal}	-	n.s.
Nº fármacos nuevos	-	n.s.
Más de 2 fracasos previos	0,317 (0,153-0,658)	0,002
GSS-Andalucía-DTL	1,607 (1,095-2,359)	0,015
Algoritmo Visible Genetics		
Adherencia >80%	-	n.s.
Log ₁₀ CV _{basal}	-	n.s.
Nº fármacos nuevos	-	n.s.
Más de 2 fracasos previos	0,264 (0,123-0,563)	0,001
GSS-VG	1,747 (1,118-2,730)	0,014
Fenotipo Virtual: Interpretación continua		
Adherencia >80%	-	n.s.
Log ₁₀ CV _{basal}	-	n.s.
Nº fármacos nuevos	-	n.s.
Más de 2 fracasos	0,258 (0,123-0,540)	<0,001
FVSS continuo	-	n.s.
Fenotipo Virtual: Interpretación dual		
Adherencia >80%	-	n.s.
Log ₁₀ CV _{basal}	-	n.s.
Nº fármacos nuevos	-	n.s.
Más de 2 fracasos previos	0,258 (0,123-0,540)	<0,001
FVSS dual	-	n.s.

n.s.: no significativo (p>0,05).

Tabla 4.22. Análisis multivariante: modelos ajustados de predicción de la diferencia de logaritmo de la CV a los 3 meses ($\Delta\log CV_{3m}$) por los algoritmos estudiados.				
Modelos	B	Error típico	t	Sig.
Algoritmo Andalucía: R^2 modelo= 0,239				
Edad	-	-	-	n.s.
Más de 2 fracasos previos	-0,732	0,161	-4,562	<0,001
$\log_{10} CV_{\text{basal}}$	0,548	0,102	5,395	<0,001
Nº familias previas	-	-	-	n.s.
Nº fármacos nuevos	-	-	-	n.s.
GSS-Andalucía	0,290	0,073	3,955	<0,001
Algoritmo ANRS-DTL: R^2 modelo= 0,217				
Edad	-	-	-	n.s.
Más de 2 fracasos previos	-0,762	0,162	-4,693	<0,001
$\log_{10} CV_{\text{basal}}$	0,564	0,104	5,444	<0,001
Nº familias previas	-	-	-	n.s.
Nº fármacos nuevos	-	-	-	n.s.
GSS-ANRS-DTL	0,268	0,083	3,220	0,002
Algoritmo Andalucía-DTL: R^2 modelo = 0,249				
Edad	-	-	-	n.s.
Más de 2 fracasos previos	-0,688	0,161	-4,281	<0,001
$\log_{10} CV_{\text{basal}}$	0,529	0,101	5,245	<0,001
Nº familias previas	-	-	-	n.s.
Nº fármacos nuevos	-	-	-	n.s.
GSS-Andalucía-DTL	0,317	0,075	4,238	<0,001
Algoritmo Visible Genetics: R^2 modelo = 0,171				
Edad	-	-	-	n.s.
Más de 2 fracasos previos	-0,794	0,166	-4,773	<0,001
$\log_{10} CV_{\text{basal}}$	0,528	0,106	4,993	<0,001
Nº familias previas	-	-	-	n.s.
Nº fármacos nuevos	-	-	-	n.s.
GSS-VG	-	-	-	n.s.

n.s.: no significativo ($p > 0,05$).

No se realizó análisis multivariante con los algoritmos fenotípicos, pues su significación estadística p en el análisis univariante fue $> 0,20$ (ver tabla 4.14).

Tabla 4.23. Análisis multivariante: modelos ajustados de predicción de la diferencia de logaritmo de la CV a los 6 meses ($\Delta\log CV_{6m}$) por los algoritmos.				
Variab	B	Error típico	t	Sig.
Algoritmo Andalucía: R² modelo = 0,087				
Edad	-	-	-	n.s.
Más de 2 fracasos previos	-	-	-	n.s.
Adherencia > 80%	-	-	-	n.s.
Log ₁₀ CV _{basal}	-	-	-	n.s.
Nº CD4 _{basal} /mm ³	-	-	-	n.s.
Nº fármacos nuevos	-	-	-	n.s.
GSS-Andalucía	0,316	0,116	2,721	0,008
Algoritmo ANRS-DTL: R² modelo = 0,102				
Edad	-	-	-	n.s.
Más de 2 fracasos previos	-	-	-	n.s.
Adherencia > 80%	-	-	-	n.s.
Log ₁₀ CV _{basal}	-	-	-	n.s.
Nº CD4 _{basal} /mm ³	-	-	-	n.s.
Nº fármacos nuevos	-	-	-	n.s.
GSS-ANRS-DTL	0,405	0,136	2,979	0,004
Algoritmo Andalucía-DTL: R² modelo = 0,084				
Edad	-	-	-	n.s.
Más de 2 fracasos previos	-	-	-	n.s.
Adherencia > 80%	-	-	-	n.s.
Log ₁₀ CV _{basal}	-	-	-	n.s.
Nº CD4 _{basal} /mm ³	-	-	-	n.s.
Nº fármacos nuevos	-	-	-	n.s.
GSS-Andalucía-DTL	0,339	0,127	2,667	0,009
Algoritmo Visible Genetics: R² modelo = 0,101				
Edad	-	-	-	n.s.
Más de 2 fracasos previos	-	-	-	n.s.
Adherencia > 80%	-	-	-	n.s.
Log ₁₀ CV _{basal}	-	-	-	n.s.
Nº CD4 _{basal} /mm ³	-	-	-	n.s.
Nº fármacos nuevos	-	-	-	n.s.
GSS-VG	0,457	0,158	2,898	0,005
Fenotipo Virtual: Interpretación CONTINUA: R² modelo = 0,089				
Edad	-	-	-	n.s.
Más de 2 fracasos previos	-	-	-	n.s.
Adherencia > 80%	-	-	-	n.s.
Log ₁₀ CV _{basal}	-	-	-	n.s.
Nº CD4 _{basal} /mm ³	-	-	-	n.s.
Nº fármacos nuevos	-	-	-	n.s.
FVSS-continuo	0,542	0,201	2,699	0,009

n.s.: no significativo ($p > 0,05$).

No se realizó análisis multivariante con la interpretación dual del Fenotipo Virtual, pues su significación estadística p en el análisis univariante fue $> 0,20$ (ver tabla 4.14).

4.6. CAPACIDAD DE LOS MODELOS PARA PREDECIR LA RESPUESTA VIROLOGICA EN LOS PACIENTES TRATADOS CON DIDANOSINA Y/O TENOFOVIR Y/O LOPINAVIR.

El número de fármacos activos presentes en el nuevo tratamiento administrado a cada paciente, expresado en función de los valores de GSS y FVSS de los distintos modelos, se estudió en los **213 pacientes** que recibieron en dicho tratamiento **ddl y/o TDF y/o LPV/RTV** y se muestra en la **tabla 4.24**. En 4 de ellos no se dispuso de informe del Fenotipo Virtual. Todos los modelos, excepto el de Visible Genetics, predijeron una media de al menos 2 fármacos activos en los tratamientos administrados.

Tabla 4.24. ddl-TDF-LPV: Características descriptivas de los algoritmos.			
ALGORITMOS	N	Media \pm Desv. típica	Rango
GSS- Andalucía	213	2,11 \pm 0,99	0,0 - 4,0
GSS-ANRS-DTL	213	2,19 \pm 0,87	0,0 - 4,0
GSS- Andalucía-DTL	213	2,10 \pm 0,95	0,0 - 4,0
GSS-Visible Genetics	209	1,78 \pm 0,84	0,0 - 3,5
FVSS continuo	209	2,10 \pm 0,63	0,05 - 3,71
FVSS dual	209	2,42 \pm 0,77	0,0 - 4,0

4.6.1. ddi-TDF-LPV: Capacidad de predicción de la respuesta virológica por los distintos algoritmos (análisis univariante).

El resultado del **análisis univariante** mediante regresión logística en relación a la asociación entre los distintos algoritmos y la supresión de la CV en los distintos puntos de corte se muestra en la **tabla 4.25**. Sólo Andalucía-DTL fue capaz de predecir dicha respuesta a los 3 meses ($p < 0,05$), mientras que todos los algoritmos lo hicieron a los 6 meses y, entre todos ellos, el algoritmo de Visible Genetics mostró la mayor O.R. de tal forma que para cada aumento en una unidad de GSS-VG aumenta en 2,378 veces la posibilidad de conseguir CV indetectable a los 6 meses.

Tabla 4.25. ddi-TDF-LPV: Análisis univariante para la asociación entre los distintos algoritmos y las respuestas CVind3m y CVind6m.		
ALGORITMOS	CVind3m	
	O.R. (I.C. 95%)	p
GSS-Andalucía	1,322 (0,985-1,774)	0,063
GSS-ANRS-DTL	1,286 (0,924-1,792)	0,136
GSS-Andalucía-DTL	1,609 (1,169-2,215)	0,004
GSS-VG	1,304 (0,927-1,835)	0,128
FVSS-continuo	1,471 (0,923-2,343)	0,105
FVSS-dual	1,305 (0,892-1,909)	0,171
ALGORITMOS	CVind6m	
	O.R. (I.C. 95%)	p
GSS-Andalucía	1,637 (1,171-2,289)	0,004
GSS-ANRS-DTL	1,854 (1,248-2,754)	0,002
GSS-Andalucía-DTL	1,953 (1,353-2,818)	$3,5 \cdot 10^{-4}$
GSS-VG	2,378 (1,546-3,657)	$8,1 \cdot 10^{-5}$
FVSS-continuo	2,310 (1,302-4,098)	0,004
FVSS-dual	1,713 (1,098-2,674)	0,018

En la **tabla 4.26** se muestra el resultado del análisis univariante llevado a cabo mediante regresión lineal entre los distintos algoritmos y la variación del logaritmo de la CV a 3 y 6 meses ($\Delta\log CV3m$, $\Delta\log CV6m$). Se observa que todos los algoritmos genotípicos, excepto el de Visible Genetics, mostraron una asociación significativa ($p < 0,05$) con $\Delta\log CV3m$; tampoco ninguna de las dos interpretaciones del fenotipo virtual se relacionó significativamente con dicha respuesta. Por otro lado, sólo los algoritmos genotípicos fueron capaces de predecir de forma significativa la variación del logaritmo de la CV a los 6 meses. El algoritmo Andalucía-DTL fue el que explicó el mayor porcentaje de la varianza para ambas respuestas ($R^2 = 0,060$ para $\Delta\log CV3m$ y $0,068$ para $\Delta\log CV6m$).

Tabla 4.26. ddi-TDF-LPV: Análisis univariante para la asociación entre los distintos algoritmos y las respuestas $\Delta\log CV3m$ y $\Delta\log CV6m$.					
$\Delta\log CV3m$					
ALGORITMOS	R²	B	Error típico	t	p
GSS-Andalucía	0,028	0,199	0,082	2,426	0,016
GSS-ANRS-DTL	0,022	0,201	0,094	2,136	0,034
GSS-Andalucía-DTL	0,060	0,304	0,084	3,609	$3,8 \cdot 10^{-4}$
GSS-VG	0,009	0,135	0,099	1,366	0,174
FVSS-continuo	0,001	0,052	0,133	,390	0,697
FVSS-dual	0,001	-0,037	0,108	-0,346	0,730
$\Delta\log CV6m$					
ALGORITMOS	R²	B	Error típico	t	p
GSS-Andalucía	0,054	0,287	0,095	3,008	0,003
GSS-ANRS-DTL	0,050	0,326	0,113	2,892	0,004
GSS-Andalucía-DTL	0,068	0,343	0,100	3,422	0,001
GSS-VG	0,043	0,308	0,117	2,634	0,009
FVSS-continuo	0,018	0,281	0,167	1,678	0,095
FVSS-dual	0,085	0,085	0,131	,652	0,515

4.6.2. ddi-TDF-LPV: Análisis univariante (otras variables).

Los resultados de los análisis univariantes relativos a la asociación entre otras variables y las distintas respuestas se exponen en la **tabla 4.27**. Aunque inicialmente todas las variables con $p < 0,20$ (resaltadas en negrita) se incluyeron en el análisis

multivariante, posteriormente se decidió excluir todas las *Variables relativas a mutaciones en la RT y en la PR*, puesto que su efecto ya era tenido en cuenta por los propios algoritmos. Por idéntica razón, la variable *Número de fármacos activos*, calculada a partir del algoritmo de la Universidad de Stanford en base a las mutaciones de la RT y la PR, tampoco fue incluida.

Tabla 4.27. ddi-TDF-LPV: Análisis univariante para la asociación entre otras variables y las distintas respuestas (en las casillas, valor de p).				
	CVind3m	CVind6m	$\Delta\log CV3m$	$\Delta\log CV6m$
Edad	0,497	0,081	0,152	0,033
Sexo masculino	0,596	0,319	0,629	0,859
Adherencia >80%	0,836	0,131	0,785	0,080
$\log_{10} CV_{\text{basal}}$	0,001	0,008	$8,7 \cdot 10^{-6}$	0,001
Nº CD4 _{basal} /ml	0,139	0,888	0,832	0,301
Más de 2 fracasos terapéuticos	$3,9 \cdot 10^{-5}$	$2,5 \cdot 10^{-5}$	0,005	0,016
Nº familias previas	0,267	0,470	0,250	0,722
Nº fármacos activos	0,068	0,005	0,008	0,018
Variables relativas a mutaciones en la RT:				
Nº mutaciones RT	0,298	0,001	0,446	0,050
Nº mutaciones ITIAN	0,374	0,005	0,395	0,027
Nº mutaciones ITINAN	0,790	0,144	0,935	0,948
Nº TAMs	0,047	0,002	0,052	0,007
Nº M41L, L210W, T215Y	0,065	$1,0 \cdot 10^{-4}$	0,044	0,002
Nº K70R, T215F y Q219E	0,319	0,290	0,751	0,612
Variables relativas a mutaciones en la PR:				
Nº mutaciones PR	$5,2 \cdot 10^{-5}$	0,001	0,001	0,022
Nº mutaciones múltiples IP	$1,3 \cdot 10^{-5}$	0,004	0,007	0,015
Nº de L33I, V82A/F/T/S, I84V, L90M	0,001	0,007	0,001	0,051
Variables relativas al tratamiento:				
Nº fármacos	$1,0 \cdot 10^{-4}$	0,011	0,197	0,222
Nº fármacos nuevos	$6,3 \cdot 10^{-6}$	0,004	$3,4 \cdot 10^{-4}$	0,003
Nº familias nuevas	0,013	0,213	0,007	0,056
Nº ITIAN	0,004	0,004	0,019	0,083
Presencia de ITINAN	0,723	0,698	0,674	0,369
Presencia de IP	0,860	0,440	0,012	0,020

Mediante distintos subanálisis multivariantes (**tablas 4.28 a 4.31**) se seleccionó entre las *Variables relacionadas con el nuevo tratamiento* la que tenía el menor valor de p con cada una de las respuestas para ser incluida en el análisis

multivariante. En todos los casos la variable seleccionada fue *Nº de fármacos nuevos*.

	B	E.T.	Wald	gl	Sig.	Exp(B)
Paso 1(a) Nº ITIAN	0,158	0,756	0,043	1	0,835	1,171
Presencia de ITINAN	0,070	0,751	0,009	1	0,925	1,073
Presencia de IP	0,336	0,778	0,186	1	0,666	1,399
Nº familias nuevas	0,012	0,254	0,002	1	0,964	1,012
Nº fármacos	-2,629	0,945	7,734	1	0,005	0,072
Nº fármacos nuevos	0,908	0,221	16,862	1	0,000	2,480
Constante	5,228	2,369	4,871	1	0,027	186,401

Tabla 4.28. Variables relacionadas con el nuevo tratamiento: subanálisis multivariante para seleccionar la variable más fuertemente relacionada con la respuesta CVind3m.

	B	E.T.	Wald	gl	Sig.	Exp(B)
Paso 1(a) Nº ITIAN	0,770	0,909	0,718	1	0,397	2,160
Presencia de ITINAN	1,108	0,931	1,418	1	0,234	3,030
Presencia de IP	1,555	0,971	2,565	1	0,109	4,737
Nº familias nuevas	-0,178	0,285	0,388	1	0,534	0,837
Nº fármacos	-1,858	0,934	3,960	1	0,047	0,156
Nº fármacos nuevos	0,660	0,226	8,500	1	0,004	1,934
Constante	1,379	1,563	0,779	1	0,377	3,973

Tabla 4.29. Variables relacionadas con el nuevo tratamiento: subanálisis multivariante para seleccionar la variable más fuertemente relacionada con la respuesta CVind6m.

Modelo	Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados	t	p
	B	Error típico	Beta		
1 (Constante)	1,176	0,664		1,772	0,078
Nº ITIAN	0,223	0,337	0,093	0,662	0,509
Presencia ITINAN	0,302	0,343	0,103	0,880	0,380
Presencia IP	0,854	0,362	0,292	2,358	0,019
Nº familias nuevas	0,151	0,131	0,092	1,158	0,248
Nº fármacos	-0,583	0,343	-0,200	-1,701	0,091
Nº fármacos nuevos	0,277	0,098	0,220	2,825	0,005

a Variable dependiente: $\Delta\log CV3m$.

Tabla 4.30. Variables relacionadas con el nuevo tratamiento: subanálisis multivariante para seleccionar la variable más fuertemente relacionada con la respuesta $\Delta\log CV3m$.

Modelo	Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados	t	p
	B	Error típico	Beta		
1 (Constante)	0,885	0,782		1,131	0,260
Nº ITIAN	0,361	0,444	0,155	0,814	0,417
Presencia ITINAN	0,316	0,462	0,103	0,685	0,494
Presencia IP	0,986	0,481	0,324	2,050	0,042
Nº familias nuevas	0,086	0,160	0,047	0,534	0,594
Nº fármacos	-0,632	0,426	-0,222	-1,485	0,140
Nº fármacos nuevos	0,304	0,121	0,218	2,513	0,013

a Variable dependiente: $\Delta\log CV6m$.

Tabla 4.31. Variables relacionadas con el nuevo tratamiento: subanálisis multivariante para seleccionar la variable más fuertemente relacionada con la respuesta $\Delta\log CV6m$.

4.6.3. ddi-TDF-LPV: Análisis multivariante.

La asociación entre los distintos algoritmos con $p \leq 0,20$ en el análisis univariante y cada una de las respuestas virológicas medidas, ajustando por el resto de las variables, se muestra en las **tablas 4.32 a 4.35**.

En los análisis multivariantes realizados mediante regresión logística se observa que ninguno de los algoritmos fue capaz de predecir de forma independiente la supresión de la CV a los 3 meses (CVind3m) (**tabla 4.32**), mientras que a los 6 meses sí lo hicieron los algoritmos Andalucía, Andalucía-DTL y Visible Genetics, siendo este último el que mostró el mayor valor de odds ratio: 1,654 (**tabla 4.33**).

Como se observa en la **tabla 4.34**, los cuatro algoritmos genotípicos se asociaron con independencia del resto de las variables con la variación del logaritmo de la CV a los 3 meses ($\Delta\log CV3m$); los modelos ajustados mediante regresión lineal explicaron unos porcentajes de la varianza (R^2) entre 23,8% (Andalucía-DTL) y 20,0% (Visible Genetics). En la **tabla 4.35** se muestran los modelos ajustados de predicción de la variación del logaritmo de la CV a los 6 meses ($\Delta\log CV6m$): los algoritmos Andalucía ($R^2=0,139$, $p=0,027$), ANRS-DTL ($R^2=0,107$, $p=0,033$) y Andalucía-DTL ($R^2=0,118$, $p=0,015$) presentaron una asociación independiente con esta respuesta.

Tabla 4.32. ddl-TDF-LPV: Análisis multivariante: modelos ajustados de predicción de la supresión virológica a los 3 meses (CVind3m) por los algoritmos.		
Variab les	OR (95% IC)	p
Algoritmo Andalucía		
Log ₁₀ CV _{basal}	0,367 (0,204-0,658)	0,001
Nº CD4 _{basal} /mm ³	-	n.s.
Más de 2 fracasos previos	-	n.s.
Nº fármacos nuevos	2,831 (1,712-4,682)	<10 ⁻⁴
GSS-Andalucía	-	n.s.
Algoritmo ANRS-DTL		
Log ₁₀ CV _{basal}	0,367 (0,204-0,658)	0,001
Nº CD4 _{basal} /mm ³	-	n.s.
Más de 2 fracasos previos	-	n.s.
Nº fármacos nuevos	2,831 (1,712-4,682)	<10 ⁻⁴
GSS-ANRS-DTL	-	n.s.
Algoritmo Andalucía-DTL		
Log ₁₀ CV _{basal}	0,367 (0,204-0,658)	0,001
Nº CD4 _{basal} /mm ³	-	n.s.
Más de 2 fracasos previos	-	n.s.
Nº fármacos nuevos	2,831 (1,712-4,682)	<10 ⁻⁴
GSS-Andalucía-DTL	-	n.s.
Algoritmo Visible Genetics		
Log ₁₀ CV _{basal}	0,384 (0,212-0,697)	0,002
Nº CD4 _{basal} /mm ³	-	n.s.
Más de 2 fracasos previos	-	n.s.
Nº fármacos nuevos	2,731(1,654-4,509)	<10 ⁻⁴
GSS-VG	-	n.s.
Fenotipo Virtual: Interpretación CONTINUA		
Log ₁₀ CV _{basal}	0,384 (0,212-0,697)	0,002
Nº CD4 _{basal} /mm ³	-	n.s.
Más de 2 fracasos previos	-	n.s.
Nº fármacos nuevos	2,731(1,654-4,509)	<10 ⁻⁴
FVSS-continuo	-	n.s.
Fenotipo Virtual: Interpretación DUAL		
Log ₁₀ CV _{basal}	0,384 (0,212-0,697)	0,002
Nº CD4 _{basal} /mm ³	-	n.s.
Más de 2 fracasos previos	-	n.s.
Nº fármacos nuevos	2,731(1,654-4,509)	<10 ⁻⁴
FVSS dual	-	n.s.

n.s.: no significativo ($p > 0,05$).

Al sustituir "Nº Fármacos nuevos" por "Nº familias nuevas" los modelos incluyen logCV, fracasos y Nº familias nuevas, pero no mejora su R².

Tabla 4.33. ddl-TDF-LPV: Análisis multivariante: modelos ajustados de predicción de la supresión virológica a los 6 meses (CVind6m) por los algoritmos.		
Variables	OR (95% IC)	p
Algoritmo Andalucía		
Edad	-	n.s.
Más de 2 fracasos previos	0,267 (0,117-0,610)	0,002
Adherencia >80%	-	n.s.
Log ₁₀ CV _{basal}	-	n.s.
Nº fármacos nuevos	-	n.s.
GSS-Andalucía	1,542 (1,013-2,348)	0,044
Algoritmo ANRS-DTL		
Edad	-	n.s.
Más de 2 fracasos previos	0,290 (0,130-0,646)	0,002
Adherencia >80%	-	n.s.
Log ₁₀ CV _{basal}	-	n.s.
Nº fármacos nuevos	-	n.s.
GSS-ANRS-DTL	-	n.s.
Algoritmo Andalucía-DTL		
Edad	-	n.s.
Más de 2 fracasos previos	0,289 (0,127-0,655)	0,003
Adherencia >80%	-	n.s.
Log ₁₀ CV _{basal}	-	n.s.
Nº fármacos nuevos	-	n.s.
GSS-Andalucía-DTL	1,586 (1,032-2,437)	0,035
Algoritmo Visible Genetics		
Edad	-	n.s.
Más de 2 fracasos previos	0,257 (0,110-0,600)	0,002
Adherencia >80%	-	n.s.
Log ₁₀ CV _{basal}	-	n.s.
Nº fármacos nuevos	-	n.s.
GSS-VG	1,654 (1,012-2,704)	0,045
Fenotipo Virtual: Interpretación CONTINUA		
Edad	-	n.s.
Más de 2 fracasos previos	0,256 (0,111-0,586)	0,001
Adherencia >80%	-	n.s.
Log ₁₀ CV _{basal}	-	n.s.
Nº fármacos nuevos	-	n.s.
FVSS-continuo	-	n.s.
Fenotipo Virtual: Interpretación DUAL		
Edad	-	n.s.
Más de 2 fracasos previos	0,256 (0,111-0,586)	0,001
Adherencia >80%	-	n.s.
Log ₁₀ CV _{basal}	-	n.s.
Nº fármacos nuevos	-	n.s.
FVSS dual	-	n.s.

n.s.: no significativo ($p > 0,05$).

Al sustituir “Nº Fármacos nuevos” por “Nº Familias nuevas” los modelos siguen incluyendo las mismas variables y no mejora su R^2 (datos no mostrados).

Tabla 4.34. ddi-TDF-LPV: Análisis multivariante: modelos ajustados de predicción de $\Delta\log CV_{3m}$ por los algoritmos.				
Variables	B	Error típico	t	Sig.
Algoritmo Andalucía : R^2 modelo = 0,234				
Edad	-	-	-	n.s.
Más de 2 fracasos previos	-0,692	0,163	-4,246	<0,001
$\log_{10} CV_{\text{basal}}$	0,611	0,107	5,729	<0,001
Nº fármacos nuevos	-	-	-	n.s.
GSS-Andalucía	0,293	0,077	3,788	<0,001
Algoritmo ANRS-DTL: R^2 modelo = 0,212				
Edad	-	-	-	n.s.
Más de 2 fracasos previos	-0,715	0,165	-4,326	<0,001
$\log_{10} CV_{\text{basal}}$	0,622	0,109	5,704	<0,001
Nº fármacos nuevos	-	-	-	n.s.
GSS-ANRS-DTL	0,272	0,090	3,035	0,003
Algoritmo Andalucía-DTL: R^2 modelo = 0,238				
Edad	-	-	-	n.s.
Más de 2 fracasos previos	-0,643	0,163	-3,930	<0,001
$\log_{10} CV_{\text{basal}}$	0,585	0,106	5,524	<0,001
Nº fármacos nuevos	-	-	-	n.s.
GSS-Andalucía-DTL	0,309	0,080	3,885	<0,001
Algoritmo Visible Genetics: R^2 modelo = 0,200				
Edad	-	-	-	n.s.
Más de 2 fracasos previos	-0,724	0,173	-4,193	<0,001
$\log_{10} CV_{\text{basal}}$	0,616	0,112	5,498	<0,001
Nº fármacos nuevos	-	-	-	n.s.
GSS-VG	0,194	0,095	2,048	0,042

n.s.: no significativo ($p > 0,05$).

No se realizó análisis multivariante con las dos interpretaciones del Fenotipo Virtual, pues su significación estadística p en el análisis univariante fue $> 0,20$ (ver tabla 4.26).

Tabla 4.35. ddi-TDF-LPV: Análisis multivariante: modelos ajustados de predicción de $\Delta\log\text{CV}6\text{m}$ por los algoritmos estudiados.				
Variabes	B	Error típico	t	Sig.
Algoritmo Andalucía : R^2 modelo = 0,139				
Edad	-	-	-	n.s.
Más de 2 fracasos previos	-0,319	0,158	-2,021	0,046
Adherencia >80%	-	-	-	n.s.
$\text{Log}_{10} \text{CV}_{\text{basal}}$	0,493	0,144	3,433	0,001
Nº fármacos nuevos	-	-	-	n.s.
GSS-Andalucía	0,249	0,111	2,238	0,027
Algoritmo ANRS-DTL: R^2 modelo = 0,107				
Edad	-	-	-	n.s.
Más de 2 fracasos previos	-	-	-	n.s.
Adherencia >80%	-	-	-	n.s.
$\text{Log}_{10} \text{CV}_{\text{basal}}$	0,447	0,143	3,127	0,002
Nº fármacos nuevos	-	-	-	n.s.
GSS-ANRS-DTL	0,285	0,132	2,161	0,033
Algoritmo Andalucía-DTL: R^2 modelo = 0,118				
Edad	-	-	-	n.s.
Más de 2 fracasos previos	-	-	-	n.s.
Adherencia >80%	-	-	-	n.s.
$\text{Log}_{10} \text{CV}_{\text{basal}}$,414	0,141	2,938	0,004
Nº fármacos nuevos	-	-	-	n.s.
GSS-Andalucía-DTL	0,288	0,117	2,469	0,015
Algoritmo Visible Genetics: R^2 modelo = 0,112				
Edad	-	-	-	n.s.
Más de 2 fracasos previos	-0,357	0,164	-2,179	0,032
Adherencia >80%	-	-	-	n.s.
$\text{Log}_{10} \text{CV}_{\text{basal}}$	0,503	0,150	3,357	0,001
Nº fármacos nuevos	-	-	-	n.s.
GSS-VG	-	-	-	n.s.
Fenotipo Virtual: Interpretación CONTINUA: R^2 modelo = 0,112				
Edad	-	-	-	n.s.
Más de 2 fracasos previos	-0,357	0,164	-2,179	0,032
Adherencia >80%	-	-	-	n.s.
$\text{Log}_{10} \text{CV}_{\text{basal}}$	0,503	0,150	3,357	0,001
Nº fármacos nuevos	-	-	-	n.s.
FVSS-continuo	-	-	-	n.s.

n.s.: no significativo ($p > 0,05$).

No se realizó análisis multivariante con la interpretación dual del Fenotipo Virtual, pues su significación estadística p en el análisis univariante fue $> 0,20$ (ver tabla 4.26).

4.7. CAPACIDAD DE LOS MODELOS PARA PREDECIR LA RESPUESTA VIROLOGICA EN LOS PACIENTES TRATADOS CON DIDANOSINA.

Con el objeto de determinar si las diferencias en la capacidad de predicción de la respuesta se debían a la interpretación de didanosina (ddl) por los distintos algoritmos, se seleccionaron todos los pacientes tratados con este antirretroviral dentro en su nuevo régimen. En los **133 pacientes** cuyo tratamiento incluyó **ddl**, se calculó una media de fármacos activos en el nuevo régimen que osciló entre 1,65 y 2,44, según las reglas de interpretación aplicadas (**tabla 4.36**).

Tabla 4.36. ddl: Características descriptivas de los algoritmos.			
ALGORITMO	N	Media \pm Desv. típica	Rango
GSS-Andalucía	133	2,13 \pm 1,00	0-4,0
GSS-ANRS-DTL	133	2,15 \pm 0,91	0-4,0
GSS-Andalucía-DTL	133	2,04 \pm 1,03	0-4,0
GSS-Visible Genetics	132	1,65 \pm 0,86	0-3,5
FVSS continuo	132	2,06 \pm 0,61	0-3,71
FVSS dual	132	2,44 \pm 0,77	0-4,0

4.7.1. ddl: Capacidad de predicción de la respuesta virológica por los distintos algoritmos (análisis univariante).

El resultado del análisis univariante mediante regresión logística en relación a la asociación entre los distintos modelos y la supresión de la CV en los distintos puntos de corte se muestra en la **tabla 4.37**. Los únicos modelos que fueron capaces de predecir dicha respuesta significativamente a los 3 meses ($p < 0,05$) fueron los algoritmos Andalucía y Andalucía-DTL, mientras que a los 6 meses lo hicieron los cuatro algoritmos genotípicos.

Tabla 4.37. ddl: Análisis univariante para la asociación entre los distintos algoritmos y las respuestas CVind3m y CVind6m.		
ALGORITMOS	CVind3m	
	O.R. (I.C. 95%)	p
GSS-Andalucía	1,530 (1,045-2,241)	0,029
GSS-ANRS-DTL	1,426 (0,952-2,135)	0,085
GSS-Andalucía-DTL	1,748 (1,191-2,567)	0,004
GSS-VG	1,259 (0,831-1,908)	0,277
FVSS-continuo	1,575 (0,864-2,870)	0,138
FVSS-dual	1,420 (0,874-2,307)	0,156
ALGORITMOS	CVind6m	
	O.R. (I.C. 95%)	p
GSS-Andalucía	1,842 (1,174-2,890)	0,008
GSS-ANRS-DTL	1,811 (1,112-2,949)	0,017
GSS-Andalucía-DTL	1,960 (1,257-3,058)	0,003
GSS-VG	2,147 (1,271-3,629)	0,004
FVSS-continuo	1,787 (0,843-3,787)	0,130
FVSS-dual	1,400 (0,807-2,427)	0,231

En la **tabla 4.38** se muestra el resultado del análisis univariante llevado a cabo mediante regresión lineal entre los distintos algoritmos y la variación del logaritmo de la CV a 3 y 6 meses ($\Delta\log CV_{3m}$, $\Delta\log CV_{6m}$). Se observa que todos los algoritmos genotípicos, excepto el de Visible Genetics, mostraron una asociación significativa ($p < 0,05$) con $\Delta\log CV_{3m}$ y $\Delta\log CV_{6m}$. Ninguna de las interpretaciones del Fenotipo Virtual se asoció significativamente con dichas respuestas.

Tabla 4.38. ddl: Análisis univariante para la asociación entre los distintos algoritmos y las respuestas $\Delta\log CV_{3m}$ y $\Delta\log CV_{6m}$.					
$\Delta\log CV_{3m}$					
ALGORITMOS	R²	B	Error típico	t	p
GSS-Andalucía	0,046	0,250	0,100	2,500	0,014
GSS-ANRS-DTL	0,030	0,222	0,111	1,998	0,048
GSS-Andalucía-DTL	0,091	0,344	0,095	3,602	4,5·10⁻⁴
GSS-VG	0,019	0,187	0,118	1,575	0,118
FVSS-continuo	0,012	0,210	0,167	1,254	0,212
FVSS-dual	0,004	0,097	0,133	0,732	0,465
$\Delta\log CV_{6m}$					
ALGORITMOS	R²	B	Error típico	t	p
GSS-Andalucía	0,062	0,327	0,129	2,537	0,013
GSS-ANRS-DTL	0,043	0,309	0,148	2,090	0,039
GSS-Andalucía-DTL	0,074	0,352	0,126	2,790	0,006
GSS-VG	0,031	0,269	0,154	1,746	0,084
FVSS-continuo	0,012	0,257	0,237	1,083	0,282
FVSS-dual	0,000	0,021	0,175	0,122	0,903

4.7.2. ddl: Análisis univariante (otras variables).

Los resultados de los análisis univariantes para la asociación entre otras variables y las distintas respuestas se exponen en la **tabla 4.39**. Inicialmente todas las variables con $p < 0,20$ (resaltadas en negrita) se incluyeron en el análisis multivariante pero posteriormente se decidió excluir todas las *Variables relativas a mutaciones en la RT y en la PR*, puesto que su efecto ya era tenido en cuenta por los propios algoritmos. Por idéntica razón, la variable *Número de fármacos activos*, calculada a partir del algoritmo de la Universidad de Stanford en base a las mutaciones de la RT y la PR, tampoco fue incluida.

Tabla 4.39. ddl: Análisis univariante para la asociación entre otras variables y las distintas respuestas (en las casillas, valor de p).				
	CVind3m	CVind6m	$\Delta\log CV3m$	$\Delta\log CV6m$
Edad	0,155	0,069	0,061	0,020
Sexo masculino	0,589	0,308	0,794	0,758
Adherencia >80%	0,948	0,516	0,257	0,074
$\log_{10} CV_{\text{basal}}$	$4,8 \cdot 10^{-5}$	0,101	0,004	0,002
Nº CD4 _{basal} /ml	0,007	0,793	0,280	0,478
Más de 2 fracasos terapéuticos	$1,8 \cdot 10^{-4}$	$1,4 \cdot 10^{-4}$	0,012	0,071
Nº familias previas	0,492	0,421	0,554	0,719
Nº fármacos activos	0,010	0,016	0,016	0,068
Variables relativas a mutaciones en la RT:				
Nº mutaciones RT	0,415	0,009	0,501	0,159
Nº mutaciones ITIAN	0,216	0,009	0,221	0,033
Nº mutaciones ITINAN	0,345	0,459	0,483	0,454
Nº TAMs	0,122	0,005	0,241	0,027
Nº M41L, L210W, T215Y	0,026	$1,0 \cdot 10^{-4}$	0,026	0,001
Nº K70R, T215F y Q219E	0,064	0,110	0,105	0,131
Variables relativas a mutaciones en la PR:				
Nº mutaciones PR	$1,5 \cdot 10^{-4}$	0,017	0,001	0,131
Nº mutaciones múltiples IP	0,003	0,054	0,066	0,318
Nº de L33I, V82A/F/T/S, I84V, L90M	0,002	0,154	0,001	0,295
Variables relativas al tratamiento:				
Nº fármacos	$2,2 \cdot 10^{-4}$	0,021	0,158	0,277
Nº fármacos nuevos	$1,5 \cdot 10^{-4}$	0,022	0,002	0,010
Nº familias nuevas	0,126	0,833	0,480	0,611
Nº ITIAN	0,003	0,015	0,010	0,057
Presencia de ITINAN	0,386	0,788	0,841	0,284
Presencia de IP	0,665	0,316	0,038	0,020

En las siguientes **tablas (4.40 a 4.43)** se muestra la variable relacionada con el nuevo tratamiento que fue seleccionada para ser incluida en los posteriores análisis multivariantes. Como en los apartados anteriores, dicha variable volvió a ser *Número de fármacos nuevos* para las cuatro medidas de la respuesta.

	B	E.T.	Wald	gl	Sig.	Exp(B)
Paso 1(a) N° ITIAN	2,204	2,937	0,563	1	0,453	9,061
Presencia de ITINAN	2,513	2,878	0,762	1	0,383	12,338
Presencia de IP	2,790	2,890	0,932	1	0,334	16,288
N° familias nuevas	-0,300	0,347	0,750	1	0,386	0,740
N° fármacos	-5,260	3,221	2,667	1	0,102	0,005
N° fármacos nuevos	1,131	,312	13,164	1	0,000	3,098
Constante	6,483	3,319	3,815	1	0,051	654,224

Tabla 4.40. Variables relacionadas con el nuevo tratamiento: subanálisis multivariante para seleccionar la variable más fuertemente relacionada con la respuesta CVind3m.

	B	E.T.	Wald	gl	Sig.	Exp(B)
Paso 1(a) N° ITIAN	19,450	19201,521	0,000	1	0,999	279910927,702
Presencia de ITINAN	20,116	19201,521	0,000	1	0,999	544840625,304
Presencia de IP	21,187	19201,521	0,000	1	0,999	1590163838,599
N° familias nuevas	-0,477	0,397	1,442	1	0,230	0,620
N° fármacos	-20,877	19201,521	0,000	1	0,999	0,000
N° fármacos nuevos	0,866	0,341	6,467	1	0,011	2,377
Constante	1,364	2,023	0,455	1	0,500	3,911

Tabla 4.41. Variables relacionadas con el nuevo tratamiento: subanálisis multivariante para seleccionar la variable más fuertemente relacionada con la respuesta CVind6m.

Modelo	Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados	t	p
	B	Error típico	Beta		
1 (Constante)	1,104	0,736		1,501	0,136
N° ITIAN	0,618	0,493	0,232	1,254	0,212
Presencia ITINAN	1,425	0,510	0,470	2,797	0,006
Presencia IP	1,792	0,516	0,634	3,471	0,002
N° familias nuevas	-0,181	0,159	-0,112	-1,133	0,260
N° fármacos	-1,135	0,468	-0,438	-2,424	0,017
N° fármacos nuevos	0,420	0,120	0,329	3,487	0,001

a Variable dependiente: $\Delta\log CV3m$.

Tabla 4.42. Variables relacionadas con el nuevo tratamiento: subanálisis multivariante para seleccionar la variable más fuertemente relacionada con la respuesta $\Delta\log CV3m$.

Modelo	Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados	t	p
	B	Error típico	Beta		
1 (Constante)	0,567	0,998		0,569	0,571
Nº ITIAN	0,530	0,714	0,189	0,743	0,460
Presencia ITINAN	1,060	0,844	0,304	1,255	0,213
Presencia IP	1,889	0,832	0,587	2,270	0,026
Nº familias nuevas	-0,183	0,213	-0,098	-0,863	0,391
Nº fármacos	-0,944	0,645	-0,351	-1,463	0,147
Nº fármacos nuevos	0,466	0,173	0,299	2,704	0,008

a Variable dependiente: $\Delta\log CV6m$.

Tabla 4.43. Variables relacionadas con el nuevo tratamiento: subanálisis multivariante para seleccionar la variable más fuertemente relacionada con la respuesta $\Delta\log CV6m$.

4.7.3. ddl: Análisis multivariante.

La capacidad de predicción de las distintos tipos de respuesta por cada uno de los algoritmos, teniendo en cuenta el efecto de otras variables (análisis multivariante), se expone en las **tablas 4.44 a 4.47**. Se observa que sólo el algoritmo Andalucía-DTL predijo con independencia de otras variables la supresión de CV a los 3 meses (CVind3m, **tabla 4.44**), con un valor de OR=2,860: es decir, por cada unidad que aumenta el GSS-Andalucía-DTL, aumenta en 2,860 veces la posibilidad de alcanzar CV indetectable. Los algoritmos Andalucía, ANRS-DTL y Visible Genetics fueron capaces de predecir la supresión de la CV a los 6 meses (CVind6m, **tabla 4.45**). Los algoritmos genotípicos Andalucía, ANRS-DTL y Andalucía-DTL se mostraron capaces de predecir con independencia del resto de las variables la diferencia en el logaritmo de la CV a los 3 meses ($\Delta\log CV3m$, **tabla 4.46**); de los 3 modelos, el que incluyó a este último algoritmo explicó el mayor porcentaje de la varianza ($R^2=0,237$). Finalmente, ninguno de los algoritmos se asoció de forma independiente con la diferencia de logaritmo de la CV a los 6 meses ($\Delta\log CV6m$, **tabla 4.47**).

Tabla 4.44. ddl: Análisis multivariante: modelos ajustados de predicción de supresión virológica a los 3 meses (CVind3m) por los algoritmos.		
Variabes	OR (95% IC)	p
Algoritmo Andalucía		
Edad	-	n.s.
Más de 2 fracasos previos	-	n.s.
Nº CD4 _{basal} /ml	1,004 (1,001-1,008)	0,015
Log ₁₀ CV _{basal}	0,207 (0,060-0,718)	0,013
Nº fármacos nuevos	2,510 (1,100-5,728)	0,029
GSS-Andalucía	-	n.s.
Algoritmo ANRS-DTL		
Edad	-	n.s.
Más de 2 fracasos previos	-	n.s.
Nº CD4 _{basal} /ml	1,004 (1,001-1,008)	0,015
Log ₁₀ CV _{basal}	0,207 (0,060-0,718)	0,013
Nº fármacos nuevos	2,510 (1,100-5,728)	0,029
GSS-ANRS-DTL	-	n.s.
Algoritmo Andalucía-DTL		
Edad	-	n.s.
Más de 2 fracasos previos	-	n.s.
Nº CD4 _{basal} /ml	1,005 (1,001-1,009)	0,008
Log ₁₀ CV _{basal}	0,183 (0,049-0,682)	0,011
Nº fármacos nuevos	-	n.s.
GSS-Andalucía-DTL	2,860 (1,125-7,268)	0,027
Fenotipo Virtual: Interpretación CONTINUA		
Edad	-	n.s.
Más de 2 fracasos previos	-	n.s.
Nº CD4 _{basal} /ml	1,004 (1,001-1,008)	0,016
Log ₁₀ CV _{basal}	0,211 (0,061-,725)	0,013
Nº fármacos nuevos	2,467 (1,080-5,635)	0,032
FVSS-continuo	-	n.s.
Fenotipo Virtual: Interpretación DUAL		
Edad	-	n.s.
Más de 2 fracasos previos	-	n.s.
Nº CD4 _{basal} /ml	1,004 (1,001-1,008)	0,016
Log ₁₀ CV _{basal}	0,211 (0,061-,725)	0,013
Nº fármacos nuevos	2,467 (1,080-5,635)	0,032
FVSS dual	-	n.s.

n.s.: no significativo (p>0,05).

Tabla 4.45. ddl: Análisis multivariante: modelos ajustados de predicción de supresión virológica a los 6 meses (CVind6m) por los algoritmos.		
Variables	OR (95% IC)	p
Algoritmo Andalucía		
Edad	-	n.s.
Más de 2 fracasos previos	0,176 (0,064-0,484)	0,001
Log ₁₀ CV _{basal}	-	n.s.
Nº fármacos nuevos	-	n.s.
GSS-Andalucía	1,916 (1,115-3,293)	0,019
Algoritmo ANRS-DTL		
Edad	-	n.s.
Más de 2 fracasos previos	0,188 (0,070-0,503)	0,001
Log ₁₀ CV _{basal}	-	n.s.
Nº fármacos nuevos	-	n.s.
GSS-ANRS-DTL	1,739 (0,992-3,049)	0,053
Algoritmo Andalucía-DTL		
Edad	-	n.s.
Más de 2 fracasos previos	0,196 (0,076-0,510)	0,001
Log ₁₀ CV _{basal}	-	n.s.
Nº fármacos nuevos	-	n.s.
GSS-Andalucía-DTL	-	n.s.
Algoritmo Visible Genetics		
Edad	-	n.s.
Más de 2 fracasos previos	0,182 (0,066-0,501)	0,001
Log ₁₀ CV _{basal}	-	n.s.
Nº fármacos nuevos	-	n.s.
GSS-VG	1,825 (1,012-3,292)	0,046
Fenotipo Virtual: Interpretación CONTINUA		
Edad	-	n.s.
Más de 2 fracasos previos	0,175 (0,065-0,466)	<0,001
Log ₁₀ CV _{basal}	-	n.s.
Nº fármacos nuevos	-	n.s.
FVSS-continuo	-	n.s.

n.s.: no significativo ($p > 0,05$).

No se realizó análisis multivariante con la interpretación dual del Fenotipo Virtual, pues su significación estadística p en el análisis univariante fue $> 0,20$ (ver tabla 4.37).

Tabla 4.46. ddl: Análisis multivariante: modelos ajustados de predicción de diferencia de logaritmo de CV a los 3 meses ($\Delta\log CV_{3m}$) por los algoritmos.				
Variabes	B	Error típico	t	Sig.
Algoritmo Andalucía: $R^2= 0,233$				
Edad	-	-	-	n.s.
Más de 2 fracasos previos	-0,705	0,201	-3,500	0,001
Adherencia >80%	-	-	-	n.s.
$\log_{10} CV_{\text{basal}}$	0,550	0,134	4,108	<0,001
Nº fármacos nuevos	-	-	-	n.s.
GSS-Andalucía	0,332	0,096	3,457	0,001
Algoritmo ANRS-DTL: $R^2= 0,195$				
Edad	-	-	-	n.s.
Más de 2 fracasos previos	-0,739	0,207	-3,575	0,001
Adherencia >80%	-	-	-	n.s.
$\log_{10} CV_{\text{basal}}$	0,578	0,139	4,154	<0,001
Nº fármacos nuevos	-	-	-	n.s.
GSS-ANRS-DTL	0,271	0,109	2,489	0,014
Algoritmo Andalucía-DTL: $R^2= 0,237$				
Edad	-	-	-	n.s.
Más de 2 fracasos previos	-0,636	0,202	-3,147	0,002
Adherencia >80%	-	-	-	n.s.
$\log_{10} CV_{\text{basal}}$	0,535	0,133	4,013	<0,001
Nº fármacos nuevos	-	-	-	n.s.
GSS-Andalucía-DTL	0,329	0,093	3,554	0,001
Algoritmo Visible Genetics: $R^2= 0,154$				
Edad	-	-	-	n.s.
Más de 2 fracasos previos	-0,735	0,212	-3,466	0,001
Adherencia >80%	-	-	-	n.s.
$\log_{10} CV_{\text{basal}}$	0,518	0,140	3,703	0,000
Nº fármacos nuevos	-	-	-	n.s.
GSS-VG	-	-	-	n.s.

n.s.: no significativo ($p>0,05$).

No se realizó análisis multivariante con las dos interpretaciones del Fenotipo Virtual, pues su significación estadística p en el análisis univariante fue $>0,20$ (ver tabla 4.38).

Tabla 4.47. ddl: Análisis multivariante: modelos ajustados de predicción de la diferencia de logaritmo de la CV a los 6 meses ($\Delta\log CV_{6m}$) por los algoritmos.					
Variables	B	Error típico	Beta	t	Sig.
Algoritmo Andalucía: $R^2=0,166$					
Edad	-0,048	0,024	-0,235	-2,007	0,049
Más de 2 fracasos previos	-	-	-	-	n.s.
Adherencia >80%	-	-	-	-	n.s.
$\log_{10} CV_{\text{basal}}$	0,530	0,197	0,316	2,693	0,009
Nº fármacos nuevos	-	-	-	-	n.s.
GSS-Andalucía	-	-	-	-	n.s.
Algoritmo ANRS-DTL: $R^2=0,166$					
Edad	-0,048	0,024	-0,235	-2,007	0,049
Más de 2 fracasos previos	-	-	-	-	n.s.
Adherencia >80%	-	-	-	-	n.s.
$\log_{10} CV_{\text{basal}}$	0,530	0,197	0,316	2,693	0,009
Nº fármacos nuevos	-	-	-	-	n.s.
GSS-ANRS-DTL	-	-	-	-	n.s.
Algoritmo Andalucía-DTL: $R^2= 0,166$					
Edad	-0,048	0,024	-0,235	-2,007	0,049
Más de 2 fracasos previos	-	-	-	-	n.s.
Adherencia >80%	-	-	-	-	n.s.
$\log_{10} CV_{\text{basal}}$	0,530	0,197	0,316	2,693	0,009
Nº fármacos nuevos	-	-	-	-	n.s.
GSS-Andalucía-DTL	-	-	-	-	n.s.
Algoritmo Visible Genetics: $R^2= 0,172$					
Edad	-0,049	0,024	-0,246	-2,084	0,041
Más de 2 fracasos previos	-	-	-	-	n.s.
Adherencia >80%	-	-	-	-	n.s.
$\log_{10} CV_{\text{basal}}$	0,525	0,196	0,316	2,685	0,009
Nº fármacos nuevos	-	-	-	-	n.s.
GSS-VG	-	-	-	-	n.s.

n.s.: no significativo ($p>0,05$).

Al sustituir la variable *Nº fármacos nuevos* por *Nº familias nuevas* o al incluir ambas, los algoritmos siguen sin tener capacidad independiente para predecir la respuesta y los modelos ajustados no mejoran, puesto que sus R^2 son iguales o inferiores a las mostradas en esta tabla.

No se realizó análisis multivariante con las dos interpretaciones del Fenotipo Virtual, pues su significación estadística p en el análisis univariante fue $>0,20$ (ver tabla 4.38).

4.8. CAPACIDAD DE LOS MODELOS PARA PREDECIR LA RESPUESTA VIROLOGICA EN LOS PACIENTES TRATADOS CON TENOFOVIR.

Con el objeto de determinar si las diferencias en la capacidad de predicción de la respuesta por los distintos modelos se debían a la interpretación de tenofovir (TDF) fueron seleccionaron todos los pacientes tratados con este antirretroviral dentro de su nuevo régimen. En los **153 pacientes** cuyo tratamiento incluyó **TDF** se calculó una media de fármacos activos en el nuevo régimen que osciló entre 1,78 y 2,39, según las reglas de interpretación aplicadas (**tabla 4.48**). En 4 pacientes no se dispuso de resultado de Fenotipo Virtual.

Tabla 4.48. Características descriptivas de los algoritmos.			
ALGORITMO	N	Media \pm Desv. típica	Rango
GSS-Andalucía	153	1,99 \pm 1,03	0-4,0
GSS-ANRS-DTL	153	2,14 \pm 0,86	0,5-4,0
GSS- Andalucía-DTL	153	2,06 \pm 0,96	0-4,0
GSS-Visible Genetics	149	1,78 \pm 0,80	0-3,5
FVSS continuo	149	2,09 \pm 0,62	0,10-3,71
FVSS dual	149	2,39 \pm 0,78	0-4,00

4.8.1. TDF: Capacidad de predicción de la respuesta virológica por los distintos algoritmos (análisis univariante).

En la **tabla 4.49** se exponen los resultados del análisis univariante para la asociación entre los distintos modelos y la respuesta virológica al tratamiento, considerada como CV indetectable. Aunque sólo los algoritmos Andalucía-DTL y Visible Genetics se asociaron significativamente con la supresión de la CV a los 3 meses ($p=0,005$ y $p=0,044$, respectivamente), al analizar la relación entre los algoritmos y la supresión de la CV a los 6 meses se observó que todos ellos fueron capaces de predecir esta respuesta de forma estadísticamente significativa.

Tabla 4.49. TDF: Análisis univariante para la asociación entre los distintos algoritmos y las respuestas CVind3m y CVind6m.		
ALGORITMOS	CVind3m	
	O.R. (I.C. 95%)	p
GSS-Andalucía	1,355 (0,968-0,895)	0,076
GSS-ANRS-DTL	1,459 (0,976-2,181)	0,066
GSS-Andalucía-DTL	1,734 (1,185-2,540)	0,005
GSS-VG	1,569 (1,012-2,434)	0,044
FVSS-continuo	1,672 (0,946 2,956)	0,077
FVSS-dual	1,426 (0,904-2,248)	0,127
ALGORITMOS	CVind6m	
	O.R. (I.C. 95%)	p
GSS-Andalucía	1,765 (1,204-2,588)	0,004
GSS-ANRS-DTL	2,262 (1,385-3,696)	0,001
GSS-Andalucía-DTL	2,327 (1,489-3,635)	$2,1 \cdot 10^{-4}$
GSS-VG	3,391 (1,867-6,159)	$6,1 \cdot 10^{-5}$
FVSS-continuo	2,927 (1,443-5,938)	0,003
FVSS-dual	1,901 (1,117-3,234)	0,018

En la **tabla 4.50** se exponen los resultados del análisis univariante realizado mediante regresión lineal que muestra la asociación entre los distintos algoritmos y la diferencia de CV a los 3 y 6 meses del inicio del tratamiento, observándose que sólo los algoritmos genotípicos presentaron una asociación estadísticamente significativa ($p < 0,05$) con ambos tipos de respuesta.

Tabla 4.50.TDF: Análisis univariante para la asociación entre los distintos algoritmos y las respuestas $\Delta\log CV3m$ y $\Delta\log CV6m$.					
$\Delta\log CV3m$					
ALGORITMOS	R²	B	Error típico	t	p
GSS-Andalucía	0,050	,265	,096	2,764	0,006
GSS-ANRS-DTL	0,054	,332	,115	2,886	0,004
GSS-Andalucía-DTL	0,100	,404	,100	4,026	9,1·10⁻⁵
GSS-VG	0,035	,286	,127	2,253	0,026
FVSS-continuo	0,008	,180	,167	1,078	0,283
FVSS-dual	0,001	,049	,133	,372	0,711
$\Delta\log CV6m$					
ALGORITMOS	R²	B	Error típico	t	p
GSS-Andalucía	0,086	,353	,107	3,308	0,001
GSS-ANRS-DTL	0,102	,477	,131	3,643	4,0·10⁻⁴
GSS-Andalucía-DTL	0,118	,449	,113	3,958	1,3·10⁻⁴
GSS-VG	0,064	,412	,148	2,789	0,006
FVSS-continuo	0,030	,373	,201	1,857	0,066
FVSS-dual	0,006	,127	,153	,829	0,409

4.8.2. TDF: Análisis univariante (otras variables).

Los resultados de los análisis univariantes relativos a la asociación entre otras variables y las distintas respuestas se exponen en la **tabla 4.51**. Todas las variables con $p < 0,20$ (resaltadas en negrita) se incluyeron inicialmente en el análisis multivariante pero posteriormente se decidió excluir las *Variables relativas a mutaciones en la RT y en la PR*, puesto que su efecto ya era tenido en cuenta por los propios algoritmos. Por idéntica razón, la variable *Número de fármacos activos*, calculada a partir del algoritmo de la Universidad de Stanford en base a las mutaciones de la RT y la PR, tampoco fue incluida.

Tabla 4.51. TDF: Análisis univariante para la asociación entre otras variables y las distintas respuestas (en las casillas, valor de p).				
Variables	CVind3m	CVind6m	$\Delta\log CV3m$	$\Delta\log CV6m$
Edad	0,752	0,487	0,346	0,352
Sexo masculino	0,524	0,492	0,485	0,900
Adherencia < 80%	0,815	0,222	0,900	0,049
$\log_{10} CV_{\text{basal}}$	0,002	0,006	0,002	0,002
Nº CD4 _{basal} /ml	0,166	0,414	0,938	0,086
Más de 2 fracasos terapéuticos	$1,4 \cdot 10^{-4}$	0,037	0,011	0,308
Nº familias previas	0,525	0,449	0,127	0,498
Nº fármacos activos	0,215	0,038	0,304	0,113
Variables relativas a mutaciones en la RT:				
Nº mutaciones RT	0,104	$1,3 \cdot 10^{-4}$	0,146	0,008
Nº mutaciones ITIAN	0,380	0,001	0,054	0,011
Nº mutaciones ITINAN	0,106	0,085	0,020	0,371
Nº TAMs	0,105	$3,2 \cdot 10^{-4}$	0,054	0,002
Nº M41L, L210W, T215Y	0,136	0,001	0,040	0,006
Nº K70R, T215F y Q219E	0,178	0,520	0,375	0,750
Variables relativas a mutaciones en la PR:				
Nº mutaciones PR	$1,5 \cdot 10^{-4}$	0,004	0,008	0,160
Nº mutaciones múltiples IP	$3,4 \cdot 10^{-4}$	0,007	0,030	0,063
Nº de L33I, V82A/F/T/S, I84V, L90M	0,001	0,011	0,005	0,226
Variables relativas al tratamiento:				
Nº fármacos	0,001	0,014	0,663	0,523
Nº fármacos nuevos	$2,6 \cdot 10^{-5}$	0,024	$1,3 \cdot 10^{-4}$	0,012
Nº familias nuevas	0,062	0,242	0,014	0,084
Nº ITIAN	0,018	0,044	0,097	0,226
Presencia de ITINAN	0,557	1,000	0,846	0,377
Presencia de IP	0,888	0,401	0,023	0,048

En las siguientes **tablas (4.52 a 4.55)** se muestra la variable relacionada con el nuevo tratamiento que fue seleccionada para ser incluida en los posteriores análisis multivariantes. Como en los apartados anteriores, dicha variable volvió a ser *Número de fármacos nuevos* para los cuatro tipos de respuesta.

	B	E.T.	Wald	gl	Sig.	Exp(B)
Paso 1(a) N° ITIAN	0,248	0,775	0,103	1	0,749	1,282
Presencia de ITINAN	0,162	0,764	0,045	1	0,832	1,176
Presencia de IP	0,370	0,803	0,213	1	0,645	1,448
N° familias nuevas	-0,016	0,282	0,003	1	0,954	0,984
N° fármacos	-2,505	0,964	6,756	1	0,009	0,082
N° fármacos nuevos	1,147	0,296	15,004	1	0,000	3,147
Constante	3,975	2,470	2,590	1	0,108	53,264

Tabla 4.52. Variables relacionadas con el nuevo tratamiento: subanálisis multivariante para seleccionar la variable más fuertemente relacionada con la respuesta CVind3m.

	B	E.T.	Wald	gl	Sig.	Exp(B)
Paso1(a) N° ITIAN	0,752	0,925	0,661	1	0,416	2,120
Presencia de ITINAN	0,800	0,943	0,721	1	0,396	2,227
Presencia de IP	1,421	0,992	2,052	1	0,152	4,140
N° familias nuevas	0,001	0,310	0,000	1	0,996	1,001
N° fármacos	-2,001	0,982	4,152	1	0,042	0,135
N° fármacos nuevos	0,582	0,272	4,595	1	0,032	1,790
Constante	1,925	1,870	1,060	1	0,303	6,856

Tabla 4.53. Variables relacionadas con el nuevo tratamiento: subanálisis multivariante para seleccionar la variable más fuertemente relacionada con la respuesta CVind6m.

Modelo	Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados	t	p
	B	Error típico	Beta		
1 (Constante)	0,558	0,801		0,696	0,488
N° ITIAN	0,292	0,373	0,128	0,781	0,436
Presencia ITINAN	0,306	0,385	0,106	0,795	0,428
Presencia IP	0,807	0,404	0,288	1,999	0,048
N° familias nuevas	0,123	0,148	0,075	0,831	0,407
N° fármacos	-0,521	0,391	-0,174	-1,334	0,184
N° fármacos nuevos	0,406	0,127	0,284	3,199	0,002

a Variable dependiente: $\Delta \log CV3m$.

Tabla 4.54. Variables relacionadas con el nuevo tratamiento: subanálisis multivariante para seleccionar la variable más fuertemente relacionada con la respuesta $\Delta \log CV3m$.

Modelo	Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados	t	p
	B	Error típico	Beta		
1 (Constante)	0,625	0,931		0,672	0,503
Nº ITIAN	0,377	0,483	0,167	0,781	0,437
Presencia ITINAN	0,274	0,499	0,091	0,550	0,584
Presencia IP	0,909	0,524	0,313	1,736	0,085
Nº familias nuevas	0,120	0,182	0,068	0,660	0,511
Nº fármacos	-0,568	0,488	-0,195	-1,164	0,247
Nº fármacos nuevos	0,301	0,148	0,206	2,029	0,045

a Variable dependiente: $\Delta\log CV6m$.

Tabla 4.55. Variables relacionadas con el nuevo tratamiento: subanálisis multivariante para seleccionar la variable más fuertemente relacionada con la respuesta $\Delta\log CV6m$.

4.8.3. TDF: Análisis multivariante.

La capacidad de predicción de las distintos tipos de respuesta por cada uno de los algoritmos, teniendo en cuenta el efecto de otras variables (análisis multivariante), se expone en las **tablas 4.56 a 4.59**. Aunque en los modelos ajustados obtenidos mediante regresión logística ninguno de los algoritmos mostró una asociación significativa con la supresión de la CV a los 3 meses (**tabla 4.56**), todos ellos, tanto genotípicos como fenotípicos, fueron capaces de predecir con independencia de las demás variables ($p < 0,05$) la supresión de la CV a los 6 meses (**tabla 4.57**), siendo el algoritmo de Visible Genetics el que presentó la mayor OR (3,241).

Todos los algoritmos genotípicos mostraron capacidad para predecir con independencia de las demás variables la diferencia de logaritmo de la CV a los 3 meses (**tabla 4.58**) y, entre ellos, el modelo ajustado para el algoritmo Andalucía DTL fue el que mayor porcentaje de la varianza fue capaz de explicar ($R^2=30,5\%$). Cuando se estudió la asociación de los algoritmos con la diferencia de logaritmo de la CV a los 6 meses (**tabla 4.59**) se observó que los algoritmos Andalucía ($p=0,022$), ANRS-DTL ($p=0,003$) y Andalucía DTL ($p=0,011$) fueron capaces de predecir dicha respuesta independientemente del resto de las variables.

Tabla 4.56. TDF: Análisis multivariante: modelos ajustados de predicción de supresión virológica a los 3 meses (CVind3m) por los algoritmos.		
Variab les	OR (95% IC)	p
Algoritmo Andalucía		
Más de 2 fracasos previos	-	n.s.
Nº CD4 _{basal} /ml	-	n.s.
Log ₁₀ CV _{basal}	0,287 (0,144-0,572)	<0,001
Nº fármacos nuevos(*)	3,345 (1,747-6,406)	<0,001
GSS-Andalucía	-	n.s.
Algoritmo ANRS-DTL		
Más de 2 fracasos previos	-	n.s.
Nº CD4 _{basal} /ml	-	n.s.
Log ₁₀ CV _{basal}	0,287 (0,144-0,572)	<0,001
Nº fármacos nuevos(*)	3,345 (1,747-6,406)	<0,001
GSS-ANRS-DTL	-	n.s.
Algoritmo Andalucía-DTL		
Más de 2 fracasos previos	-	n.s.
Nº CD4 _{basal} /ml	-	n.s.
Log ₁₀ CV _{basal}	0,287 (0,144-0,572)	<0,001
Nº fármacos nuevos(*)	3,345 (1,747-6,406)	<0,001
GSS-Andalucía-DTL	-	n.s.
Algoritmo Visible Genetics		
Más de 2 fracasos previos	0,370 (0,112-1,222)	0,103
Nº CD4 _{basal} /ml	-	n.s.
Log ₁₀ CV _{basal}	0,383 (0,178-0,823)	0,014
Nº fármacos nuevos(*)	2,587 (1,310-5,112)	0,006
GSS-VG	-	n.s.
Fenotipo Virtual: Interpretación CONTINUA		
Más de 2 fracasos previos	0,370 (0,112-1,222)	0,103
Nº CD4 _{basal} /ml	-	n.s.
Log ₁₀ CV _{basal}	0,383 (0,178-0,823)	0,014
Nº fármacos nuevos(*)	2,587 (1,310-5,112)	0,006
FVSS-continuo	-	n.s.
Fenotipo Virtual: Interpretación DUAL		
Más de 2 fracasos previos	0,370 (0,112-1,222)	0,103
Nº CD4 _{basal} /ml	-	n.s.
Log ₁₀ CV _{basal}	0,383 (0,178-0,823)	0,014
Nº fármacos nuevos(*)	2,587 (1,310-5,112)	0,006
FVSS dual	-	n.s.

n.s.: No significativo ($p > 0,05$).

Al sustituir la variable *Nº fármacos nuevos* por *Nº familias nuevas* o al incluir ambas, los algoritmos siguen sin tener capacidad para predecir la respuesta independientemente.

Tabla 4.57. TDF: Análisis multivariante: modelos ajustados de predicción de supresión virológica a los 6 meses (CVind6m) por los algoritmos.		
Variables	OR (95% IC)	p
Algoritmo Andalucía		
Más de 2 fracasos previos	0,266 (0,117-0,606)	0,002
Log ₁₀ CV _{basal}	-	n.s.
Nº fármacos nuevos(*)	-	n.s.
GSS-Andalucía	1,866 (1,220-2,854)	0,004
Algoritmo ANRS-DTL		
Más de 2 fracasos previos	0,288 (0,126-0,655)	0,003
Log ₁₀ CV _{basal}	-	n.s.
Nº fármacos nuevos(*)	-	n.s.
GSS-ANRS-DTL	2,291 (1,361-3,859)	0,002
Algoritmo Andalucía-DTL		
Más de 2 fracasos previos	0,295 (0,128-0,677)	0,004
Log ₁₀ CV _{basal}	-	n.s.
Nº fármacos nuevos(*)	-	n.s.
GSS-Andalucía-DTL	2,301 (1,428-3,707)	0,001
Algoritmo Visible Genetics		
Más de 2 fracasos previos	0,238 (0,097-0,584)	0,002
Log ₁₀ CV _{basal}	-	n.s.
Nº fármacos nuevos(*)	-	n.s.
GSS-VG	3,241 (1,738-6,045)	<0,001
Fenotipo Virtual: Interpretación CONTINUA		
Más de 2 fracasos previos	0,224 (0,095-0,531)	0,001
Log ₁₀ CV _{basal}	-	n.s.
Nº fármacos nuevos(*)	-	n.s.
FVSS-continuo	2,995 (1,413-6,346)	0,004
Fenotipo Virtual: Interpretación DUAL		
Más de 2 fracasos previos	0,220 (0,094-0,515)	<0,001
Log ₁₀ CV _{basal}	-	n.s.
Nº fármacos nuevos(*)	-	n.s.
FVSS dual	1,966 (1,111-3,480)	0,020

n.s.: No significativo (p>0,05).

Al sustituir la variable *Nº fármacos nuevos* por *Nº familias nuevas* o al incluir ambas, no varió la capacidad de predicción de la respuesta CVind6m por parte de los algoritmos.

Tabla 4.58. TDF: Análisis multivariante: modelos ajustados de predicción de $\Delta\log CV_{3m}$ por los algoritmos.				
Variables	B	Error típico	t	Sig.
Algoritmo Andalucía: $R^2= 0,272$				
Más de 2 fracasos previos	-0,530	0,208	-2,551	0,012
$\log_{10} CV_{\text{basal}}$	0,579	0,125	4,653	0,000
Nº familias previas	-	-	-	n.s.
Nº fármacos nuevos	0,310	0,116	2,669	0,009
GSS-Andalucía	0,283	0,094	3,021	0,003
Algoritmo ANRS-DTL: $R^2= 0,272$				
Más de 2 fracasos previos	-0,549	0,207	-2,650	0,009
$\log_{10} CV_{\text{basal}}$	0,612	0,125	4,884	0,000
Nº familias previas	-	-	-	n.s.
Nº fármacos nuevos	0,310	0,116	2,670	0,009
GSS-ANRS-DTL	0,340	0,112	3,030	0,003
Algoritmo Andalucía-DTL: $R^2= 0,305$				
Más de 2 fracasos previos	-0,494	0,203	-2,430	0,017
$\log_{10} CV_{\text{basal}}$	0,574	0,122	4,724	0,000
Nº familias previas	-	-	-	n.s.
Nº fármacos nuevos	0,261	0,115	2,270	0,025
GSS-Andalucía-DTL	0,398	0,101	3,951	<0,001
Algoritmo Visible Genetics: $R^2= 0,249$				
Más de 2 fracasos previos	-0,491	0,213	-2,300	0,023
$\log_{10} CV_{\text{basal}}$	0,581	0,126	4,597	0,000
Nº familias previas	-	-	-	n.s.
Nº fármacos nuevos	0,342	0,117	2,924	0,004
GSS-VG	0,274	0,121	2,262	0,025

n.s.: no significativo ($p>0,05$).

La sustitución de la variable *Nº fármacos nuevos* por *Nº familias nuevas* o la inclusión de ambas, supuso una mejora en la capacidad de predicción de la respuesta $\Delta\log CV_{3m}$ por parte de los algoritmos; además el valor R^2 de los modelos disminuyó o no varió.

No se realizó análisis multivariante con las dos interpretaciones del Fenotipo Virtual, pues su significación estadística p en el análisis univariante fue $>0,20$ (ver tabla 4.50).

Tabla 4.59. TDF: Análisis multivariante: modelos ajustados de predicción de $\Delta\log CV6m$ por los algoritmos estudiados.				
Variables	B	Error típico	t	Sig.
Algoritmo Andalucía: $R^2=0,158$				
Adherencia <80%	-0,617	0,291	-2,123	0,038
Nº CD4 _{basal} /ml	-	-	-	n.s.
Log ₁₀ CV _{basal}	-	-	-	n.s.
Nº fármacos nuevos	-	-	-	n.s.
GSS-Andalucía	0,287	0,122	2,357	0,022
Algoritmo ANRS-DTL: $R^2=0,239$				
Adherencia <80%	-0,574	0,279	-2,053	0,044
Nº CD4 _{basal} /ml	-0,001	0,001	-2,000	0,050
Log ₁₀ CV _{basal}	-	-	-	n.s.
Nº fármacos nuevos	-	-	-	n.s.
GSS-ANRS-DTL	0,457	0,150	3,039	0,003
Algoritmo Andalucía-DTL: $R^2=0,174$				
Adherencia <80%	-0,652	0,286	-2,278	0,026
Nº CD4 _{basal} /ml	-	-	-	n.s.
Log ₁₀ CV _{basal}	-	-	-	n.s.
Nº fármacos nuevos	-	-	-	n.s.
GSS-Andalucía-DTL	0,349	0,133	2,622	0,011
Algoritmo Visible Genetics: $R^2=0,075$				
Adherencia <80%	-0,675	0,308	-2,190	0,032
Nº CD4 _{basal} /ml	-	-	-	n.s.
Log ₁₀ CV _{basal}	-	-	-	n.s.
Nº fármacos nuevos	-	-	-	n.s.
GSS-VG	-	-	-	n.s.
Fenotipo Virtual: Interpretación CONTINUA: $R^2=0,075$				
Adherencia <80%	-0,675	0,308	-2,190	0,032
Nº CD4 _{basal} /ml	-	-	-	n.s.
Log ₁₀ CV _{basal}	-	-	-	n.s.
Nº fármacos nuevos	-	-	-	n.s.
FVSS-continuo	-	-	-	n.s.

n.s.: no significativo ($p>0,05$).

No se realizó análisis multivariante con la interpretación del Fenotipo Virtual, pues su significación estadística p en el análisis univariante fue $>0,20$ (ver tabla 4.50).

4.9. CAPACIDAD DE LOS MODELOS PARA PREDECIR LA RESPUESTA VIROLOGICA EN LOS PACIENTES TRATADOS CON LOPINAVIR/RITONAVIR.

Con el objeto de determinar si las diferencias en la capacidad de predicción de la respuesta por los distintos algoritmos se debían a la interpretación de la resistencia a Lopinavir/Ritonavir (LPV/RTV), se seleccionaron todos los pacientes tratados con este antirretroviral en su nuevo régimen. En los **127 pacientes** cuyo tratamiento incluyó LPV/RTV se calculó una media de fármacos activos en el nuevo régimen que osciló entre 1,90 y 2,35, según las reglas de interpretación aplicadas (**tabla 4.60**). En 3 de los pacientes no se dispuso del resultado del Fenotipo Virtual.

Tabla 4.60. Características descriptivas de los algoritmos.			
ALGORITMO	N	Media ± Desv. típica	Rango
GSS-Andalucía	127	2,21 ± 0,96	0-4,0
GSS-ANRS-DTL	127	2,30 ± 0,83	0,5-4,0
GSS- Andalucía-DTL	127	2,15 ± 0,90	0-4,0
GSS-Visible Genetics	124	1,90 ± 0,79	0,5-3,5
FVSS continuo	124	2,03 ± 0,63	0,05-3,20
FVSS dual	124	2,35 ± 0,73	0-4,00

4.9.1. LPV/RTV: Capacidad de predicción de la respuesta virológica por los distintos algoritmos (análisis univariante).

En la **tabla 4.61** se exponen los resultados del análisis univariante para la asociación entre los distintos modelos y la respuesta virológica al tratamiento, considerada como CV indetectable. Aunque ninguno de ellos se asoció significativamente con la supresión de la CV a los 3 meses, al analizar su asociación con la supresión de la CV a los 6 meses se observó que los algoritmos genotípicos fueron capaces de predecir esta respuesta de forma estadísticamente significativa.

Tabla 4.61. LPV/RTV: Análisis univariante para la asociación entre los distintos algoritmos y las respuestas CVind3m y CVind6m.		
ALGORITMOS	CVind3m	
	O.R. (I.C. 95%)	p
GSS-Andalucía	1,035 (0,713-1,503)	0,856
GSS-ANRS-DTL	0,889 (0,578-1,368)	0,593
GSS-Andalucía-DTL	1,285 (0,852-1,938)	0,232
GSS-VG	1,109 (0,697-1,764)	0,662
FVSS-continuo	1,398 (0,770-2,538)	0,270
FVSS-dual	1,242 (0,748-2,061)	0,402
ALGORITMOS	CVind6m	
	O.R. (I.C. 95%)	p
GSS-Andalucía	1,512 (0,986-2,320)	0,058
GSS-ANRS-DTL	1,716 (1,035-2,846)	0,036
GSS-Andalucía-DTL	2,127 (1,296-3,491)	0,003
GSS-VG	1,765 (1,013-3,076)	0,045
FVSS-continuo	1,995 (0,983-4,050)	0,056
FVSS-dual	1,679 (0,909-3,012)	0,098

En la **tabla 4.62** se exponen los resultados del análisis univariante realizado mediante regresión lineal, que muestra la asociación entre los distintos algoritmos y la variación de la CV, observándose que ninguno de los algoritmos se asoció significativamente con la diferencia de logaritmo de CV a los 3 meses del inicio del tratamiento y únicamente el algoritmo Andalucía-DTL predijo la respuesta a los 6 meses ($p=0,013$).

Tabla 4.62. LPV/RTV: Análisis univariante para la asociación entre los distintos algoritmos y las respuestas $\Delta\log CV3m$ y $\Delta\log CV6m$.					
$\Delta\log CV3m$					
ALGORITMOS	R²	B	Error típico	t	p
GSS-Andalucía	0,001	0,028	0,115	0,247	0,806
GSS-ANRS-DTL	0,000	-0,003	0,134	-0,025	0,980
GSS-Andalucía-DTL	0,014	0,163	0,124	1,317	0,190
GSS-VG	0,004	-0,096	0,145	-0,663	0,509
FVSS-continuo	0,005	-0,011	0,182	-0,058	0,954
FVSS-dual	0,006	-0,130	0,155	-0,836	0,405
$\Delta\log CV6m$					
ALGORITMOS	R²	B	Error típico	t	p
GSS-Andalucía	0,029	0,231	0,139	1,668	0,099
GSS-ANRS-DTL	0,032	0,290	0,164	1,769	0,080
GSS-Andalucía-DTL	0,064	0,372	0,147	2,534	0,013
GSS-VG	0,012	0,196	0,184	1,065	0,290
FVSS-continuo	0,014	0,270	0,234	1,152	0,252
FVSS-dual	0,000	0,041	0,206	0,200	0,842

4.9.2. LPV/RTV: Análisis univariante (otras variables).

Los resultados de los análisis univariantes relativos a la asociación entre otras variables y las distintas respuestas se exponen en la **tabla 4.63**. Como ya se explicó en apartados anteriores, todas las variables con $p < 0,20$ (resaltadas en negrita) se incluyeron inicialmente en el análisis multivariante pero posteriormente se decidió excluir todas las *Variables relativas a mutaciones en la RT y en la PR*, puesto que su efecto ya era tenido en cuenta por los propios algoritmos. Por idéntica razón, la variable *Número de fármacos activos*, calculada a partir del algoritmo de la Universidad de Stanford en base a las mutaciones de la RT y la PR, tampoco fue incluida.

Tabla 4.63. LPV/RTV: Análisis univariante para la asociación entre otras variables y las distintas respuestas (en las casillas, valor de p).				
	CVind3m	CVind6m	$\Delta\log CV3m$	$\Delta\log CV6m$
Edad	0,562	0,108	0,346	0,093
Sexo masculino	0,817	0,148	0,532	0,217
Adherencia >80%	0,803	0,176	0,696	0,044
$\log_{10} CV_{\text{basal}}$	0,059	0,533	$1,2 \cdot 10^{-6}$	$8,3 \cdot 10^{-5}$
Nº CD4 _{basal} /ml	0,400	0,519	0,552	0,702
Más de 2 fracasos terapéuticos	0,005	0,002	0,055	0,050
Nº familias previas	0,073	0,219	0,737	0,668
Nº fármacos activos	0,040	0,008	0,134	0,031
Variables relativas a mutaciones en la RT:				
Nº mutaciones RT	0,873	0,109	0,881	0,323
Nº mutaciones ITIAN	0,893	0,277	0,833	0,314
Nº mutaciones ITINAN	0,794	0,183	0,945	0,803
Nº TAMs	0,592	0,137	0,414	0,064
Nº M41L, L210W, T215Y	0,109	0,003	0,172	0,022
Nº K70R, T215F y Q219E	0,121	0,164	0,586	0,630
Variables relativas a mutaciones en la PR:				
Nº mutaciones PR	0,021	0,054	0,105	0,127
Nº mutaciones múltiples IP	0,008	0,075	0,188	0,096
Nº de L33I, V82A/F/T/S, I84V, L90M	0,020	0,054	0,091	0,140
Variables relativas al tratamiento:				
Nº fármacos	0,001	0,147	0,151	0,229
Nº fármacos nuevos	0,001	0,002	0,079	0,017
Nº familias nuevas	0,146	0,484	0,073	0,452
Nº ITIAN	0,039	0,097	0,180	0,272
Presencia de ITINAN	0,196	0,715	0,993	0,811

En las siguientes **tablas (4.64 a 4.67)** se muestra la variable relacionada con el nuevo tratamiento que fue seleccionada para ser incluida en los posteriores análisis multivariantes. Como en los apartados anteriores, dicha variable volvió a ser *Número de fármacos nuevos* para los cuatro tipos de respuesta.

Método: Introducir	B	E.T.	Wald	gl	Sig.	Exp(B)
Paso 1(a) N° ITIAN	0,281	1,079	0,068	1	0,795	1,324
Presencia de ITINAN	-0,613	1,333	0,211	1	0,646	0,542
N° familias nuevas	0,052	0,332	0,025	1	0,875	1,053
N° fármacos	-2,269	1,230	3,402	1	0,065	0,103
N° fármacos nuevos	0,801	0,261	9,428	1	0,002	2,229
Constante	4,609	2,448	3,546	1	0,060	100,425

Tabla 4.64. Variables relacionadas con el nuevo tratamiento: subanálisis multivariante para seleccionar la variable más fuertemente relacionada con la respuesta CVind3m.

Método: Introducir	B	E.T.	Wald	gl	Sig.	Exp(B)
Paso 1(a) N° ITIAN	-0,246	1,250	0,039	1	0,844	0,782
Presencia de ITINAN	0,453	1,449	0,098	1	0,755	1,573
N° familias nuevas	-0,261	0,368	0,504	1	0,478	0,770
N° fármacos	-0,472	1,233	0,147	1	0,702	0,623
N° fármacos nuevos	0,872	0,290	9,010	1	0,003	2,391
Constante	0,534	1,888	0,080	1	0,777	1,705

Tabla 4.65. Variables relacionadas con el nuevo tratamiento: subanálisis multivariante para seleccionar la variable más fuertemente relacionada con la respuesta CVind6m.

Como puede observarse en las **tablas 4.66 (a) y (b)**, cuando se analizó la variable relacionada con el nuevo tratamiento con menor p para la respuesta $\Delta\log CV3m$, ninguna de las variables mostró significación estadística pero al realizar la regresión lineal *por pasos* la primera variable que entró en el modelo fue *Nº de familias nuevas*, que fue por lo tanto seleccionada para el análisis multivariante.

Tabla 4.66 (a)

Método: Introducir. Modelo	Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados	t	p
	B	Error típico	Beta		
1 (Constante)	2,558	0,904		2,829	0,006
Nº ITIAN	0,300	0,505	0,120	0,595	0,553
Presencia ITINAN	0,437	0,586	0,098	0,746	0,457
Nº familias nuevas	0,245	0,185	0,134	1,323	0,189
Nº fármacos	-0,720	0,519	-0,257	-1,386	0,168
Nº fármacos nuevos	0,153	0,131	0,116	1,165	0,247

Tabla 4.66 (b)

Método: Por pasos. Modelo	Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados	t	Sig.
	B	Error típ.	Beta		
1 (Constante)	1,184	0,163		7,264	0,000
Nº familias nuevas	0,296	0,167	0,162	1,777	0,078
2 (Constante)	2,593	0,810		3,201	0,002
Nº familias nuevas	0,307	0,165	0,168	1,856	0,066
Nº fármacos	-0,449	0,253	-0,161	-1,774	0,079

Tablas 4.66 (a) y (b). Variables relacionadas con el nuevo tratamiento: subanálisis multivariante para seleccionar la variable más fuertemente relacionada con $\Delta\log CV3m$.

Modelo	Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados	t	p
	B	Error típico	Beta		
1 (Constante)	1,823	1,119		1,629	0,107
Nº ITIAN	0,322	0,725	0,126	0,444	0,658
Presencia ITINAN	0,628	0,854	0,130	0,735	0,464
Nº familias nuevas	-0,011	0,228	-0,005	-0,049	0,961
Nº fármacos	-0,607	0,704	-0,208	-0,863	0,391
Nº fármacos nuevos	0,388	0,167	0,253	2,324	0,022

Tabla 4.67. Variables relacionadas con el nuevo tratamiento: subanálisis multivariante para seleccionar la variable más fuertemente relacionada con la respuesta $\Delta\log CV6m$.

4.9.3. LPV/RTV: Análisis multivariante.

La capacidad de predicción de las distintos tipos de respuesta por cada uno de los algoritmos con $p \leq 0,20$ en el análisis univariante, teniendo en cuenta el efecto de otras variables (análisis multivariante), se expone en las **tablas 4.68 a 4.70**.

No se realizó análisis multivariante frente a la respuesta CVind3m, puesto que todos los algoritmos habían presentado una $p > 0,20$ en el análisis univariante. Respecto a la respuesta CVind6m, se realizó al análisis multivariante con todos los algoritmos (**tabla 4.68**), no mostrando ninguno de ellos asociación significativa con dicha respuesta en los modelos ajustados.

Sólo el algoritmo Andalucía-DTL había mostrado una $p \leq 0,20$ en el análisis univariante para la respuesta $\Delta\log CV3m$, pero en el posterior análisis multivariante (**tabla 4.69**) se encontró que no era capaz de predecir dicha respuesta con independencia de las demás variables. Tampoco los algoritmos a los que se realizó análisis multivariante frente a la respuesta $\Delta\log CV6m$ (**tabla 4.70**) se asociaron independientemente con ésta.

En resumen, se observa que, ajustando por las demás variables todos los algoritmos carecen de significación estadística en la predicción de los cuatro tipos de respuesta virológica, es decir, ninguno es capaz de predecir las diferentes respuestas con independencia del resto de las variables.

Tabla 4.68. LPV/RTV: Análisis multivariante: modelos ajustados de predicción de la respuesta CVind6m por los algoritmos estudiados.		
Variables	OR (95% IC)	p
Algoritmo Andalucía		
Edad	-	n.s.
Sexo	-	n.s.
Más de 2 fracasos previos	0,344 (0,122-0,970)	0,044
Adherencia > 80%	-	n.s.
Nº fármacos nuevos(*)	-	n.s.
GSS-Andalucía	-	n.s.
Algoritmo ANRS-DTL		
Edad	-	n.s.
Sexo	-	n.s.
Más de 2 fracasos previos	0,344 (0,122-0,970)	0,044
Adherencia > 80%	-	n.s.
Nº fármacos nuevos(*)	-	n.s.
GSS-ANRS-DTL	-	n.s.
Algoritmo Andalucía-DTL		
Edad	-	n.s.
Sexo	-	n.s.
Más de 2 fracasos previos	0,344 (0,122-0,970)	0,044
Adherencia > 80%	-	n.s.
Nº fármacos nuevos(*)	-	n.s.
GSS-Andalucía-DTL	-	n.s.
Algoritmo Visible Genetics		
Edad	-	n.s.
Sexo	-	n.s.
Más de 2 fracasos previos	0,328 (0,113-0,949)	0,040
Adherencia > 80%	-	n.s.
Nº fármacos nuevos(*)	-	n.s.
GSS-VG	-	n.s.
Fenotipo Virtual: Interpretación CONTINUA		
Edad	-	n.s.
Sexo	-	n.s.
Más de 2 fracasos previos	0,328 (0,113-0,949)	0,040
Adherencia > 80%	-	n.s.
Nº fármacos nuevos(*)	-	n.s.
FVSS-continuo	-	n.s.
Fenotipo Virtual: Interpretación DUAL		
Edad	-	n.s.
Sexo	-	n.s.
Más de 2 fracasos previos	0,328 (0,113-0,949)	0,040
Adherencia > 80%	-	n.s.
Nº fármacos nuevos(*)	-	n.s.
FVSS dual	-	n.s.

n.s.: no significativo ($p > 0,05$)

Tabla 4.69. LPV/RTV: Análisis multivariante: modelo ajustado de predicción de $\Delta\log CV_{3m}$ por los algoritmos Andalucía-DTL				
Variabes	B	Error típico	t	Sig.
Algoritmo Andalucía-DTL: $R^2= 0,276$				
Más de 2 fracasos previos	-0,718	0,203	-3,541	0,001
$\log_{10} CV_{\text{basal}}$	0,755	0,124	6,109	0,000
Nº familias nuevas	-	-	-	n.s.
GSS-Andalucía-DTL	-	-	-	n.s.

n.s.: no significativo ($p>0,05$)

Tabla 4.70. LPV/RTV: Análisis multivariante: modelos ajustados de predicción de $\Delta\log CV_{6m}$ por los algoritmos.				
Variabes	B	Error típico	t	Sig.
Algoritmo Andalucía: $R^2=0,170$				
Edad	-	-	-	n.s.
Adherencia <80%	-	-	-	n.s.
$\log_{10} CV_{\text{basal}}$	-	-	-	n.s.
Más de 2 fracasos previos	0,704	0,201	3,506	0,001
Nº fármacos nuevos	-	-	-	n.s.
GSS-Andalucía	-	-	-	n.s.
Algoritmo ANRS-DTL: $R^2=0,170$				
Edad	-	-	-	n.s.
Adherencia <80%	-	-	-	n.s.
$\log_{10} CV_{\text{basal}}$	0,704	0,201	3,506	0,001
Más de 2 fracasos previos	-	-	-	n.s.
Nº fármacos nuevos	-	-	-	n.s.
GSS-ANRS-DTL	-	-	-	n.s.
Algoritmo Andalucía-DTL: $R^2=0,170$				
Edad	-	-	-	n.s.
Adherencia <80%	-	-	-	n.s.
$\log_{10} CV_{\text{basal}}$	0,704	0,201	3,506	0,001
Más de 2 fracasos previos	-	-	-	n.s.
Nº fármacos nuevos	-	-	-	n.s.
GSS-Andalucía-DTL	-	-	-	n.s.

n.s.: no significativo ($p>0,05$).

4.10. TABLAS RESUMEN DE LOS RESULTADOS (APARTADOS 4.5 - 4.9).

A continuación se muestra el resumen de los resultados obtenidos en los análisis univariantes y multivariantes realizados en la totalidad de los pacientes (apartado 4.5) y en los distintos subgrupos frente a los cuatro tipos de respuesta estudiados (apartados 4.6 a 4.9).

En el **análisis univariante (tabla 4.71)** se observa que los algoritmos fenotípicos mostraron una menor capacidad de predicción de la respuesta que los genotípicos; entre estos últimos, Andalucía-DTL es el que predice un mayor número de respuestas en todos los grupos de pacientes. En el subgrupo de pacientes tratados con LPV se observa que ningún algoritmo es capaz de predecir las respuestas a los 3 meses; a los 6 meses sólo Andalucía-DTL predice ambas respuestas, frente a ANRS-DTL y Visible Genetics, que sólo se predicen significativamente la supresión de la CV.

Tabla 4.71: Resumen de Análisis Univariantes: algoritmos que se asocian significativamente con las respuestas ($p < 0,05$) en los distintos grupos de pacientes.				
	CVind3m	CVind6m	$\Delta\log CV3m$	$\Delta\log CV6m$
TOTAL (n = 234)	Andalucía-DTL	Todos	Andalucía ANRS-DTL Andalucía-DTL	Andalucía ANRS-DTL Andalucía-DTL Visible Genetics
ddl o TDF o LPV (n = 213)	Andalucía-DTL	Todos	Andalucía ANRS-DTL Andalucía-DTL	Andalucía ANRS-DTL Andalucía-DTL Visible Genetics
ddl (n = 133)	Andalucía Andalucía-DTL	Andalucía ANRS-DTL Andalucía-DTL Visible Genetics	Andalucía ANRS-DTL Andalucía-DTL	Andalucía ANRS-DTL Andalucía-DTL
TDF (n = 153)	Andalucía-DTL Visible Genetics	Todos	Andalucía ANRS-DTL Andalucía-DTL Visible Genetics	Andalucía ANRS-DTL Andalucía-DTL Visible Genetics
LPV (n = 127)	-	ANRS-DTL Andalucía-DTL Visible Genetics	-	Andalucía-DTL

En el **análisis multivariante (tabla 4.72)** se observa que ningún algoritmo es capaz de predecir independientemente la supresión de la CV a los 3 meses en los distintos subgrupos, con la excepción de Andalucía-DTL en el subgrupo tratado con ddl. En el subgrupo tratado con LPV ninguno de los algoritmos fue capaz de predecir las respuestas con independencia de las demás variables. Para el resto de grupos, los algoritmos genotípicos se asocian significativamente con casi todas las respuestas, especialmente los algoritmos Andalucía, ANRS-DTL y Andalucía-DTL.

Tabla 4.72: Resumen de Análisis Multivariantes: algoritmos que predicen cada respuesta con independencia del resto de las variables en los distintos grupos de pacientes.				
	CVind3m	CVind6m	$\Delta\log CV3m$	$\Delta\log CV6m$
TOTAL (n = 234)	-	Andalucía ANRS-DTL Andalucía-DTL Visible Genetics	Andalucía ANRS-DTL Andalucía-DTL	Andalucía ANRS-DTL Andalucía-DTL Visible Genetics
ddl-TDF-LPV (n = 213)	-	Andalucía Andalucía-DTL Visible Genetics	Andalucía ANRS-DTL Andalucía-DTL Visible Genetics	Andalucía ANRS-DTL Andalucía-DTL
ddl (n = 133)	Andalucía-DTL	Andalucía ANRS-DTL Visible Genetics	Andalucía ANRS-DTL Andalucía-DTL	-
TDF (n = 153)	-	Todos	Andalucía ANRS-DTL Andalucía-DTL Visible Genetics	Andalucía ANRS-DTL Andalucía-DTL
LPV (n = 127)	-	-	-	-

5. DISCUSIÓN

En estudios realizados en países que disponen de fármacos antirretrovirales se ha demostrado que la administración de una combinación de tres o más de estos fármacos se asocia con una disminución de la morbilidad y la mortalidad de los pacientes infectados por el VIH-1 (Murphy *et al.*, 2001; Vandamme *et al.*, 1998). Sin embargo, según Van Vaerenbergh *et al.* (2002), el inicio de un tratamiento antirretroviral de gran actividad (TARGA) en pacientes *naive* previene la diseminación del virus durante una media de 3 años en sólo el 60% de los pacientes. Estudios posteriores con seguimiento a más largo plazo (5 años) han mostrado mejores resultados, probablemente a causa de la mayor variedad de fármacos y presentaciones disponibles (Grabar *et al.*, 2005; Molina *et al.*, 2007). El fracaso terapéutico puede deberse a diversos factores, como la falta de actividad de la combinación administrada, una escasa adherencia al tratamiento o la transmisión de cepas resistentes (Cane, 2005) y conduce a una supresión incompleta de la carga viral (CV), permitiendo que el virus continúe su replicación. La replicación del VIH bajo presión farmacológica selecciona mutaciones de resistencia no sólo frente a los fármacos administrados, sino también frente a otros de la misma familia (resistencia cruzada), quedando limitadas las opciones de tratamiento disponibles. Por esta razón es una cuestión clave abordar la resistencia a los antirretrovirales para lograr un tratamiento efectivo frente a la infección por el VIH (Frenkel y Tobin, 2004).

Las **pruebas de resistencia** son una herramienta de gran utilidad para la elección del tratamiento antirretroviral más adecuado para cada paciente. Las pruebas genotípicas permiten detectar en el genoma del VIH la presencia de mutaciones responsables de la resistencia del virus a determinados fármacos, mientras que las pruebas fenotípicas detectan variaciones en el *fold-change* respecto a una cepa de referencia. Sin embargo, con frecuencia la resistencia no resulta sólo de una mutación concreta, sino de la interacción de un conjunto de mutaciones; si además tenemos en cuenta la gran variabilidad genética del VIH, con la presencia de un elevado número de subtipos, es fácil comprender la gran complejidad que supone la interpretación del genotipo de resistencia y la necesidad de desarrollar algoritmos de interpretación capaces de predecir de la manera más exacta posible la respuesta del paciente a los distintos fármacos existentes en el mercado (De Luca *et al.*, 2004a). Igualmente, en las pruebas fenotípicas se requieren puntos de corte clínicos para los distintos fármacos, que al basarse en

observaciones de la respuesta virológica en pacientes tratados, muestran una mayor capacidad de predicción.

En la actualidad existe un gran número de **sistemas para la interpretación de la resistencia** a los fármacos antirretrovirales (De Luca *et al.*, 2003b; Liu *et al.*, 2006; Vercauteren *et al.*, 2006); estos sistemas son actualizados regularmente, tanto los algoritmos genotípicos como los puntos de corte del fenotipo virtual. Diversos paneles de expertos han recomendado la realización de pruebas de resistencia en el manejo de pacientes VIH+ como herramienta de gran utilidad para lograr el éxito del tratamiento (Gazzard *et al.*, 2006; Hammer *et al.*, 2006; Panel de Expertos de GESIDA-Plan Nacional sobre el Sida, 2007; DHHS Panel on Antiretroviral Guidelines for Adults and Adolescents, 2006; Vandamme *et al.*, 2004).

Por otro lado, recientes estudios han reflejado la existencia de **discordancias** en la interpretación de la resistencia cuando se comparan distintos sistemas (García *et al.*, 2003; Nogales *et al.*, 2005; Zoloppa *et al.*, 2005; Bryant *et al.*, 2007), así como los factores más frecuentemente responsables de estas diferencias (Brun-Vézinet *et al.*, 2004; De Luca *et al.*, 2003a). Un estudio de Ravela *et al.* (2003) reveló que solo dos tercios de las interpretaciones realizadas mediante cuatro algoritmos diferentes (ANRS-3-02, TRUGENE VGI-6, Rega 5.5 and HIVdb-8-02) mostraron una concordancia total. La mayor parte de las discordancias se detectaron en el grupo de los ITIANs, ya que la resistencia a estos fármacos requiere de la acumulación de varias mutaciones. Sin embargo, este estudio no analizó la capacidad de los algoritmos para predecir la respuesta clínica.

Otros autores (Hales *et al.*, 2006; Loufty *et al.*, 2004; Puchhammer-Stöckl *et al.*, 2002; Scudeller *et al.*, 2003; Torti *et al.*, 2003) no sólo han evidenciado las discordancias en la interpretación de la resistencia entre algoritmos genotípicos, fenotipo real y fenotipo virtual, sino que además han investigado qué modelos muestran una mejor **correlación con la respuesta virológica**. Sin embargo, el planteamiento de estos estudios difiere en muchos aspectos (características basales de los pacientes, tamaño de la muestra, tipo de respuesta, duración, adherencia...), que pueden influir en los resultados obtenidos (Brun-Vézinet *et al.*, 2004; De Luca *et al.*, 2003b). Además, existe una especial dificultad cuando se trata de nuevos

fármacos, cuyos mecanismos de resistencia aún no han sido estudiados, y no se dispone de algoritmos de interpretación validados o puntos de corte clínicos.

En esta tesis hemos tratado de comparar distintos modelos de interpretación de la resistencia a antirretrovirales según su capacidad de predicción de la respuesta virológica. Para ello hemos recogido información de una **cohorte de pacientes VIH+ en situación de fracaso terapéutico**, a los que se administró un nuevo régimen de rescate y, tras reinterpretar su genotipo de resistencia mediante estos modelos, hemos analizado la asociación entre los *scores* de sensibilidad obtenidos y la respuesta observada, tanto de forma directa como ajustando por otras variables que podían influir en la respuesta.

Los pacientes con los que se llevó a cabo este estudio procedían de 14 centros hospitalarios de toda Andalucía. Nuestro objetivo fue crear una completa base de datos con información clínica y genotípica de un gran número de pacientes VIH+, sobre la que poder validar sistemas de interpretación ya existentes, así como desarrollar modelos matemáticos de predicción de la respuesta al tratamiento. Es difícil calcular el **tamaño de muestra** requerido para proporcionar una adecuada confianza estadística de las relaciones genotipo-respuesta. Como regla general, una muestra de 200-300 pacientes proporciona suficiente confianza para establecer una regla preliminar que recoja al menos los patrones más comunes de resistencia; sin embargo, para evaluar la presencia de mutaciones o combinaciones de mutaciones poco representativas que se espera que afecten a la respuesta son necesarias bases de datos que cuenten con un mayor número de casos (Brun-Vézinet *et al.*, 2004; De Luca *et al.*, 2004; Luna, 2004).

Nosotros hemos recogido inicialmente información de **234 pacientes**, en los que hemos estudiado la asociación entre la predicción realizada por los distintos modelos (*score*) y la respuesta virológica. Posteriormente hemos creado subgrupos para analizar esta asociación en regímenes que incluían fármacos concretos: **213** pacientes tratados con **ddl, TDF y/o LPV/RTV**, **133** pacientes con **ddl**, **153** pacientes con **TDF** y **127** pacientes con **LPV/RTV**. El tamaño de las muestras fue similar al empleado por otros autores en trabajos del mismo tipo (De Luca *et al.*, 2003a; Torti *et al.*, 2003).

En cuanto al diseño de este trabajo, se trata de un **estudio de cambio de régimen**, llevado a cabo en las condiciones habituales de práctica clínica: el tratamiento de rescate fue decidido por la unidad clínica correspondiente en función del informe de resistencias de cada paciente, generado por su laboratorio de referencia. Por tanto, la respuesta virológica de los pacientes refleja el efecto del régimen completo. Generalmente los regímenes estaban integrados por 3 fármacos (85,9%), pertenecientes a dos familias (81,2%). El 89% de los pacientes recibió uno o más fármacos nuevos. Más de la mitad de los tratamientos administrados (58,7%) incluyó familias de fármacos con las que el paciente no había sido tratado anteriormente.

La definición de **respuesta terapéutica** en la infección VIH es variable. Históricamente, se definía en base a la clínica del paciente, es decir, a la presencia de enfermedades indicadoras de SIDA. Sin embargo, esta medida de la respuesta pasó a ser poco práctica tras la aparición del TARGA, debido a la lenta progresión de la enfermedad, sobre todo en estudios de corta duración. Por tanto, hoy en día prácticamente todos los ensayos clínicos de antirretrovirales utilizan como medida de la respuesta terapéutica primaria los niveles plasmáticos de ARN del VIH (respuesta virológica) y secundariamente el recuento de linfocitos CD4 (respuesta inmunológica) (O'Brien *et al.*, 1996; Flandre *et al.*, 2004).

La **respuesta virológica** o variación de los niveles plasmáticos de ARN vírico puede medirse de distintas formas: a) **variación de la CV** o diferencia entre el nivel de ARN antes y después del tratamiento (Cabrera *et al.*, 2004; Vandamme *et al.*, 2004); b) **CV indetectable** o disminución del nivel plasmático de ARN vírico por debajo del límite de sensibilidad de la técnica en el periodo de tratamiento (Kempf *et al.*, 2002), lo que supone, con las técnicas actualmente disponibles, menos de 50 copias/ml. Según Brun-Vézinet *et al.* (2004), la elección de uno u otro tipo de respuesta dependerá de las características de la población: si se parte de pacientes pretratados con muchos fármacos, pacientes pediátricos o estudios a corto plazo este objetivo es difícil de lograr, por lo que la respuesta suele medirse mediante la variación de la CV, que al tratarse de una variable de tipo continuo aporta una información más completa sobre cómo está respondiendo el paciente al tratamiento; además estos autores resaltan que la elección de uno u otro tipo de respuesta para

valorar la capacidad de predicción de los algoritmos puede dar lugar a discordancias. Sin embargo, más recientemente diversos paneles de expertos (DHHS Panel on Antiretroviral Guidelines for Adult and Adolescents, 2007; Hammer *et al.*, 2006; Panel de Expertos de GESIDA y Plan Nacional sobre el SIDA, 2007) han coincidido al considerar que el objetivo del TARGA hoy en día ha de ser alcanzar una supresión de la replicación viral lo más rápida y duradera posible. Aun así, con el fin de obtener una información más completa, en este trabajo hemos estudiado **ambas respuestas**.

La **duración del estudio o *endpoint*** puede influir en la asociación encontrada entre los distintos algoritmos y la respuesta: así, aunque en los estudios a corto plazo (2-8 semanas) la respuesta se correlaciona de forma más directa con la actividad de los fármacos, los estudios a largo plazo (24-48 semanas) poseen mayor relevancia clínica, pero también el inconveniente de verse influidos en mayor grado por otros factores ajenos al propio tratamiento, especialmente la pérdida de adherencia y la interrupción o el cambio del tratamiento (De Luca y Perno, 2003).

A nivel basal los pacientes estudiados presentaron una CV basal media, expresada en \log_{10} del número de copias/ml, de $4,09 \pm 0,78$. Ninguno de ellos era *naive*, habiendo recibido tratamiento previo con dos familias de antirretrovirales como media. El 80% de los pacientes había presentado dos o más fracasos terapéuticos; casi un 90% tenía al menos 3 mutaciones en la RT y de éstos, la mitad presentaba además al menos 5 mutaciones en la PR. Aunque no se esperaba que los pacientes con niveles más elevados de CV basal logaran una CV indetectable a los 3 meses de tratamiento (el primer punto de corte seleccionado), sí era factible que esto ocurriera en el segundo punto de corte, es decir, a los 6 meses de tratamiento.

Nosotros hemos realizado este estudio tanto a **corto** como a **largo plazo**, midiendo la respuesta (CV indetectable y diferencia de CV) a los **3 y 6 meses** del inicio de la nueva pauta de tratamiento. Aunque en los pacientes con CV basal más elevada era difícil lograr la supresión de la CV en sólo 3 meses de tratamiento, incluso con un *score* óptimo, sin embargo, sí cabía esperar un descenso de su CV, como marcador pronóstico de dicha respuesta. En nuestro caso en un 38% de los pacientes se consiguió la supresión de la CV a los 3 meses de tratamiento,

aumentando hasta un 58% el porcentaje de los pacientes en los que la CV disminuyó al menos 1 log en este periodo. Al analizar la evolución a los 6 meses de iniciar el tratamiento, observamos que la proporción de pacientes con CV indetectable aumentó hasta un 45%, mientras que no varió el porcentaje de pacientes con una disminución de la CV ≥ 1 log con respecto al periodo de 3 meses.

Uno de los problemas que nos encontramos al medir la respuesta como diferencia de CV es que la medida de ésta en cada punto de corte está sesgada por los **límites de sensibilidad** de las distintas técnicas utilizadas. Así, por debajo del límite inferior de detección de la técnica empleada no podemos conocer el valor exacto de la CV, lo que lleva a una observación incompleta de la reducción de CV o **reducción censurada** (Flandre *et al.*, 2002).

Para el análisis de los datos censurados se han propuesto distintos métodos. El **crude method** consiste en otorgar el valor del límite de detección a todos los valores de CV inferiores a éste (Flandre *et al.*, 2005) y es el método que se ha aplicado en este trabajo, en el que se asignó a la CV indetectable el valor del límite de detección de la técnica empleada en cada centro participante: en unos casos fue 400 copias/ml, en otros 200 copias/ml y en las más sensibles llegó a 50 copias/ml. El inconveniente de este método es que puede infravalorar la reducción de ARN, al considerar que el paciente llega a ese límite, cuando en realidad el paciente ha podido presentar una reducción mayor. Es decir, proporciona una estimación de la reducción de la CV sesgada y puede enmascarar diferencias estadísticas significativas (Marschner *et al.*, 1999).

A pesar de que las técnicas más modernas para cuantificar la CV son más sensibles, sigue siendo alto el porcentaje de datos censurados, debido a que también hay terapias antirretrovirales más potentes que llevan a conseguir cargas virales más bajas en un elevado número de pacientes. Por consiguiente, el **crude method** no es siempre el método más apropiado ni la diferencia de logaritmo de la CV el mejor **endpoint** para medir el éxito del tratamiento.

La medida de la respuesta como CV indetectable no se ve afectada por el problema de los datos censurados; sin embargo, proporciona menos información acerca del grado de respuesta, especialmente en los pacientes con elevados niveles

basales de CV. Otro inconveniente de la respuesta CV indetectable es el amplio rango de límites de indetectabilidad, que como ya se ha dicho, en nuestro caso oscila entre 50 y 400 copias/ml.

Los modelos de interpretación de la resistencia que hemos valorado en función de su capacidad para predecir la respuesta virológica son cuatro algoritmos genotípicos, desarrollados previamente por distintos grupos de investigación, y dos interpretaciones del fenotipo virtual.

Los **algoritmos genotípicos** realizaron una interpretación de las mutaciones de resistencia detectadas mediante el sistema Trugene HIV-1 Genotyping Kit (Visible Genetics Inc.) en las dos regiones amplificadas del gen *pol* del VIH: los codones 6-95 en la proteasa y los codones 38-249 en la transcriptasa inversa.

El **algoritmo Andalucía** fue consensuado por todos los centros integrantes de la Red Andaluza para el Estudio de Resistencias a Antirretrovirales (**RAERA**) y es para su aplicación en el ámbito de nuestra Comunidad Autónoma. Como ya se ha explicado en el apartado *Pacientes y Métodos*, sus reglas de interpretación procedían de diversas fuentes: por ejemplo, las reglas de IPs, de la Agence Nationale de Recherches sur le SIDA (ANRS); las reglas de ITINANs, de la Universidad de Stanford; y las reglas de ITIANs, de diversos trabajos científicos, como los de Underwood *et al.* (2005), Whitcomb *et al.* (2003) o el algoritmo del Detroit Medical Center (<http://www.ablsa.com/>).

Por otra parte, en los últimos años nuestro grupo ha desarrollado reglas de interpretación para didanosina (ddl), tenofovir (TDF) y lopinavir/ritonavir (LPV/r). Estas reglas se derivaron a partir de la misma base de datos de pacientes utilizada para esta tesis, con una metodología basada en el trabajo de Brun-Vézinet *et al.* (2004), considerando como medida de la respuesta la diferencia de logaritmo de la CV a los 3 meses de tratamiento. Según estas reglas consideramos que existe resistencia a **ddl** cuando el $score$ $M41L + D67N + V118I + L210W + T215Y - K70R - M184V \geq 2$ (Alvarez *et al.*, 2004; Alvarez *et al.*, 2005), puesto que las mutaciones K70R y M184V tienen un efecto beneficioso, al aumentar la sensibilidad a ddl. Por otro lado, para **TDF** se consideró resistencia cuando $M41L + E44D + D67N + V118I + L210W + T215Y - M184V/I \geq 4$ y actividad disminuida si esta ecuación era igual a 3

(Alvarez *et al.*, 2005). En el caso de **LPV/RTV** el score resultó de la suma de $L10F/I/R/V + M46L + I54V + V82A/F/S/T + I84V \geq 3$ (Martínez, 2004). Hemos denominado **algoritmo Andalucía-DTL** al modelo generado al sustituir las reglas que utilizaba el algoritmo Andalucía por las reglas de interpretación de ddl, TDF y LPV/RTV de nuestro grupo. Por lo tanto ambos algoritmos sólo se diferencian en las reglas de interpretación de estos tres fármacos.

Dentro de la **ANRS** francesa, el grupo AC11 trabaja sobre la resistencia en VIH-1 y elabora algoritmos de interpretación para guiar la elección del tratamiento antirretroviral. Estos algoritmos se basan principalmente en estudios de correlación entre mutaciones de resistencia a fármacos y respuesta virológica en pacientes con tratamiento antirretroviral. Las reglas de interpretación se presentan en tablas con listas de mutaciones o combinaciones de mutaciones que confieren resistencia o posible resistencia genotípica frente a los diferentes antirretrovirales. Estas tablas son actualizadas anualmente y están disponibles a través de Internet (www.hivfrenchresistance.org).

El **algoritmo ANRS-DTL** se construyó a partir del algoritmo Andalucía, sustituyendo sus reglas de interpretación de ddl, TDF y LPV por las reglas de la ANRS. Así, para **ddl**, se consideró resistencia cuando $M41L + T69D + L74I/V + T215Y/F + K219Q/E - K70R - M184V \geq 2$ (Marcelin *et al.*, 2004; Capdepon *et al.*, 2004); para **TDF**, cuando $M41L + E44 + D67N + T69DNS + L74V + L210W + T215Y/F \geq 6$ y actividad disminuida cuando esta suma era 3-5 (Masquelier *et al.*, 2004); para **LPV/RTV**, si $L10F/I/R/V + K20M/R + L24I + L33F + M46I/L + I50V + F53L + I54M/L/T/V + L63P + A71I/L/V/T + G73S + V82A/F/S/T + I84V + L90M \geq 8$ y actividad disminuida cuando esta suma era 6-7 (Calvez *et al.*, 2001; Chantret *et al.*, 2002, Masquelier *et al.*, 2002).

GuideLines[®] Rules es el nombre de un complejo algoritmo desarrollado y actualizado regularmente por **Visible Genetics Inc.** (Siemens), que se encuentra incorporado al software del sistema TRUGENE[™] HIV-1 Genotyping Kit, empleado en nuestro laboratorio para realizar la secuenciación del genoma del VIH. Nosotros utilizamos la **versión 6.0**, instalada en el software en el momento en el que se realizó el genotipado de los pacientes. Una vez realizada la secuenciación, el software compara la secuencia obtenida con la de una cepa consenso y realiza una

interpretación de las mutaciones de resistencia a través de las *GuideLines*[®]. El informe emitido clasifica al fármaco en tres posibles categorías: “Resistencia”, “Resistencia parcial” y “No evidencia de resistencia”.

Las pruebas de resistencia fenotípicas se basan en la medida directa de la sensibilidad del VIH a los antirretrovirales; sin embargo, su realización es muy compleja y laboriosa, por lo que sólo están disponibles en laboratorios comerciales a los que se deben derivar las muestras para su procesamiento. El **fenotipo virtual** (Larder *et al.*, 2000a) es un sistema fenotípico de interpretación de la resistencia disponible desde el año 2001 a través de la empresa **Virco** (*Johnson and Johnson Corp.*). Este sistema predice de forma cuantitativa la sensibilidad viral, comparando la secuencia de la cepa del paciente con las secuencias de una gran base de datos que cuenta con información de unos 100.000 genotipos y fenotipos y posee unos 32.000 emparejamientos genotipo-fenotipo. Inicialmente contaba sólo con puntos de corte técnicos, pero posteriormente se fueron estableciendo puntos de corte biológicos y, en estos últimos años, puntos de corte clínicos para la mayoría de los antirretrovirales, con la ventaja de tener una mayor correlación con la respuesta clínica y mejorando así la capacidad de predicción de este sistema (www.vircolab.com).

Con el fin de comparar la capacidad de predicción de los distintos sistemas de interpretación nosotros realizamos una **transformación del resultado** obtenido para cada fármaco del tratamiento en un valor numérico **entre 0 y 1**, tal como han hecho otros autores (De Luca *et al.*, 2004a; Torti *et al.*, 2003). Cuando se esperaba “resistencia” a un fármaco del régimen según un algoritmo genotípico se puntuó como 0, cuando se esperaba “actividad disminuida” (o “resistencia parcial”, según las *GuideLines*) se puntuó como 0,5 y cuando se esperaba que existiera “sensibilidad” o “no evidencia de resistencia” se puntuó como 1. Para calcular el **score de sensibilidad fenotípica (FVSS)** se realizaron dos interpretaciones del informe del fenotipo virtual: una interpretación dual (sensible=0; resistente=1) y una interpretación continua, es decir, a cada fármaco se le asigna cualquier valor entre 0 y 1, según la proporción de casos en los que el genotipo estudiado se asocia con susceptibilidad fenotípica a dicho fármaco. Aunque podría considerarse que la comparación de una variable continua (FV continuo) con variables de 2 (FV dual) o 3

categorías (algoritmos genotípicos) podría suponer un sesgo, con la interpretación continua del FV pretendíamos comprobar si es posible “afinar” más en la predicción fenotípica de la respuesta que con el uso de un resultado dicotómico (sensible/resistente) y cuál de las interpretaciones predecía mejor la respuesta virológica.

La **suma aritmética** del valor obtenido por cada fármaco del régimen es el **score total**, al que hemos denominado **GSS** para los algoritmos genotípicos o **FVSS** para las interpretaciones del fenotipo virtual. Cuando consideramos todos los pacientes, los *scores* que nosotros obtuvimos oscilaron entre 1,78 según el algoritmo de Visible Genetics (el más conservador) y 2,40 según la interpretación dual del Fenotipo Virtual (el menos conservador), no existiendo variaciones destacables cuando seleccionamos posteriormente los distintos subgrupos de pacientes. Aunque el *score* total expresa el número de fármacos que se espera sean activos según una determinada interpretación, no es capaz por sí solo de predecir el éxito del tratamiento, puesto que no tiene en cuenta el **historial terapéutico** del paciente, es decir, los fármacos con los que ha sido tratado antes del estudio de resistencias. Para este trabajo, nosotros no disponíamos de esa información, por lo que no se pudo incluir en el análisis multivariante. Las técnicas de secuenciación disponibles en la actualidad sólo son capaces de detectar mutaciones presentes en al menos el **10-20%** de los virus circulantes, lo que supone una limitación importante para las pruebas de resistencia genotípicas y para el fenotipo virtual, basado también en la secuenciación del ARN vírico. La falta de presión farmacológica en el momento de realizar la pruebas de resistencia puede llevar a infravalorar la presencia de **variantes minoritarias** con mutaciones asociadas a resistencia, que se mantienen en los reservorios y pueden volver a seleccionarse ante la presencia de determinados fármacos, influyendo en la respuesta virológica (Van Laethem *et al.*, 2002). En este sentido, nuestro grupo está investigando la prevalencia de variantes minoritarias portadoras de mutaciones como K103N o M184V mediante PCR alelo-específica a tiempo real, cuya sensibilidad permite detectar estas mutaciones en el 1% de los virus circulantes (Álvarez *et al.*, 2007).

A continuación se analizó la asociación entre cada uno de los *scores* del tratamiento de rescate y la respuesta virológica observada. La **metodología**

estadística seguida para estudiar la capacidad de predicción de los algoritmos también es diferente según midamos uno u otro tipo de respuesta, como ya se ha explicado en el apartado *Pacientes y Métodos*: así, la asociación entre los distintos **scores** y la diferencia de CV se analizó mediante **regresión lineal** (De Luca *et al.*, 2003a), mientras que la **regresión logística** se aplicó cuando la respuesta se medía como CV indetectable (Cabrera *et al.*, 2004; Torti *et al.*, 2003). En ambos casos realizamos en primer lugar un análisis **univariante**, para valorar la asociación entre cada algoritmo y respuesta. Cuando esta asociación mostraba una significación $p \leq 0,20$ se realizaba a continuación un análisis **multivariante**, con el fin de determinar la capacidad de predicción de los algoritmos una vez descontado el efecto de otras variables que también podían influir en la respuesta. Algunos autores, como Gianotti *et al.* (2004) o De Luca *et al.* (2003a) realizaron el análisis multivariante de una forma más “permissiva”: no llevaron a cabo una preselección sino que incluyeron todos los algoritmos y covariables, con independencia de su significación estadística en el análisis univariante. Por el contrario, otros autores son muy “estrictos”, estableciendo una $p \leq 0,5$ o $p \leq 0,10$ en el análisis univariante como requisito de inclusión en el multivariante (Loufty *et al.*, 2004). Nosotros, al igual que Torti *et al.* (2003) o Pellegrin *et al.* (2007) hemos seguido un camino intermedio, es decir, con preselección de algoritmos y variables pero siendo menos estrictos ($p \leq 0,20$), ya que de esta manera evitamos perder algoritmos o variables potencialmente relevantes en la predicción de la respuesta.

En el análisis **univariante**, a los **3 meses** el único algoritmo que se asoció significativamente con la respuesta CVind3m fue Andalucía-DTL ($p=0,004$), lo que puede deberse a que sus reglas fueron derivadas de esta misma población; sin embargo, al medir la respuesta como $\Delta\log CV3m$ encontramos más algoritmos capaces de predecir la respuesta: Andalucía ($p=0,016$), ANRS-DTL ($p=0,032$) y Andalucía-DTL ($p=0,001$). Esto puede deberse a que se trata de un periodo muy corto de tiempo para que los pacientes con mayores niveles de CV consigan que ésta disminuya por debajo del límite de detección de la técnica, aún cuando el tratamiento de rescate sea efectivo; por ello, la capacidad de predicción mejoró cuando medimos la respuesta de forma continua, es decir, como $\Delta\log CV3m$. A los **6 meses** encontramos que los algoritmos mejoraron su capacidad de predicción, asociándose todos ellos de forma significativa con la respuesta CVind6m ($p < 0,05$),

lo que puede explicarse por el mayor tiempo transcurrido desde el inicio del tratamiento de rescate, suficiente para que un régimen activo logre la indetectabilidad de la CV aunque a nivel basal ésta fuera elevada. Por otro lado, aunque todos los algoritmos genotípicos fueron capaces de predecir la respuesta $\Delta\log CV_{6m}$, ninguna de las interpretaciones fenotípicas se asoció significativamente con esta respuesta.

Hemos visto previamente que los algoritmos Andalucía, Andalucía-DTL y ANRS-DTL sólo se diferencian en la interpretación de la resistencia a **ddl, TDF y LPV/RTV**. Puesto que 213 de los 234 pacientes (91%) fueron tratados con uno o más de estos fármacos (ddl 55%, TDF 65,9% y LPV/RTV 54,2%), al comparar entre sí estos tres algoritmos estábamos comparando en realidad sus reglas para interpretar la resistencia a ddl, TDF y LPV/RTV. De igual modo, y debido a que estos fármacos fueron los más utilizados, la capacidad de predicción de las *GuideLines* y el fenotipo virtual también depende en gran medida de cómo interpretan la resistencia a estos tres fármacos en particular.

Además del genotipo, nosotros analizamos diversas **variables** que, en mayor o menor medida, podían estar **relacionadas con la respuesta** al tratamiento y que, por tanto, afectarían a la capacidad de predicción de los sistemas de interpretación: el recuento de linfocitos CD4, la carga viral basal, la adherencia, la historia terapéutica previa o las características del nuevo tratamiento (Brun-Vezinet *et al.*, 2003). Algunas de ellas no pudieron ser recogidas en la totalidad de los pacientes, como la adherencia o el recuento de linfocitos CD4.

El **recuento basal de linfocitos CD4** y la **carga viral basal** tienen valores predictivos independientes de la progresión de la enfermedad; el primero indica, además, el riesgo que pueden tener los pacientes de desarrollar episodios oportunistas y el momento de iniciar las profilaxis de éstas. Existe una buena correlación entre la respuesta virológica, la respuesta inmunológica y la respuesta clínica, definida como restauración de la inmunidad celular, retraso de la progresión de la enfermedad y aumento de la supervivencia (Van Left *et al.*, 2005). En este trabajo dispusimos del recuento basal de linfocitos CD4 en 168 pacientes, con una media de 351 CD4/ml, valor que aumentó hasta 373 CD4/ml a los 3 meses de tratamiento y 395 CD4/ml a los 6 meses. En el análisis univariante no encontramos

una asociación significativa ($p \leq 0,05$) entre los niveles basales de CD4 y cualquiera de las respuestas, tanto a los 3 como a los 6 meses; por el contrario la CV basal sí se asoció significativamente con la respuesta a los 3 y 6 meses, tanto si ésta se medía como CV indetectable o como diferencia de logaritmos. Al igual que Torti *et al.* (2003), nosotros tampoco encontramos una asociación estadísticamente significativa entre el recuento basal de linfocitos CD4 y la supresión de la CV por debajo de 400 copias/ml pero sí entre la CV basal y dicha respuesta.

La **adherencia** ha sido descrita en diversos trabajos como un factor primordial en la respuesta al tratamiento. En un estudio de Moore *et al.* (2005) con 1527 pacientes *naïve*, se detectó un mayor porcentaje de mortalidad en los pacientes con falta de adherencia al tratamiento, puesto que tenían más probabilidad de desarrollar una respuesta inmunológica y virológica incompleta. Por esta razón, a nivel hospitalario se están implantando diversas estrategias para mejorar la adherencia y el cumplimiento del TARGA en los pacientes infectados por el VIH (Codina *et al.*, 2004; Gordon, 2006; Harman *et al.*, 2005). Debido a su influencia sobre la respuesta, la adherencia puede afectar a la capacidad de predicción de los algoritmos: así, en un estudio realizado sobre 91 pacientes con adherencia conocida, en los 53 pacientes con adherencia al tratamiento 9 de 11 sistemas genotípicos para la interpretación de resistencias se asociaron significativamente con la variación de CV a los 6 meses, mientras que en el subgrupo de 38 pacientes sin adherencia al tratamiento sólo un sistema fue capaz de predecir la respuesta (De Luca *et al.*, 2003a).

Para valorar el grado de adherencia nosotros consideramos dos categorías: **más del 80% y menos del 80%** de adherencia. Dispusimos de información sobre esta variable en 176 pacientes (75% del total), de los cuales un 78,4% presentó una adherencia superior al 80%. Sin embargo, en el análisis univariante no encontramos una asociación estadísticamente significativa entre la adherencia y ninguna de las respuestas. Esto puede deberse al método que se empleó para evaluar este parámetro. Las evaluaciones de la adherencia de los pacientes no son siempre comparables, ya que se emplean diferentes métodos, con distinta sensibilidad y especificidad: medida de concentraciones plasmáticas de fármacos, recuento de medicación sobrante, entrevistas, cuestionarios, etc. (Knobel, 2002). En nuestro

caso, al tratarse de un estudio retrospectivo en el que participaron muchos centros, no podemos asegurar que el método aplicado en cada centro fuera el idóneo.

Un estudio de Vergne *et al.* (2006) mostró diferente grado de discordancia entre algoritmos según se trataba de pacientes *naive* o pacientes pretratados: en los pacientes *naive* las principales discordancias se observaron en los fármacos IPs, debido sobre todo a la presencia de polimorfismos en cepas de subtipos no-B, mientras que en los pacientes pretratados la mayoría de las discordancias se debieron a la predicción de los ITIANs, confirmando lo que ya habían descrito Ravela *et al.* (2003). Nosotros seleccionamos para este trabajo sólo pacientes con al **menos un fracaso terapéutico previo** y encontramos que casi la mitad (46%) de los pacientes había sufrido al menos 3 fracasos. El número de fracasos se asoció significativamente con el incremento de la prevalencia de ciertas mutaciones de resistencia a ITIANs (M41L, V118I y L210W) e IPs (M46I/L, I54L/M/T/V, V82A/F/T/S, I84V y L90M), así como un descenso significativo de K70R y M184VI conforme aumentaba el número de fracasos terapéuticos previos sufridos por los pacientes. Las mutaciones M41L y L210W de la RT pertenecen a la ruta 1 de las TAMs, mientras que la mutación V118I parece aumentar el grado de resistencia a AZT y D4T conferida por las TAMs, así como la resistencia cruzada frente a otros ITIANs y, según un estudio publicado recientemente (Zaccarelli *et al.*, 2007), su aparición tras un fallo terapéutico podría ser un marcador de mal pronóstico. Por su parte, las mutaciones primarias M46I/L, I54L/M/T/V/S, V82A/F/T/S, I84V y L90M son comunes a la mayoría de los IPs y su sucesiva acumulación, junto con otras mutaciones, puede conducir a la aparición de resistencia cruzada frente a varios fármacos de esta familia.

En el análisis univariante, encontramos una asociación estadísticamente significativa entre el hecho de haber sufrido más de dos fracasos terapéuticos previos y la respuesta virológica, tanto a los 3 como a los 6 meses, de tal forma que un aumento en el número de fracasos previos se asoció con menores descensos de la CV ($p < 0,05$) o menor probabilidad de alcanzar una CV por debajo del límite de detección de la técnica ($p < 0,0001$).

El **número de fármacos activos** fue calculado a partir del **HIVdb Program**, de la **Universidad de Stanford**, debido a que era un algoritmo “externo” (distinto a

los que íbamos a comparar), actualizado regularmente, el de mayor relevancia a nivel internacional y el más empleado como referencia en los trabajos de los investigadores de este campo. La secuencia genética o bien las mutaciones detectadas se introducen en la página web (<http://hivdb.stanford.edu>) y son comparadas con una secuencia consenso del subtipo B (Shafer *et al.*, 2000). El algoritmo HIVdb asigna una puntuación de penalización a cada mutación de resistencia, establecida a partir de publicaciones científicas relevantes, en las que se relaciona genotipo con fenotipo, genotipo con respuesta clínica, genotipo con respuesta virológica a un nuevo régimen y genotipo con historia terapéutica previa. Por el contrario, las mutaciones que producen hipersensibilidad a determinados fármacos o se asocian con reversión de la resistencia puntúan de forma negativa. El *score* total de cada fármaco es la suma de puntos (positivos o negativos) correspondientes a todas las mutaciones. Según el *score*, el programa asigna a cada fármaco una de las siguientes categorías: “susceptible”, “posible bajo nivel de resistencia”, “bajo nivel de resistencia”, “resistencia intermedia” y “alto nivel de resistencia” (Liu *et al.*, 2006).

Para cada uno de los pacientes nosotros sólo tuvimos en cuenta cuántos fármacos, entre los disponibles en el momento del estudio, eran **totalmente activos** según el algoritmo de la Universidad de Stanford, es decir, qué número de fármacos entraban dentro de la categoría “susceptible”. Con ello pretendíamos tener un indicador acerca del estado basal de la población, en cuanto a su susceptibilidad a los antirretrovirales disponibles, ya que este factor puede influir en la capacidad de predicción de los algoritmos (Vergne *et al.*, 2006; Brun-Vézinet *et al.*, 2004). En nuestro caso obtuvimos una mediana de 2 fármacos activos según el algoritmo de Stanford. Aunque casi la mitad de los pacientes (48,3%) sería susceptible a 3 o más fármacos, también se observó que un 30,3% mostraría algún grado de resistencia a todos ellos. En el análisis univariante el número de fármacos activos se asoció significativamente con el descenso de la CV y el logro de una CV indetectable (tanto a los 3 como a los 6 meses).

Otra variable que estudiamos fue el **número de familias previas**, es decir, con cuántas familias de antirretrovirales había sido tratado el paciente antes de comenzar este estudio. Esta variable podía influir en la respuesta al tratamiento, ya

que es probable que las cepas de pacientes pretratados con más familias de antirretrovirales acumulen mutaciones en mayor cantidad y frente a más fármacos, lo que podría dificultar la elección de un TARGA efectivo. Sin embargo, nosotros no encontramos una asociación significativa entre esta variable y la respuesta. Entre las distintas **variables relativas a mutaciones en la RT o en la PR** observamos una asociación significativa de las variables “Nº de TAMs” y “Nº de mutaciones M41L, L210W y T215Y” con la respuesta, así como de todas las variables relativas a mutaciones en la PR.

Como ya se ha comentado, el objetivo del **tratamiento de rescate** es conseguir de nuevo la indetectabilidad de la CV, para lo cual el Panel de Expertos de GESIDA-Plan Nacional sobre SIDA (2008) recomienda utilizar al menos dos nuevos fármacos antirretrovirales totalmente activos según la prueba de resistencias, que pertenezcan a clases farmacológicas diferentes, acompañados de otros que el paciente puede haber recibido anteriormente, pero que conservan cierto grado de actividad antiviral.

En este estudio el 99% de los pacientes recibió un tratamiento constituido por 3 o más fármacos, pertenecientes al menos a 2 familias (90%); un 70% de estos tratamientos incluía 2 fármacos que los pacientes no habían recibido previamente y un 57%, al menos una familia nueva. Los ITIANs estuvieron presentes en todos los tratamientos de rescate, generalmente 2 (75%), mientras que los ITINANs se administraron en el 21% y los IPs en el 75% de éstos.

Nosotros estudiamos diversas variables relativas a este nuevo tratamiento, con el fin de valorar su posible relación con la respuesta virológica. Encontramos que las variables “Nº de fármacos nuevos” y “Nº de ITIANs” se asociaban con los dos tipos de respuesta (CV indetectable y variación de CV), tanto a los 3 como a los 6 meses del comienzo del nuevo régimen. Por el contrario, la variable categórica “Presencia de ITINAN” no se asoció con ninguna de ellas.

Mediante distintos subanálisis multivariantes se seleccionó la variable más estrechamente relacionada con cada una de las respuestas (menor valor de *p*), que fue en todos los casos la variable “**Nº de fármacos nuevos**”. El hecho de que en este subanálisis pierdan fuerza las variables “Nº de familias nuevas” frente a “Nº de

fármacos nuevos”, puede deberse a que en el momento del estudio habían sido autorizados fármacos pertenecientes únicamente a tres familias de antirretrovirales (ITIANs, ITINANs e IPs); sólo el 2% de los pacientes recibió ENF (entonces bajo Programa de Acceso Expandido). Por tanto, era difícil administrar fármacos de familias nuevas a pacientes con varias líneas de tratamiento previas. Sin embargo, si repitiéramos este estudio con los fármacos disponibles hoy día, probablemente la variable “Nº de familias nuevas” tendría más peso que “Nº de fármacos nuevos”, debido a la existencia de más familias de antirretrovirales (inhibidores de la entrada, la fusión y la integrasa).

Puesto que, como hemos visto, existe un gran número de variables potencialmente relacionadas con la respuesta virológica, es importante valorar la capacidad de predicción de los modelos una vez descontado el efecto de estas variables. En el **análisis multivariante** encontramos que ninguno de los algoritmos fue capaz de predecir con independencia de otras variables la **supresión de la CV** a los 3 meses, aunque a los 6 meses todos los algoritmos genotípicos fueron capaces de predecir esta respuesta. Cuando medimos la respuesta como **variación de CV**, sólo los algoritmos genotípicos se asociaron independientemente con la respuesta a los 3 meses, pero al aumentar el *endpoint* a 6 meses todas las interpretaciones, incluidas las fenotípicas fueron capaces de predecir la respuesta.

Con el objeto de estudiar la capacidad de predicción de las reglas para ddl, TDF y LPV/RTV realizamos **cuatro subgrupos de pacientes**, cuyo tratamiento incluía **ddl (n=133)**, **TDF (n=153)**, **LPV/RTV (n=127)** o **cualquiera de los tres fármacos (n=213)**. Si las reglas para ddl eran válidas, al aplicarlas al grupo de ddl-TDF-LPV/RTV, debía mejorar o mantener su capacidad para predecir la respuesta, ya que existía una mayor proporción de pacientes en tratamiento con ddl que en la población inicialmente estudiada; por la misma razón, al aplicarlas al subgrupo tratado con ddl, debían mejorar aún más. El mismo razonamiento se aplicó para las reglas de TDF y LPV/RTV.

Entre todos los modelos estudiados, el **algoritmo Andalucía-DTL** es el que predijo más tipos de respuesta en el **análisis univariante** realizado en todos los grupos de pacientes, considerando tanto la respuesta CV indetectable como variación de CV. Únicamente no mostró una asociación significativa dentro del

subgrupo de **LPV/RTV** con la respuesta a los 3 meses, tanto si era expresada como variación de CV o como CV indetectable, respuestas que tampoco pudieron predecir los demás modelos en este subgrupo; sin embargo, al aumentar el *endpoint* hasta 6 meses este algoritmo mostró una asociación significativa con ambas respuestas, siendo el único capaz de predecir la variación de CV a los 6 meses. En el análisis multivariante el algoritmo Andalucía-DTL siguió siendo capaz de predecir la mayor parte de las respuestas; incluso en el subgrupo tratado con ddl, en el que los demás modelos no mostraron una asociación significativa con la indetectabilidad a los 3 meses, Andalucía-DTL sí lo hizo. La aparente superioridad del algoritmo Andalucía-DTL probablemente está favorecida por el hecho de que sus reglas de interpretación se derivaron a partir de los **mismos pacientes (y genotipos)** con los que hemos realizado este trabajo. Por tanto, sería fundamental realizar la validación clínica de estas reglas en una base de datos diferente, tal como indican Brun-Vézinet *et al.* (2004) o Costagliola *et al.* (2005).

El desarrollo de algoritmos para interpretar el genotipo de resistencia de **LPV/RTV** es complicado. Desde la comercialización de Kaletra[®], distintos autores han publicado algoritmos de interpretación para LPV/RTV. Kempf *et al.* (2001) describieron 11 mutaciones en el gen de la proteasa relacionadas con una sensibilidad reducida a LPV/RTV y definieron un *score* para LPV. Posteriormente se han ido proponiendo sucesivas modificaciones (Parkin *et al.*, 2003; Johnson *et al.*, 2005; recientes actualizaciones de los algoritmos de la ANRS y la Universidad de Stanford). En nuestro estudio, al seleccionar el grupo de pacientes tratados con LPV/RTV (n= 127) **no observamos una buena correlación** entre los modelos de interpretación y la respuesta. En el análisis univariante ninguno fue capaz de predecir la respuesta a los 3 meses; a los 6 meses el algoritmo Andalucía-DTL se asoció con ambas respuestas, mientras que ANRS-DTL y Visible Genetics sólo se asociaron con CV indetectable. Sin embargo, al ajustar por otras variables (análisis multivariante) ningún modelo mantuvo su capacidad de predicción.

Cuando comparamos los resultados en el subgrupo de LPV/RTV con los que habíamos obtenido en el conjunto total de pacientes o el subgrupo de ddl-TDF-LPV vimos que en el subgrupo de LPV/RTV la mayoría de los modelos perdían su capacidad predictiva, lo que podía deberse a que tanto los distintos algoritmos

genotípicos para LPV/RTV como los puntos de corte del fenotipo virtual ($IC_{50}=2,5$ fold change- punto de corte biológico) debían ser perfeccionados. Con posterioridad a nuestro estudio, la ANRS francesa ha ido actualizando regularmente sus algoritmos, incluido el de LPV/RTV (<http://www.hivfrenchresistance.org>) pero los cambios sólo afectan a mutaciones de baja prevalencia en nuestro estudio (V32I, I47A y L76V), por lo que probablemente la capacidad de predicción del algoritmo de 2007 no variaría significativamente con relación al que nosotros hemos empleado. Las *GuideLines* también han introducido más versiones (la última es la v.12.0), cuya efectividad debe ser evaluada. Por otro lado, la versión del fenotipo virtual disponible cuando realizamos este estudio aplicaba **puntos de corte biológicos**, introducidos por VIRCO en enero de 2001, mientras que el actual sistema *VircoType* (nueva versión del fenotipo virtual) ya incorpora **puntos de corte clínicos (CCO)** para gran parte de los antirretrovirales aprobados, que interpretan la resistencia de una forma continua (www.vircolab.com). Concretamente, para LPV/RTV actualmente se consideran dos puntos de corte clínicos: CCO1 (20% de respuesta virológica con respecto a la cepa *wild type*) = 9,7 FC y CCO2 (80% de respuesta) = 56,1 FC. Sin embargo, la validez de estos puntos de corte debe ser comprobada con nuevos estudios realizados en otras cohortes de pacientes.

Otro factor que resulta especialmente importante controlar en el caso de los IPs (y de los ITINANs), debido a su influencia en el éxito del tratamiento, son los **niveles plasmáticos** de estos fármacos. La variabilidad interindividual en las concentraciones plasmáticas alcanzadas con los IPs y las interacciones medicamentosas de los fármacos antirretrovirales (entre sí y con otros principios activos), condicionan que en ocasiones no se obtengan los niveles plasmáticos esperados. Esto es especialmente importante en las terapias de rescate donde se utilizan varios fármacos antirretrovirales con interacciones farmacocinéticas no bien conocidas, que podrían dar lugar a concentraciones plasmáticas insuficientes. Por ello, la monitorización plasmática de estos fármacos puede mejorar la eficacia del tratamiento (Best *et al.*, 2006) y en algunos países ya forma parte de la práctica clínica habitual. Por el contrario, en el caso de los ITIANs no se ha podido establecer una asociación entre la concentración plasmática y la respuesta terapéutica, debido a que son profármacos que deben activarse en el interior de la célula, transformándose en derivados trifosfatados activos; por tanto, su monitorización no

está indicada (Hammer *et al.*, 2006). En nuestro trabajo no disponíamos de datos sobre las concentraciones plasmáticas de antirretrovirales, por lo que no hemos podido comprobar la influencia de este factor sobre la capacidad de predicción de los modelos estudiados, especialmente en la predicción de la resistencia a LPV/RTV y otros IPs. La **adherencia**, uno de los factores que influye sobre las concentraciones plasmáticas, sólo pudo ser analizada en un conjunto reducido de pacientes, como ya se ha comentado; dentro del subgrupo de pacientes tratados con LPV/RTV, la adherencia sólo se asoció con la variación de CV a los 6 meses en el análisis univariante ($p < 0,05$), aunque en el multivariante no mostró una asociación estadísticamente significativa con dicha respuesta.

En los últimos años también se ha investigado sobre el uso combinado de estudios de resistencias y niveles plasmáticos de IPs, ya que tanto unos como otros se asociaban por separado con la respuesta terapéutica. El **cociente inhibitorio (IQ)** es un parámetro que relaciona la concentración del fármaco con la susceptibilidad del virus pero precisa de técnicas laboriosas y caras, como el fenotipo real o virtual. Sin embargo, el **cociente inhibitorio genotípico (GIQ)**, o cociente entre la C_{min} y el número de mutaciones que confieren disminución de la susceptibilidad al fármaco, utiliza el genotipo como medida de resistencia del virus, por lo que no requiere disponer del fenotipo real o virtual (Ribera *et al.*, 2005). Recientes publicaciones indican que el GIQ es mejor predictor de la respuesta que las concentraciones plasmáticas de LPV/RTV o el número de mutaciones por separado (González de Requena *et al.*, 2004; Marcelin *et al.*, 2005) y destacan la importancia de lograr concentraciones plasmáticas elevadas de LPV/RTV, incluso en pacientes con escasa exposición previa a IPs (Torti *et al.*, 2006). Sin embargo, en España, las últimas recomendaciones del Panel de Expertos de GESIDA-Plan Nacional sobre SIDA (2007) consideran que la monitorización terapéutica y la utilización de cocientes inhibitorios no han sido evaluadas en estudios prospectivos y aleatorizados con suficiente poder estadístico como para poder ser recomendadas en la práctica clínica diaria.

Dentro del **subgrupo de pacientes cuyo tratamiento incluía ddl** ($n=133$), ninguna de las interpretaciones del **fenotipo virtual** se asoció de forma significativa con la respuesta en el análisis univariante. Cuando comparamos estos resultados

con los obtenidos en el conjunto inicial de pacientes y en el subgrupo de ddl-TDF-LPV observamos un menor poder predictivo por parte del fenotipo virtual en el subgrupo de ddl. Los **puntos de corte biológicos**, aplicados en este estudio, consideraban susceptibles las cepas con un *fold-change* (FC) ≤ 4 . Posteriormente el *cut-off* de ddl se ha ido modificando, especialmente con la introducción de **puntos de corte clínicos**: el CCO1 se ha establecido en 0,9 FC y el CCO2 en 2,6. Por tanto, es probable que en nuestro estudio la interpretación realizada por el fenotipo virtual haya sobreestimado la sensibilidad a ddl, al considerar un *cut-off* más alto, y de ahí su baja capacidad para predecir la respuesta en este subgrupo, hecho que también ha sido descrito por otros autores (Green *et al.*, 2006).

En cuanto a la interpretación de la resistencia genotípica a ddl en este mismo subgrupo, los algoritmos **Andalucía y Andalucía-DTL** fueron capaces de predecir tanto la indetectabilidad como la variación de CV a 3 y 6 meses en el análisis univariante, aunque en el análisis multivariante sólo el algoritmo Andalucía-DTL mostró una asociación estadísticamente significativa con la indetectabilidad a los 3 meses.

El *score* de la **ANRS** para ddl se asoció con la supresión de la CV a los 6 meses y con la variación de CV a los 3 meses, tanto en el análisis univariante como en el multivariante; también se asoció significativamente con la variación de CV a los 6 meses, aunque esta asociación perdía fuerza al ajustar por el resto de las variables. La posterior versión de los algoritmos de la ANRS, de Septiembre de 2005 y vigente en la actualidad (<http://www.hivfrenchresistance.org>), solamente supone para ddl que la presencia de la mutación **L74V** por sí sola se interpreta como resistencia a este fármaco, a diferencia de la versión que nosotros aplicamos (2004), donde se interpretaba como actividad disminuida. En nuestro estudio esta mutación mostraba una prevalencia del 8%, por lo que no es de esperar que con el actual algoritmo de la ANRS los resultados varíen significativamente. Sin embargo, autores como Marcelin *et al.* (2006b) abren nuevas vías de investigación para la interpretación de la resistencia a ddl, al poner de manifiesto que la inclusión en los *scores* de ciertos polimorfismos, como R211A/D/G/K/S o L228H/M/R, mejora su capacidad para predecir la respuesta.

En cuanto a la **interpretación de la resistencia a tenofovir**, todos los algoritmos genotípicos que nosotros hemos empleado coinciden en incluir la mutación **K65R** (Miller *et al.*, 2000) y la **inserción T69SS** (White *et al.*, 2004). Las discrepancias entre los distintos algoritmos radicarón en la interpretación de las **combinaciones de mutaciones** (TAMs, NAMs, L74V o T69D/N/S) y la consideración o no del “efecto beneficioso” de **M184V** por retrasar la aparición de TAMs y mejorar la respuesta a tenofovir (Waters *et al.*, 2006).

Desde la realización de este estudio la interpretación genotípica de la resistencia a TDF no ha sufrido grandes modificaciones. La versión de la **ANRS** de 2004, aplicada por nosotros, se modificó ligeramente en 2006 incluyendo una nueva mutación, **K70E**, asociada con actividad disminuida de TDF (Ross *et al.*, 2005; Sluis-Cremer *et al.*, 2006), y esta interpretación sigue actualmente vigente. Otros paneles de expertos, como el de la IAS-USA o la Universidad de Stanford también han incluido esta mutación en sus algoritmos. La prevalencia de K70E ha ido aumentando con la introducción de TDF a finales de 2001, desde un 0,15% en el periodo 1998-2001 a un 0,25% entre 2002-2004 (Kagan *et al.*, 2005). En nuestro trabajo K70E presentó una baja prevalencia, inferior al 1% (datos no mostrados), por lo que consideramos que su inclusión no afectaría significativamente a la capacidad de predicción del algoritmo ANRS-DTL.

Seleccionando el **subgrupo de pacientes cuyo tratamiento incluía TDF**, los algoritmos Andalucía y Visible Genetics se asociaron significativamente con la supresión de la CV a los 3 meses, aunque esta asociación dejó de ser significativa una vez descontado el efecto de otras variables; sin embargo, al considerar un *end-point* superior, 6 meses, todos los modelos de interpretación, tanto genotípicos como fenotípicos, fueron capaces de predecir significativamente la indetectabilidad, incluso con independencia de otras variables. Como ya hemos comentado anteriormente, esto se puede explicar porque los pacientes con CV basal más elevada tardan más tiempo en alcanzar una CV indetectable (Brun-Vézinet *et al.*, 2003).

En este mismo subgrupo de pacientes observamos que sólo los algoritmos genotípicos fueron capaces de predecir la **variación de la CV a los 3 y 6 meses**, manteniendo todos ellos esta capacidad una vez descontado el efecto de otras variables (con excepción del algoritmo de Visible Genetics a los 6 meses). Por el

contrario, el fenotipo virtual, tanto interpretado de forma continua como dual, no se asoció con ninguna de estas respuestas, ni siquiera en el análisis univariante.

En nuestro caso la versión disponible del fenotipo virtual aplicó un punto de corte biológico de 3,0 *fold-change*, a partir del cual se consideraba que existía resistencia a TDF. Los primeros puntos de corte clínicos fenotípicos para TDF se establecieron a partir de los ensayos clínicos de tipo *add-in* Gilead Sciences 902 y 907 (Miller *et al.*, 2004); a partir de un *fold-change* de 1,4 se consideró que existía una actividad disminuida de TDF y a partir de 4,0, una pérdida completa de sensibilidad. Actualmente el sistema *VircoType* tiene establecidos unos puntos de corte clínicos de 0,9 (pérdida del 20% de actividad) y 2,1 (pérdida del 80% de actividad). Observamos, por tanto, que el *cutoff* es inferior al que utilizamos en nuestro trabajo, por lo que es posible que la peor capacidad de predicción que hemos observado en el fenotipo virtual en comparación con los modelos genotípicos se deba a haber sobreestimado la actividad de TDF, al igual que ocurrió con ddl.

Cuando comparamos los resultados que obtuvimos en el subgrupo ddl-TDF-LPV con los obtenidos en el subgrupo de TDF vemos que en este último los modelos no sólo no pierden su capacidad de predicción, sino que algunos de ellos incluso la mejoran, tanto en el análisis univariante como en el multivariante, lo cual no ocurría con ddl ni con LPV/RTV. Por tanto, podemos decir que las reglas de interpretación de TDF muestran una mejor correlación con la respuesta virológica.

A lo largo de este trabajo hemos encontrado que algunos modelos de interpretación no se asociaban significativamente con la respuesta o bien que, una vez ajustados por otras variables, perdían capacidad de predicción. Sin embargo, esto no quiere decir que deban desecharse: por el contrario, estos modelos son **herramientas de gran utilidad** que nos ayudan a predecir el éxito o el fracaso terapéutico y deben ser utilizados, aunque, por supuesto, existan otros muchos factores, como la adherencia u otros de los estudiados en este trabajo, que en ocasiones pueden tener una influencia decisiva sobre la respuesta.

De los resultados obtenidos en este estudio podemos deducir también que los modelos de interpretación de la resistencia a los antiretrovirales han de ser validados clínicamente sobre cohortes formadas por un gran número de pacientes. En los

últimos años se han creado diversas cohortes con este fin, como ARCA en Italia, Eurogene a nivel europeo o, en nuestro país, la cohorte RIS (Red de Investigación en SIDA). Nuestro laboratorio coordina el grupo **CoRAO** (Cohorte de Resistencias de Andalucía Oriental): los laboratorios y unidades clínicas participantes en esta cohorte tratamos de crear una completa base de datos centralizada, con información clínica y genotípica de pacientes VIH+, para desarrollar modelos matemáticos de predicción de la respuesta al tratamiento. Esto requiere reunir información de un gran número de pacientes, puesto que la validez de los modelos obtenidos dependerá en gran medida del tamaño de la muestra. Actualmente contamos con información de unos 1500 pacientes de las provincias de Granada, Jaén y Almería.

6. CONCLUSIONES

1. Todos los sistemas de interpretación estudiados han demostrado estar en relación con la respuesta virológica. Los sistemas basados en la interpretación del genotipo han mostrado una mejor capacidad de predecir la respuesta virológica que los sistemas basados en la interpretación “virtual” del fenotipo.
2. Entre los sistemas basados en la interpretación del genotipo, el algoritmo Andalucía-DTL fue el único que se asoció tanto con la indetectabilidad como la variación de la carga viral en los dos puntos de corte estudiados. Este hecho destaca la importancia de derivar reglas locales para la interpretación del genotipo. Este algoritmo debe ser validado en una población diferente a la estudiada.
3. Los algoritmos genotípicos mantuvieron su capacidad para predecir la indetectabilidad y la variación de la carga viral a los seis meses, con independencia de otras variables que afectan a estos factores.
4. El Fenotipo Virtual, en su versión continua o dual, sólo fue capaz de relacionarse con indetectabilidad a los seis meses. Dicha relación se perdió al tener en cuenta el efecto de otras variables. Ninguna de las dos versiones estudiadas fue capaz de predecir las variaciones en la carga viral.
5. Las diferencias existentes entre los algoritmos Andalucía, Andalucía-DTL y ANRS, a diferencia de las del resto de los algoritmos, se explican por las diferencias en la interpretación de Didanosina, Tenofovir y Lopinavir/ritonavir.
6. En los pacientes cuyo nuevo tratamiento incluía ddl todos los modelos genotípicos predijeron la indetectabilidad a los seis meses, incluso ajustando por el resto de las variables, a excepción de Andalucía-DTL que sólo la predijo a los 3 meses.
7. En los pacientes cuyo nuevo tratamiento incluía Tenofovir, todos los sistemas, genotípicos y fenotipo virtual, predijeron la indetectabilidad a los seis meses, incluso ajustando por el resto de las variables.
8. En los pacientes cuyo nuevo incluía Lopinavir/ritonavir, ningún sistema fue capaz de predecir la indetectabilidad o la variación de la carga viral a los tres o seis meses cuando se descontó el efecto del resto de las variables.

7. BIBLIOGRAFIA

- Aghokeng AF, Ewane L, Awazi B, Nanfack A, Delaporte E, Peeters M, Zekeng L. 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 (5): 1632-1640.
- Alaeus A, Lidman K, Bjorkman A, Giesecke J, Albert J. Similar rate of disease progression among individuals infected with HIV-1 genetic subtypes A-D. *AIDS* 1999; 13:901-907.
- Alcamí J. Avances en la inmunopatología de la infección por el VIH. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2004; 22 (8): 486-496.
- Alcamí J, Laín de Lera T, Folgueira L, Pedraza MA, Jacque JM, Bachelerie F, et al. Absolute dependence on kappa B responsive elements for initiation and Tat-mediated amplification of HIV transcription in blood CD4 T lymphocytes. *EMBO J* 1995; 14 (7): 1552-1560.
- Allen TM, Altfeld M. HIV-1 superinfection. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 112 (5): 829-835.
- Alvarez M, Carlos S, Palomares JC, Viciano I, Nogales MC, Fernandez F, et al. Effect of mutations with a positive impact on virological response over genotypic interpretation scores to tenofovir and didanosine. Third European HIV Drug Resistance Workshop. March 30-April 1, 2005. Athens. Abstract 62.
- Alvarez M, Martin L, Carlos S, Casañas C, Pasquau J, Lozano A, et al., on behalf of CORAO (Cohorte de Resistencias de Andalucía Oriental). Transmitted resistance and minority variants of K103N in newly diagnosed HIV-infected individuals in South Eastern Spain (2005-2006). 5th European HIV Drug Resistance Workshop. March 28-30, 2007. Cascais, Portugal. Poster 20.
- Alvarez M, Viciano I, Palomares JC, Nogales MC, Lozano, Hernández-Quero J por el GRUPO de estudio RAERA. Desarrollo de un algoritmo de interpretación del genotipo de resistencia a tenofovir basado en la respuesta virológica. *Avances en Enfermedades Infecciosas* 2004; 5 (Supl. 1): 12-13.
- Antela A, Moreno S, Casado J. Abacavir. En: J. Guardiola y V. Soriano (eds.). Tratamiento de la infección por VIH-Sida. Fármacos y combinaciones. Barcelona: Publicaciones Permanyer; 2004. p. 63-76.
- Arien KK, Abraha A, Quinones-Mateu ME, Kestens L, Vanham G, Arts EJ. The replicative fitness of primary human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) group M, HIV-1 group O, and HIV-2 isolates. *J Virol* 2005; 79(14): 8979-8990.
- Armoni A. Use of neural networks in medical diagnosis. *MD Computing* 1998; 15: 100-104.

- Arrizabalaga J, Camino X, Iribarren JA, Rodríguez FJ. Mecanismo de acción, sensibilidad y resistencias de enfuvirtida. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2004; 3(1): 7-11.
- Arts EJ, Wainberg MA. Mechanisms of nucleoside analog antiviral activity and resistance during human immunodeficiency virus reverse transcription. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40: 527-540.
- Arvieux C, Tribut O. Amprenavir or fosamprenavir plus ritonavir in HIV infection: pharmacology, efficacy and tolerability profile. *Drugs* 2005; 65 (5): 633-659.
- Bachelor L, Jeffrey S, Hanna G, D'Aquila R, Wallace L, Logue K, *et al.* Genotypic correlates of phenotypic resistance to efavirenz in virus isolates from patients failing nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor therapy. *J Virol* 2001; 75: 4999-5008.
- Baltimore D. Viral RNA dependent DNA polymerase. *Nature* 1970; 226: 1211-1213.
- 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.
- Barreiro P, Soriano V. Nevirapina. En: J. Guardiola y V. Soriano (eds.). Tratamiento de la infección por VIH-Sida. Fármacos y combinaciones. Barcelona: Publicaciones Permanyer; 2004. p. 89-104.
- Baxt WG. Application of neural networks to clinical medicine. *Lancet* 1995; 346: 1135-1138.
- Bermejo M, Martín-Serrano J, Oberlin E, Pedraza MA. Activation of blood T lymphocytes down-regulates CXCR4 expression and interferes with propagation of X4 HIV strains. *Eur J Immunol* 1998; 28: 3192-3204.
- Best B, Witt M, Goicoechea M, Kemper C, Larsen R, Diamond C, *et al.* Improved ART exposure with therapeutic drug monitoring. 13th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. 2006, Denver, Colorado. Abstract 589.
- Brun-Vézinet F, Costagliola D, Khaled MA, Calvez V, Clavel F, Clotet B, *et al.* Clinically validated genotype analysis: guiding principles and statistical concerns. *Antivir Ther* 2004; 9: 465-478.
- Brun-Vézinet F, Descamps D, Ruffault A, Masquelier B, Calvez V, Peytavin G, *et al.* Clinically relevant interpretation of genotype for resistance to abacavir. *AIDS* 2003, 17:1795–1802.
- Bryant BJ and Payne DA. "Possible" resistance: comparison of "possible" HIV resistance results derived from a genotyping report versus the IC50 virtual phenotype. *Lab Med* 2007; 38(1):26-28.

- Butler IF, Pandrea I, Preston AM y Apetrei C. HIV genetic diversity: biological and public health consequences. *Curr HIV Res* 2007; 5: 23-45.
- Cabrera C, Clotet B. Tests de resistencia genotípica en pacientes con fracaso terapéutico. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2006; 24 (4): 219-221.
- Calvez V, Cohen-Codar I, Marcelin AG, Descamps D, Talamet C, Ritter J, *et al.* Identification of individual mutations in HIV protease associated with virological response to lopinavir/ritonavir therapy. *Antivir Ther* 2001; 6 (Supl.1): 64.
- Cane PA. Stability of transmitted drug-resistant HIV-1 species. *Curr Opin Infect Dis* 2005; 18 (6) : 537-542.
- Capdepon S, Aurillac-Lavignolle V, Faure M, Dupon M, Morlat P, Ragnaud JM, Chêne G, Fleury H, Masquelier B *et al.* An additive/subtractive genotypic score as a determinant of the virological response to didanosine in HIV-1 infected patients. *J Clin Virol* 2006; 36: 36-42.
- Capdepon S, Aurillac-Lavignolle V, Faure M, Dupon M, Morlat P, Ragnaud JM, *et al.* An additive/subtractive genotypic score as a determinant of the virological response to didanosine (ddl)-containing regimens in NRTI-experienced patients. *Antivir Ther* 2004; 9: S134.
- Carlos S, Chueca N, Álvarez M, García F. Resistencias del VIH. *JANO* 2006; 1604: 63-67.
- Caro-Murillo AM, Castilla J, Pérez-Hoyos S, Miró JM, Podzamczar D, Rubio R, *et al.*; Grupo de trabajo de la Cohorte de la Red de Investigación en Sida (CoRIS). Cohorte RIS de pacientes con infección por VIH sin tratamiento antirretroviral previo (CoRIS): metodología y primeros resultados. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2007; 25 (1): 23-31.
- Casado J. Uso secuencial de análogos de los nucleósidos. Claves para el éxito a largo plazo. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2006; 5(4): 39-44.
- Casado JL, Hertogs K, Ruiz L, Drona F, Van Cauwenberge A, Arnó A, *et al.* Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor resistance among patients failing a nevirapine plus protease inhibitor-containing regimen. *AIDS* 2000;14 (2): F1-7.
- Chantret M, Chapplain JM, Kerriguy N, Guist'hau O, Gicquel J, Arvieux C, *et al.* Comparison of different lopinavir/ritonavir resistance algorithms. *Antivir Ther* 2002; 7: S93.
- Chun TW, Engel D, Berrey MM, Shea T, Corey L, Fauci AS. Early establishment of a pool of latently infected, resting CD4 (+) T cells during primary HIV-1 infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95 (15): 8869-8873.

- Clavel F, Guetard D, Brun-Vezinet 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 (10): 1023-1035
- Clavel F, Pomerantz RJ. AIDS 2002. Virology: overview. *AIDS* 2002; 16 Suppl 4: S1-2
- Codina C, Tuset M, Ibarra O, Delgado O, Morancho O, García B, en representación del grupo VIH de la SEFH. Evaluación de un programa de atención farmacéutica dirigido a mejorar la adherencia al tratamiento antirretroviral. *Farm Hosp* 2004; 28 (Supl.1):19-26.
- Colonno RJ, Friberg J, Rose RE, Lam E, Parkin N. Identification of amino acid substitutions correlated with reduced atazanavir susceptibility in patients treated with atazanavir-containing regimens. XI International HIV drug resistance workshop: basic principles and clinical implications, 2-5 July 2002, Seville, Spain, abstract 4.
- Condra JH. Resisting resistance: maximizing the durability of antiretroviral therapy. *Ann Intern Med* 1998; 128 (11): 951-954.
- Connor RI, Sheridan KE, Ceradini D, Choe S, Landau NR. Change in co-receptor use correlates with disease progression in HIV-1 infected individuals. *J Exp Med* 1997; 185: 621-628.
- Conway B, Wainberg MA, Hall D, Harris M, Reiss P, Cooper D, et al. Development of drug resistance in patients receiving combinations of zidovudine, didanosine and nevirapine. *AIDS* 2001; 15: 1269-1274.
- Cooper D, Gatell J, Rockstroh J, et al. Results of BENCHMRK-1, a phase III study evaluating the efficacy and safety of MK-0518, a novel HIV-1 integrase inhibitor, in patients with triple-class resistant virus. 14th Conference on Retrovirus and Opportunistic Infections (CROI). Los Angeles, 2007. Abstract 105aLB
- Costagliola D, Cozzi-Lepri A, Dalban C, and Cheng B. Initiatives for developing and comparing genotype interpretation systems Step 1: external validation of existing rules-based algorithm for abacavir and ddI evaluated on virological response. *Antivir Ther* 2005; 10: S11.
- Cozzi-Lepri A, Ruiz L, Loveday C, Phillips AN, Clotet B, Reiss P, et al. Thymidine analogue mutation profiles: factors associated with acquiring specific profiles and their impact on the virological response to therapy. *Antivir Ther* 2005; 10 (7):791-802.

- Dam E, Clavel F, Calvez V, Salmon D, Pellegrin JL, Mamet JP *et al.* Comparison of HIV-1 resistance phenotypes obtained by two different assay systems. Poster 158. 5th International Workshop on HIV Drug Resistance & Treatment Strategies 4-8. *Antivir Ther* 2001; Supplement 1: 122.
- Damond F, Apetrei C, Descamps D, Brun-Vezinet F, Simon F. HIV-1 subtypes and plasma RNA quantification. *AIDS* 1999; 13 (2): 286-288.
- Dayhoff JE, DeLeo JM. Artificial networks. Opening the black box. *Cancer* 2001;91:1615-1635.
- De Clercq E. Perspectives of non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs) in the therapy of HIV-1 infection. *Il farmaco* 1999; 54:26-45.
- De Luca A, Cingolani A, Di Giambenedetto S, Trotta MP, Baldini F, Rizzo MG, *et al.* Variable prediction of antiretroviral treatment outcome by different systems for interpreting genotypic human immunodeficiency virus type 1 drug resistance. *JID* 2003; 187: 1934-1943.
- De Luca A, Cozzi-Lepri A, Perno CF, Balotta C, Di Giambenedetto S, Poggio A *et al.* Variability in the interpretation of transmitted genotypic HIV-1 drug resistance and prediction of virological outcomes of the initial HAART by distinct systems. *Antivir Ther* 2004a; 9(5): 743-752.
- De Luca A and Perno CF. Impact of different HIV resistance interpretation by distinct systems on clinical utility of resistance testing. *Curr Opin Infect Dis* 2003; 16: 573-580.
- De Luca A, Vendittelli M, Baldini F, Di Giambenedetto S, Trotta MP, Cingolani A *et al.* Construction, training and clinical validation of an interpretation system for genotypic HIV-1 drug resistance based on fuzzy rules revised by virological outcomes. *Antivir Ther* 2004b; 9: 583-593.
- De Mendoza C, Gallego O, Soriano V. Mechanisms of resistance to antiretroviral drugs--clinical implications. *AIDS Rev* 2002; 4 (2): 64-82
- 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.
- De Mendoza C, Soriano V. Resistencia del VIH a los antirretrovirales. En: J. M. Guardiola y V. Soriano (eds.). *Tratamiento de la infección VIH-SIDA. Fármacos y combinaciones.* Barcelona: Publicaciones Permanyer; 2004. p. 261-277.

- De Mendoza C, Soriano V (coordinadores). Guía de resistencias a los antirretrovirales 2007. Interpretación de resistencia de la Red de Investigación en SIDA. Barcelona: Publicaciones Permanyer; 2007.
- De Meyer S, Vangeneugden T, Lefebvre E, Azijn H, De Baere I, Van Baelen B and De Bethune MP. Phenotypic and genotypic determinants of resistance to TMC114: pooled analysis of POWER 1, 2 and 3. *Antivir Ther* 2006; 11: S83.
- Descamps D, Masquelier B, Mamet JP, Calvez V, Ruffault A, Telles F *et al.* A genotypic sensitivity score for amprenavir based on genotype at baseline and virological response. *Antivir Ther* 2001; 6 (Suppl. 1):103.
- DHHS Panel on Antiretroviral Guidelines for Adult and Adolescents. Guidelines for the Use of Antiretroviral Agents in HIV-1-Infected Adults and Adolescents - December 1, 2007. Disponible en: <http://aidsinfo.nih.gov/contentfiles/AdultandAdolescentGL.pdf>. Acceso: 28 de Diciembre de 2007.
- Domingo E, Escarmís C, Sevilla N, Moya A, Elena SF, Quer J, *et al.* Basic concepts in RNA virus evolution. *FASEB J* 1996; 10:859-864.
- Domingo E, Holland JJ. Mutation rates and rapid evolution of RNA viruses. En: Morse SS, ed. *Evolutionary biology of viruses*. Nueva York: Raven Press, 1994; 161-184.
- Domingo E, Holland J. RNA virus mutations and fitness for survival. *Annu Rev Microbiol* 1997; 51:151-178.
- Domingo E, Martinez-Salas E, Sobrino F, de la Torre JC, Portela A, Ortiz J, *et al.* The quasispecies (extremely heterogeneous) nature of viral RNA genome populations: biological relevance-a review. *Gene* 1985; 40(1): 1-8.
- Doyon L, Tremblay S, Wardrop E, Maurice R, Thibeault D, Archambault J, Cordingley MG. Characterization of HIV-1 showing decreased susceptibility to tipranavir and their inhibition by tipranavir-containing drug mixtures. XII International HIV drug resistance workshop: basic principles and clinical implications. 10-14 June 2003. Los Cabos, Mexico. Abstract 14.
- Drake JW, Charlesworth B, Charlesworth D, Crow JF. Rates of spontaneous mutation. *Genetics* 1998; 148: 1667-1686.
- Drusano GL, Bilello JA, Stein DS, Nessly M, Meibohm A, Emini EA, *et al.* Factors influencing the emergence of resistance to indinavir: role of virologic, immunologic, and pharmacologic variables. *J Infect Dis* 1998; 178:360-367.

- Durant J, Clevenbergh P, Halfon P, Delgiudice P, Porsin S, Simonet P *et al.* Drug-resistance genotyping in HIV-1 therapy: the VIRADAPT randomised controlled trial. *Lancet*. 1999; 353: 2195-2199.
- Eigen M. On the nature of viral quasispecies. *Trends Microbiol* 1996; 4: 212-214.
- Erali M, Page S, Reimer LG, Hillyard DR. Human immunodeficiency virus type 1 drug resistance testing: a comparison of three sequence-based methods. *J Clin Microbiol* 2001; 39(6): 2157-2165.
- Erickson JW, Burt SK. Structural mechanisms of HIV drug resistance. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1996; 36: 545-571
- Escobar I, Pulido F, Pérez E, Arribas JR, García MP, Hernando A. Análisis farmacoeconómico de una estrategia de mantenimiento con lopinavir/ritonavir como monoterapia en pacientes con infección por el VIH. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2006; 24 (8): 490-494.
- Feng JY, Shi J, Schinazzi RF, *et al.* Mechanistic studies show that (-)-FTC-TP is a better inhibitor of HIV-1 reverse transcriptase than 3-TC-TP. *FASEB J* 1999;13:1511-1517.
- Ferrer E, Olmo M, Podzamczar D. Efavirenz. En: J. Guardiola y V. Soriano (eds.). *Tratamiento de la infección por VIH-Sida. Fármacos y combinaciones*. Barcelona: Publicaciones Permanyer; 2004. p. 105-124.
- Flandre P, Chappey C, Marcelin AG, Ryan K, Maa JF, Bates M *et al.* Phenotypic susceptibility to didanosine is associated with antiviral activity in treatment-experienced patients with HIV-1 infection. *JID* 2007; 195: 392-398.
- Flandre P, Durier C, Descamps D, Launay O, Joly V. On the use of magnitude of reduction in HIV-1 RNA in clinical trials: statistical analysis and potential biases. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2002; 30(1): 59-64.
- Flandre P, Marcelin AG, Pavie J, Shmidely N, Wirlden M, Lada O *et al.* Comparison of tests and procedures to build clinically relevant genotypic scores: application to the Jaguar study. *Antivir Ther* 2005; 10:479-487.
- Fleury H, Recordon-Pinson P, Caumont A, Faure M, Roques P, Plantier JC, *et al.* HIV type 1 diversity in France, 1999-2001: molecular characterization of non-B HIV type 1 subtypes and potential impact on susceptibility to antiretroviral drugs. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2003; 19(1): 41-47.

- Fonjungo PN, Mpoudi EN, Torimiro JN, Alemnji GA, Eno LT, Lyonga EJ, *et al.* Human immunodeficiency virus type 1 group M protease in Cameroon: genetic diversity and protease inhibitor mutational features. *J Clin Microbiol* 2002; 40 (3): 837-845.
- Fontaine E, Riva C, Peeters M, Schmit JC, Delaporte E, Van Laethem K, *et al.* Evaluation of two commercial kits for the detection of genotypic drug resistance on a panel of HIV type 1 subtypes A through J. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2001; 28 (3): 254-258.
- Fouchier RAM, Malim MH. Nuclear import of human immunodeficiency virus type-1 preintegration complexes. *Advances in virus research* 1999; 52:275-299.
- Frenkel LM, Tobin NH. Understanding HIV-1 drug resistance. *Ther Drug Monit* 2004; 26 (2), 116–121.
- Gallant J.E. Antiretroviral Drug Resistance and Resistance Testing. *Top HIV Med* 2005; 13(5):138-142.
- Gallego O, Ruiz L, Vallejo A, Ferrer E, Rubio A, Clotet B *et al.* Changes in the rate of genotypic resistance to antiretroviral drugs in Spain. *AIDS* 2001; 15:1894-6.
- 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(4599): 865-867.
- Gao F, Robertson DL, Morrison SG, Hui H, Crai S, Decker J, *et al.* The heterosexual human immunodeficiency virus type 1 epidemic in Thailand is caused by an intersubtype (A/E) recombinant of African origin. *J Virol* 1996; 70 (10): 7013-7029
- Garber DA, Silvestri G, Feinberg MB. Prospects for an AIDS vaccine: three big questions, no easy answers. *Lancet Infect Dis* 2004; 4:397–413.
- García F, Aguilera A. Pruebas de resistencia. En: V. Soriano (eds.). *Resistencias a los antirretrovirales* 2005. Barcelona, 2005. Publicaciones Permanyer: 35-46.
- García F, Palomares JC, Martínez NM, Álvarez M, Suárez S, García F. Study of different systems for interpreting results of genotypic antiretroviral drug resistance tests. *Antivir Ther* 2003; 8:77-78.
- García-Deltoro M. Resistencia a tipranavir. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2006 ; 5 (2): 22-28.
- Gascón J. Enfermedades infecciosas e inmigración. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2003; 21 (10): 535-539.
- Gazzard B, Bernard AJ, Boffito M, Churchill D, Edwards S, Fisher N, *et al.* British HIV Association (BHIVA) guidelines for the treatment of HIV-infected adults with antiretroviral therapy. *HIV Med* 2006; 7(8): 487-503.

- Geretti AM. HIV-1 subtypes: epidemiology and significance for HIV management. *Curr Opin Infect Dis* 2006; 19 (1): 1-7.
- Gianotti N, Galli L, Danise A, Hasson H, Boeri E, Lazzarin A, et al. Ability of Different Lopinavir Genotypic Inhibitory Quotients to Predict 48-Week Virological Response in Highly Treatment-Experienced HIV-Infected Patients Receiving Lopinavir/Ritonavir. *J Med Virol* 2006; 78:1537-1541.
- Gilbert PB, McKeague IW, Eisen G, Mullins C, Gueye NA, Mboup S, Kanki PJ. Comparison of HIV-1 and HIV-2 infectivity from a prospective cohort study in Senegal. *Stat Med* 2003; 22 (4): 573-593.
- Gómez-Cano M, Rubio A, Puig T, Pérez-Olmeda M, Ruiz L, Soriano V *et al.* Prevalence of genotypic resistance to nucleoside analogues in antiretroviral naive and antiretroviral-experienced HIV-infected patients in Spain. *AIDS* 1998; 12:1015-20.
- González de Requena D, Gallego O, Valer L, Jiménez-Nácher I, Soriano V. Prediction of virological response to lopinavir/ritonavir using genotypic inhibitory quotient. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2004; 20: 275-8
- Gordon CM. Commentary on meta-analysis of randomized controlled trials for HIV treatment adherence interventions. Research directions and implications for practice. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2006; 43 Suppl 1:S36-40.
- Grabar S, Le Moing V, Goujard C, Egger M, Leport C, Kazatchkine MD, Weiss L, Costagliola D. Response to highly active antiretroviral therapy at 6 months and long-term disease progression in HIV-1 infection. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2005; 39(3): 284-92.
- Green H, Gibb D, Compagnucci A, Giacomet V, De Rossi A, Harper L *et al.* A randomized controlled trial of genotypic HIV drug resistance testing in HIV-1-infected children: the PERA (PENTA 8) trial. *Antivir Ther* 2006; 11: 857-867.
- Greene WC. The molecular biology of human immunodeficiency virus type I infection. *New Engl J Med* 1991; 324: 308-317.
- Guardiola J, Domingo P, Ris J. Lamivudina. En: J. Guardiola y V. Soriano (eds.). *Tratamiento de la infección por VIH-Sida. Fármacos y combinaciones.* Barcelona: Publicaciones Permanyer; 2004. p. 33-42.
- Hales G, Birch C, Crowe S, Workman C, Hoy JF, Law MG, *et al.* A randomised trial comparing genotypic and virtual phenotypic interpretation of HIV drug resistance: the CREST study. *PLoS Clin Trials* 2006; 1(3): e18.

- Hammer SM, Saag MS, Schechter M, Montaner JS, Schooley RT, Jacobsen DM, *et al.* Treatment for adult HIV infection: 2006 recommendations of the International AIDS Society-USA panel. *JAMA* 2006; 296(7): 827-43.
- Hammer SM, Squires KE, Hughes MD, Grimes JM, Demeter LM, Curier JS, Eron JJ, Feinberg JE, Balfour HJ, Deyton LR, Chodakewitz JA, Fischl MA. A controlled trial of two nucleoside analogues plus indinavir in persons with human immunodeficiency virus infection and CD4 cell counts of 200 per cubic millimeter or less. AIDS Clinical Trials Group 320 Study Team. *N Engl J Med* 1997; 337:725-733.
- Harman J, Rivet K, Johnson B. Standar of care: Promoting antiretroviral adherence in clinical care. *AIDS Care*, 2005, Feb 17(2): 237-251.
- Harris B, von Truchsess I, Schatzl HM, Devare SG, Hackett J, Jr. Genomic characterization of a novel HIV type 1 B/G intersubtype recombinant strain from an injecting drug user in Germany. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2005; 21 (7): 654-660
- Havlir DV, Hirsch M, Collier A, *et al.* Randomized trial of indinavir vs zidovudine/lamivudine vs indinavir/zidovudine/lamivudine maintenance therapy after induction of indinavir/zidovudine/lamivudine therapy. 5th Conference Retrovirus Opportunistic Infections, 1998; Chicago.
- Hecht FM, Grant RM. Resistance testing in drug-naive HIV-infected patients: is it time? *Clin Infect Dis* 2005; 41: 1324-5.
- Hecht FM, Grant RM, Petropoulos CJ, Dillon B, Chesney MA, Tian H, *et al.* Sexual transmission of an HIV-1 variant resistant to multiple RT and protease inhibitors. *N Engl J Med* 1998; 339 (5): 307-331.
- Hemelaar J, Gouws E, Ghys PD, Osmanov S. Global and regional distribution of HIV-1 genetic subtypes and recombinants in 2004. *AIDS* 2006; 20 (16): W13-23.
- Herring BL, Ge YC, Wang B, Ratnamohan M, Zheng F, Cunningham AL, *et al.* Segregation of human immunodeficiency virus type 1 subtypes by risk factor in Australia. *J Clin Microbiol* 2003; 41 (10): 4600-4604.
- Hertogs K, de Béthume MP, Miller V, Ivens T, Schel P, Van Cauwenberge A, *et al.* A rapid metod for simultaneous detection of phenotypic resistance to inhibitors of protease and reverse transcriptase in recombinant human immunodeficiency virus type 1 isolates from patients treated with antiretroviral drugs. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42: 269-276.

- Hierholzer J, Montano S, Hoelscher M, Negrete M, Hierholzer M, Avila MM, *et al.* Molecular epidemiology of HIV type 1 in Ecuador, Peru, Bolivia, Uruguay and Argentina. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2002;18 (18):1339-1350.
- Hill A, Walmsley S, Clotet B and Molto J. Analysis of genotypic and phenotypic clinical cut-off levels for ritonavir-boosted saquinavir. *HIV Med* 2006; 7: 67-74.
- Hirsch MS, Conway B, D'Aquila RT, Johnson VA, Brun-Vezinet F, Clotet B, *et al.* Antiretroviral drug resistance testing in adults with HIV infection. Implications for clinical management. *JAMA* 1998; 279:1984-1991.
- Holguín A, Alvarez A, Soriano V. Heterogeneous nature of HIV-1 recombinants spreading in Spain. *J Med Virol* 2005; 75(3): 374-380.
- Holguín A, Hertogs K, Soriano V. Performance of drug resistance assays in testing HIV-1 non-B subtypes. *Clin Microbiol Infect* 2003; 9 (4): 323-326.
- Holtzer C and Youle M. Economic implications of HIV-1 resistance testing in overall clinical care. In: *Combination Therapy of AIDS 2004*; 195-204. Edited by E De Clercq and A-M Vandamme. Basel, Switzerland: Birkäuser Verlag AG.
- Huisman MT, Smit JW, Schinkel AH. Significance of P-glycoprotein for the pharmacology and clinical use of HIV protease inhibitors. *AIDS* 2000; 14 (3): 237-242.
- Jagodzinski LL, Cooley JD, Weber M, Michael NL. Performance characteristics of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) genotyping systems in sequence-based analysis of subtypes other than HIV-1 subtype B. *J Clin Microbiol* 2003; 41 (3): 998-1003.
- Jagodzinski LL, Wiggins DL, McManis JL, Emery S, Overbaugh J, Robb M, *et al.* Use of calibrated viral load standards for group M subtypes of human immunodeficiency virus type 1 to assess the performance of viral RNA quantitation tests. *J Clin Microbiol* 2000; 38 (3): 1247-1249.
- Johnson VA, Brun-Vézinet F, Clotet B, Conway B, D'Aquila RT, Demeter LM, *et al.* Update of the Drug Resistance Mutations in HIV-1: 2004. *Top HIV Med* 2004; 12(4):119-124.
- Johnson VA, Brun-Vézinet F, Clotet B, Günthard HF, Kuritzkes DR, Pillay D, *et al.* Update of the Drug Resistance Mutations in HIV-1: 2007. *Top HIV Med* 2007; 15 (4):119-125.
- Kagan R, Ross L, Winters M, Merigan, T, Heseltine P, Lewinski M. Adefovir-associated HIV-1 RT mutation K70E in the age of tenofovir. *Antivir Ther* 2005; 10: S103.
- Kaleebu P, French N, Mahe C, Yirrell D, Watera C, Lyagoba F, *et al.* Effect of human immunodeficiency virus (HIV) type 1 envelope subtypes A and D on disease

- progression in a large cohort of HIV-1-positive persons in Uganda. *J Infect Dis* 2002; 185:1244-1250.
- Kantor R, Katzenstein D. Drug resistance in non-subtype B HIV-1. *J Clin Virol* 2004; 29 (3): 152-159.
- Kemp S, Shi C, Bloor S, Harrigan P, Mellors J, Larder B. A novel polymorphism at codon 333 of HIV type 1 RT can facilitate dual resistance to zidovudine and 3TC. *J Virol* 1998; 72: 5093-5098
- Kempf DJ, Isaacson JD, King MS, Brun SC, Sylte J, Richards B, *et al.* Analysis of the virological response with respect to baseline viral phenotype and genotype in protease inhibitor-experienced HIV-1-infected patients receiving lopinavir/ritonavir therapy. *Antivir Ther* 2002; 7: 165–174
- Kempf DJ, Isaacson JD, King MS, Brun SC, Xu Y, Real K, *et al.* Identification of genotypic changes in human immunodeficiency virus protease that correlate with reduced susceptibility to the protease inhibitor lopinavir among viral isolates from protease inhibitor-experienced patients. *J Virol* 2001; 75: 7462-7469.
- Knobel H. Cómo y por qué debe monitorizarse la adherencia al tratamiento antirretroviral en la actualidad. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2002; 20(10): 481-483.
- Koelsch KK, Smith DM, Little SJ, Ignacio CC, Macaranas TR, Brown AJ, *et al.* Clade B HIV-1 superinfection with wild-type virus after primary infection with drug-resistant clade B virus. *AIDS* 2003; 17(7): F11-16.
- Landesman SH. Quantifying HIV. *JAMA* 1996; 275: 640-641.
- Larder BA, Kemp SD, Hertogs K. Quantitative prediction of HIV-1 phenotypic drug resistance from genotypes: the virtual phenotype (Virtual Phenotype). *Antivir Ther* 2000a; 5: 49. Abstract 63.
- Larder BA, Wang D. Use of neural networks to define the genetic basis of resistance to d4T. *AIDS* 2000b; 14: S4.
- Llibre JM, Santos JR, Puig T, Moltó J, Ruíz L, Clotet B. Prevalence of etravirine-associated mutations in clinical samples with resistance to nevirapine and efavirenz. XVIth International HIV Drug Resistance Workshop, Barbados, 12-16 June 2007. *Antivir Ther* 2007;12: S74. Abstract 65.
- 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 (Suppl. 2): 25-32.

- Lorenzo A, González J. Enfuvirtida en la práctica clínica: principales cuestiones y respuestas. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2004; 3(1): 23-28.
- Lospitao E, Alvarez A, Soriano V, Holguín A. HIV-1 subtypes in Spain: a retrospective analysis from 1995 to 2003. *HIV Med* 2005; 6 (5): 313-320.
- Loutfy MR, Raboud JM, Walmsley SL, Saskin R, Montaner JS, Hogg RS, *et al.* Predictive value of HIV-1 protease genotype and virtual phenotype on the virological response to lopinavir/ritonavir-containing salvage regimens. *Antivir Ther* 2004; 9(4): 595-602.
- Lucas GM, Gallant JE, Moore RD. Relationship between drug resistance and HIV-1 disease progression or death in patients undergoing resistance testing. *AIDS* 2004; 18(11): 1539-48.
- Lukashov VV, Goudsmit J. HIV heterogeneity and disease progression in AIDS: a model of continuous virus adaptation. *AIDS* 1998; 12 (Suppl. A): S43-52.
- Luna JD. Tests con dos muestras. En: *Bioestadística para las Ciencias de la Salud*. Martín A and Luna JD. Madrid, Ediciones Norma-Capitel 2004: 245-246.
- Maes B, Schrooten Y, Snoeck J, Derdelinckx I, Van Ranst M, Vandamme AM, Van Laethem K. Performance of ViroSeq HIV-1 Genotyping System in routine practice at a Belgian clinical laboratory. *J Virol Methods* 2004; 119 (1): 45-49.
- Marcelin AG, Chazallon C, Gérard L, Saïdi Y, Aboulker JP, Girard PM. External validation of atazanavir/ritonavir genotypic score in HIV-1 protease inhibitor experienced patients. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2006a; 42(1): 127-128.
- Marcelin AG, Cohen-Codar I, King MS, Colson P, Guillevic E, Descamps D, *et al.* Virological and pharmacological parameters predicting the response to lopinavir-ritonavir in heavily protease inhibitor experienced patients. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 1720-1726.
- Marcelin AG, Dalban C, Peytavin G, Delaugerre C, Agher R, Katlama C, *et al.* Clinically relevant interpretation of genotype for resistance to ritonavir (100mg bid) plus saquinavir (800 mg bid) in HIV-1 infected protease inhibitor experienced patients. XII International HIV drug resistance workshop: basic principles and clinical implications. 10-14 June 2003a, Los Cabos, Mexico. Abstract 107.
- Marcelin AG, Flandre P, Furco A, Wirlden M, Molina JM, Calvez V; AI454-176 Jaguar Study Team. Impact of HIV-1 reverse transcriptase polymorphism at codons 211 and 228 on virological response to didanosine. *Antivir Ther* 2006b; 11 (6): 693-9.

- Marcelin AG, Flandre P, Pavie J, Schmidely N, Wirden M, Lada O. New genotypic score comprising mutations impacting negatively and positively the virological response to didanosine in treatment-experienced patients from the randomized didanosine add on Jaguar study. *Antivir Ther* 2004; 9: S146.
- Marcelin AG, Lamotte C, Delaugerre C, Ktorza N, Ait Mohand H, Cacace R, *et al.* Genotypic inhibitory quotient as predictor of virological response to ritonavir-amprenavir in human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitor-experienced patients. *Antimicrob Agents Chemother* 2003**b**; 47 (2): 594-600.
- Marcelin AG, Masquelier B, Descamps D, Izopet J, Charpentier C, Alloui C, *et al.* Mutations Associated with Response to Boosted Tipranavir in HIV-1-infected PI-experienced Patients. 14th Conference on Retroviruses and opportunistic Infections. 25-28 february 2007, Los Angeles, California, poster 612.
- Marschner IC, Betensky RA, DeGruttola V., Hammer SM, Kuritzkes DR. Clinical trials using HIV-1 RNA-based primary endpoints: statistical analysis and potential biases. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1999; 20(3): 220-227.
- Martínez M. Desarrollo de un algoritmo de interpretación del genotipo de resistencia a Kaletra. I Reunión de la Actualización de los Métodos de Estudio de Resistencia Antirretroviral. Sevilla, Octubre 2004.
- Masquelier B, Breilh D, Neau D, Lawson-Ayayi S, Lavignolle V, Ragnaud JM, *et al.* Human Immunodeficiency virus type 1 genotypic and pharmacokinetic determinants of the virological response to lopinavir-ritonavir-containing therapy in protease inhibitor-experienced patients. *Antimicrob Agents and Chemother* 2002; 46: 2926-2932.
- Masquelier B, Tamalet C, Montès B, Descamps D, Peytavin G, Bocket L, *et al.* Genotypic and pharmacological determinants of the virological response to tenofovir in nucleoside reverse transcriptase inhibitor-experienced patients. *Antivir Ther* 2004; 9(3): 315-23.
- McCutchan FE. Global epidemiology of HIV. *J Med Virol* 2006; 78:S7–S12.
- Melby T, Sista P, Nelson E, Dossier S, Mink M, Greenberg M. Virological characterization of patients through 48 weeks in T-20-205 who acquired T-20 (enfuvirtide)-resistance-associated mutations during prior short-term enfuvirtide monotherapy. *Antivir Ther* 2002; 7: S56-57.
- Merry C, Barry MG, Mulcahy F, *et al.* Saquinavir pharmacokinetics alone and in combination with ritonavir in HIV-infected patients. *AIDS* 1997; 11:29-33.

- Miller MD, Margot N, Hertogs K, et al. Antiviral activity of tenofovir against nucleoside-resistant HIV samples. 40th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Toronto, Septiembre 2000. Abstract 2115.
- Miller MD, Margot N, Lu B, Zhong L, Chen SS, Cheng A, Wulfsohn M. Genotypic and phenotypic predictors of the magnitude of response to tenofovir disoproxil fumarate treatment in antiretroviral-experienced patients *J Infect Dis* 2004; 189: 837-846.
- Miller V, Schurman R, Clavel F, Harrigan R, Hellmann N, Hertogs K, et al. Comparison of HIV-1 drug susceptibility (phenotype) results reported by three major laboratories. *Antivir Ther* 2001; 6 (Supl. 1):129.
- Miralles C. Tratamiento antirretroviral en pacientes con fracaso virológico previo. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2006; 5(2): 37-46
- Miranda LR, 2005. Gotte M, Liang F, Kuritzkes DR. The L74V mutation in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase counteracts enhanced excision of zidovudine monophosphate associated with thymidine analog resistance mutations. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005 Jul; 49(7): 2648-56
- Miró JM, Pumarola T, García F. Prevalence of transmission of HIV-1 drug resistant mutations in patients with primary HIV-1 infection in Barcelona (Spain). XIII International AIDS Conference, Durban, South Africa, 2000.
- Miró JM, Sued O, Plana M, Pumarola T, Gallart T. Avances en el diagnóstico y tratamiento de la infección aguda por el VIH-1. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2004; 22(10): 643-659.
- Molina JM, Journot V, Furco A, Palmer P, De Castro N, Raffi F, Morlat P, May T, Rancinan C, Chêne G; Montana (ANRS 091) Study Group. Five-year follow up of once-daily therapy with emtricitabine, didanosine and efavirenz (Montana ANRS 091 trial). *Antivir Ther* 2007; 12(3): 417-22.
- Moore DM, Hogg RS, Yip B, Wood E, Tyndall M, Braitstein P, Montaner JS. Discordant immunologic and virologic responses to highly active antiretroviral therapy are associated with increased mortality and poor adherence to therapy. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2005; 40(3): 288-93.
- Mofenson LM, Lambert JS, Stiehm ER, Bethel J, Meyer WA, Whitehouse J, et al. Risk factors for perinatal transmission of human immunodeficiency virus type 1 in women treated with zidovudine. Pediatric AIDS Clinical Trials Group Study 185 Team. *N Engl J Med*. 1999; 341: 385-393.

- Moreno S, Pérez-Elías MJ, Gutierrez C. Resistencias a tenofovir DF: aspectos básicos y clínicos. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2004; 3 (2): 10-15.
- Mori J, Mosley M, Lewis M, Simpson P, Toma J, Huang W, *et al.* Characterization of maraviroc resistance in patients failing treatment with CCR5-tropic virus in MOTIVATE 1 and MOTIVATE 2. XVI International HIV Drug Resistance Workshop. Barbados, 12-16 de Junio de 2007. Abstract 10.
- Murphy EL, Collier AC, Kalish LA, Assmann SF, Para MF, Flanigan TP, *et al.* Viral Activation Transfusion Study Investigators. Highly active antiretroviral therapy decreases mortality and morbidity in patients with advanced HIV disease. *Ann Intern Med* 2001; 135 (1): 17-26.
- Nájera I, Holguín A, Quiñones-Mateu ME, Muñoz-Fernández MA, Nájera R, López-Galíndez C, Domingo E. Pol gene quasispecies of human immunodeficiency virus: mutations associated with drug resistance in virus from patients undergoing no drug therapy. *J Virol* 1995; 69: 23-31.
- Nijhuis M, Schuurman R, de Jong D, Erickson J, Gustchina E, Albert J, *et al.* Increased fitness of drug resistant HIV-1 protease as a result of acquisition of compensatory mutations during suboptimal therapy. *AIDS* 1999; 13 (17): 2349-2359.
- Nogales MC, Serrano MC, Bernal S, Jarana R, Pérez de la Rosa L, Fernández-Palacín A, *et al.* Estudio de la resistencia mediante el sistema de genotipificación TRUGENE HIV-1 y análisis de concordancia entre algoritmos basados en reglas y el fenotipo virtual. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2005; 23 (3): 149-155.
- O'Brien WA, Hartigan PM, Martin D, Esinhart J, Hill A, Benoit S, *et al.* Changes in plasma HIV-1 RNA and CD4+ lymphocyte counts and the risk of progression to AIDS. Veterans Affairs Cooperative Study Group on AIDS. *N Engl J Med* 1996; 334 (7): 426-431
- Ogg G, Jin X, Bonhoeffer S, Moss P, Nowak MA, Monard S, Segal JP, Cao Y, Rowland-Jones SL, Hurley A, Markowitz M, Ho DD, McMichael AJ, Nixon DF. Decay kinetics of human immunodeficiency virus-specific effector cytotoxic T lymphocytes after combination antiretroviral therapy. *J Virol* 1999; 73:797-800.
- Oldfield V, Plosker GL. Lopinavir/ritonavir: A review of its use in the management of HIV infection. *Drugs* 2006; 66 (9):1275-1299.
- Ortega E. Didanosina. En: J. Guardiola y V. Soriano (eds.). Tratamiento de la infección por VIH-Sida. Fármacos y combinaciones. Barcelona, 2004. Publicaciones Permanyer: 21-32.

- Palella F, Armon C, Cmiel J, Buchacz K, Novak R, Moorman A, *et al.* Enhanced survival associated with use of HIV susceptibility testing among HAART-experienced patients in the HIV Outpatient Study (HOPS). 13th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections 2006, Denver, Colorado Abstract 654.
- Palmer S, Alaeus A, Albert J, Cox S. Drug susceptibility of subtypes A, B, C, D and E human immunodeficiency virus type 1 primary isolates. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1998; 14:157-162.
- Panel de Expertos de GESIDA y Plan Nacional sobre el SIDA. Recommendations from the GESIDA/Spanish AIDS Plan regarding antiretroviral treatment in adults with human immunodeficiency virus infection (Update January 2007). *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2007; 25(1):32-53.
- Panel de Expertos de GESIDA y Plan Nacional sobre el SIDA. Recomendaciones de GESIDA/Plan Nacional sobre el Sida respecto al tratamiento antirretroviral en adultos infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (Actualización enero de 2008) Disponible en: www.gesida.seimc.org (Ultimo acceso: Febrero 2008).
- Pantaleo G, Fauci AS. New concepts in the immunopathogenesis of HIV infection. *Annu Rev Immunol* 1995; 13:487-512.
- Paredes R, Ruiz L, Clotet B. Aplicación clínica de las técnicas ultrasensibles de determinación de la carga viral del VIH-1. *AIDS Cyber J* 1999; 2(4): 613-619.
- Parkin NT, Chappey CM, Petropoulos CJ. Improving lopinavir genotype algorithm through phenotype correlation: novel mutation patterns and amprenavir cross-resistance. *AIDS* 2003;17:955-61.
- Partaledis JA, Yamaguchi K, Tisdale M, Blair EE, Falcione C, Maschera B *et al.* In vitro selection and characterization of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) isolates with reduced sensitivity to hydroxyethylamino sulfonamide inhibitors of HIV-1 aspartyl proteasa. *J Virol* 1995; 69: 5228-5235.
- Peeters M, Toure-Kane C, Nkengasong JN. Genetic diversity of HIV in Africa: impact on diagnosis, treatment, vaccine development and trials. *AIDS* 2003; 17(18): 2547-2560.
- Pellegrin I, Breilh D, Coureau G, Boucher S, Neau D, Merel P, *et al.* Interpretation of genotype and pharmacokinetics for resistance to fosamprenavir-ritonavir-based regimens in antiretroviral-experienced patients. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51(4): 1473-1480.
- Peña A, Casañas C, Muñoz L, Parra J, López Ruz M, López M, *et al.*, en representación de CoRAO. Evaluación del riesgo de adquirir una nueva mutación en pacientes en los

- que no se consigue la supresión virológica. VIII Congreso de la Sociedad Andaluza de Enfermedades Infecciosas (SAEI). Roquetas de Mar, Almería. 14-16 de Diciembre de 2006. Abstract CP-66.
- Perelson AS, Neumann AU, Markowitz M, Leonard JM, Ho DD. HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time. *Science* 1996; 271: 1582-1586.
- Perrin L, Kaiser L, Yerly S. Travel and the spread of HIV-1 genetic variants. *Lancet Infect Dis* 2003; 3 (1): 22-27.
- Peters S, Muñoz M, Yerly S, Sánchez-Merino V, López-Galíndez C, Perrin L, *et al.* Resistance to nucleoside analog reverse transcriptase inhibitors mediated by human immunodeficiency virus type 1 p6 protein. *J Virol* 2001; 75 (20): 9644-9653.
- Petropoulos CJ, Parkin NT, Limoli KL, Lie YS, Wrin T, Huang W, *et al.* A novel phenotypic drug susceptibility assay for human immunodeficiency virus type 1. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 920-928.
- Poiesz BJ, Ruscetti FW, Gazdar AF, Bunn PA, Minna JD, Gallo RC. Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; 77: 7415-7419.
- Puchhammer-Stöckl E, Steininger C, Geringer E, Heinz FX. Comparison of virtual phenotype and HIV-SEQ program (Stanford) interpretation for predicting drug resistance of HIV-strains. *HIV Med* 2002; 3:200-206.
- Puig T, Perez-Olmeda M, Rubio A, Ruiz L, Briones C, Franco JM, *et al.* Prevalence of genotypic resistance to nucleoside analogues and protease inhibitors in Spain. The ERASE-2 Study Group. *AIDS* 2000; 14:727-32.
- Quan Y, Brenner BG, Oliveira M, *et al.* Lamivudine can exert a modest antiviral effect against human immunodeficiency virus type 1 containing the M184V mutation. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47(2):747-54.
- Quirós-Roldán E, Bertelli D, Signorini S, Airoidi M, Torti C, Moretti F, Carosi G. HIV-1 multidideoxynucleoside resistance mutation (Q151M): prevalence, associated resistance mutations and response to antiretroviral salvage treatment. *Microbios* 2001; 106 (414): 137-145.
- Race E, Dam E, Obry V, Paulous S, Clavel F. Analysis of HIV cross-resistance to protease inhibitors using a rapid single-cycle recombinant virus assay for patients failing on combination therapies. *AIDS* 1999, 13: 2061-2068.

- Raffi F. Enfuvirtide, first fusion inhibitor in the treatment of human immunodeficiency virus infection: mechanism of action and pharmacokinetics. *Med Mal Infect.* 2004 Sep; 34 Spec N° 1: 3-7.
- Ravela J, Betts BJ, Brun-Vézinet F, Vandamme AM, Descamps D, Van Laethem K, *et al.* HIV-1 Protease and reverse transcriptase mutation patterns responsible for discordances between genotypic drug resistance interpretation algorithms. *JAIDS* 2003; 33: 8-14.
- Re MC, Bon I, Monari P, Borderi M, Gibellini D, Schiavone P, *et al.* Mutation patterns of the reverse transcriptase genes in HIV-1 infected patients receiving combinations of nucleoside and non nucleoside inhibitors. *Int J Antimicrob Agents* 2003; 22 (4): 388-394.
- Requejo HI. Worldwide molecular epidemiology of HIV. *Rev Saude Publica* 2006; 40 (2): 331-345.
- Rey D, Hughes M, Pi JT, Winters M, Merigan TC, Katzenstein DA. HIV-1 reverse transcriptase codon 215 mutation in plasma RNA: immunologic and virology responses to zidovudine. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1998; 17 (3): 203-208.
- Ribera E, López-Cortés LF, Soriano V, Casado JL, Mallolas J. Therapeutic drug monitoring and the inhibitory quotient of antiretroviral drugs: can they be applied to the current situation? *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2005; 23 (Supl.2): 55-67.
- Ribera E, Ocaña I, Falcó V. Zidovudina. En: J. Guardiola y V. Soriano (eds.). *Tratamiento de la infección por VIH-Sida. Fármacos y combinaciones.* Barcelona, 2004. Publicaciones Permanyer: 5-19.
- Rivero A y Camacho A. Farmacología, datos in vitro y estudios en monoterapia con emtricitabina. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2005; 4 (1): 2-6.
- Robertson D, Anderson J, Bradac J *et al.* HIV-1 nomenclature proposal. *Science* 2000; 288: 55-56.
- Robinson BS, Riccardi KA, Gong YF, Guo Q, Stock DA, Blair WS *et al.* BMS-232632, a highly potent human immunodeficiency virus protease inhibitor that can be used in combination with other available antiretroviral agents. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000; 44(8): 2093-9.
- Romano L, Venturi G, Bloor S, *et al.* Broad nucleoside analogue resistance implications for human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase mutations at codons 44 and 118. *J Infect Dis* 2002; 185:898–904.

- Ross L, Gerondelis P, Liao Q, Wine B, Lim M, Shaefer M, *et al.* Selection of the HIV-1 reverse transcriptase mutation K70E in antiretroviral-naive subjects treated with tenfovir/abacavir/lamivudine therapy. *Antiviral Therapy* 2005; 10: S102.
- Ross L, Parkin N, Chappey C, Fisher R, Clair MS, Bates M, Tisdale M, Lanier ER. Phenotypic impact of HIV reverse transcriptase M184I/V mutations in combination with single thymidine analog mutations on nucleoside reverse transcriptase inhibitor resistance. *AIDS* 2004; 18 (12): 1691-1696.
- Ruíz L. Mecanismos de resistencia. En: V. Soriano (eds.). *Resistencias a los antirretrovirales* 2005. Barcelona: Publicaciones Permanyer; 2005. p.11-24.
- Ruxrungtham K, Bellos N, Morales-Ramirez J, Timerman A, Madruga J, Katabira E, *et al.* The metabolic profile of TMC278, an investigational non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor (NNRTI), 4th IAS Conference on HIV Pathogenesis, Treatment and Prevention, 22-25 Julio de 2007, Sydney, TUAB105.
- Saag MS, Sonneborg A, Torres RA, Lancaster D, Gazzard BG, Schooley RT *et al.* Antiretroviral effect and safety of abacavir alone and in combination with zidovudine in HIV-infected adults. Abacavir Phase 2 Clinical Team. *AIDS* 1998; 12: F203-209.
- Sa-Ferreira JA, Brindeiro PA, Chequer-Fernandez S, Tanuri A, Morgado MG. Human immunodeficiency virus-1 subtypes and antiretroviral drug resistance profiles among drug-naive Brazilian blood donors. *Transfusion* 2007; 47(1):97-102.
- Salzwedel K, Martin DE, Sakalian M. Maturation inhibitors: a new therapeutic class targets the virus structure". *AIDS Rev* 2007; 9 (3): 162-172.
- 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 (7): 437-440.
- Sargent DJ. Comparison of artificial networks with other statistical approaches. Results from medical data sets. *Cancer* 2001; 91:1636-1642.
- Sax PE. Meeting notes from the 2nd International AIDS Society Conference on HIV Pathogenesis and Treatment. Resistance rates in treatment-naive patients. *AIDS Clin Care* 2003; 15: 80.
- Sax PE, Islam R, Walensky RP, Losina E, Weinstein MC, Goldie SJ, *et al.* Should resistance testing be performed for treatment-naive HIV-infected patients? A cost-effectiveness analysis. *Clin Infect Dis* 2005; 41: 1316-23.

- Schinazi RF, McMillan A, Cannon D, Mathis R, Lloyd RM, Peck A, Sommadossi JP, St Clair M, Wilson J, Furman PA, et al. Selective inhibition of human immunodeficiency viruses by racemates and enantiomers of cis-5-fluoro-1-[2-(-(hydroxy-methyl)-1,3-oxanthiolan-5-yl)] cytosine. *Antimicrob Agents Chemother* 1992; 36 (11): 2423-2431.
- Schuetz JD, Connelly MC, Sun D, Paibir SG, Flynn PM, Srinivas RV, Kumar A, Fridland A. MRP4: A previously unidentified factor in resistance to nucleoside-based antiretroviral drugs. *Nat Med* 1999; 5:1048-1051.
- Schüpbach J. Human Immunodeficiency Viruses. En: PR Murray, EJ Baron, JH Jorgensen, MA Pfaller y RH Tenover (eds.). *Manual of Clinical Microbiology*. Washington. ASM Press, 2003; 1253-1281.
- Scudeller L, Torti C, Quiros-Roldan E, Patroni A, Lo Caputo S, Moretti F, et al. HIV susceptibility to amprenavir: phenotype-based versus rules-based interpretations. *J Antimicrob Chemother*. 2003 ; 52(5): 776-81.
- Shafer RW, Jung DR, Betts BJ. Human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase and protease mutation search engine for queries. *Nat Med* 2000; 6 (11): 1290-1292.
- Shulman N, Winters M. A review of HIV-1 resistance to the nucleoside and the nucleotide inhibitors. *Curr Drug targets Infect Disord* 2003; 3(4): 273-281.
- Sluis-Cremer N, Argoti-Torres P, Grzybowski J, Parikh U, Mellors J. Molecular mechanism of tenofovir, abacavir, and lamivudine resistance by the K70E mutation in HIV-1 reverse transcriptase. 13th Conference on Retroviruses Opportunistic Infections. Denver, Colorado (EEUU). 5-8 de Febrero de 2006.
- Smith DM, Wong JK, Hightower GK, Ignacio CC, Koelsch KK, Petropoulos CJ, et al. HIV drug resistance acquired through superinfection. *AIDS* 2005; 19(12): 1251-1256.
- Soares EA, Martinez AM, Souza TM, Santos AF, Da Hora V, Silveira J, Bastos FI, Tanuri A, Soares MA. HIV-1 subtype C dissemination in southern Brazil. *AIDS* 2005; 19 (Suppl. 4): S81-S86.
- Soriano V, de Mendoza C. Genetic mechanisms of resistance to NRTI and NNRTI. *HIV Clin Trials* 2002a; 3 (3): 237-248.
- Soriano V, de Mendoza C. Genetic mechanisms of resistance to protease inhibitors and entry inhibitors. *HIV Clin Trials* 2002b; 3(3): 249-257.
- Spence RA, Kati WM, Anderson KS, Johnson KA. Mechanism of inhibition of HIV-1 reverse transcriptase by nonnucleoside inhibitors. *Science*. 1995; 267 (5200): 988-993.

- Spruance SL, Pavia AT, Mellors JW, Murphy R, Gathe J Jr, Stool E, *et al.* Clinical efficacy of monotherapy with stavudine compared with zidovudine in HIV-infected, zidovudine-experienced patients. A randomized, double-blind, controlled trial. Bristol-Myers Squibb Stavudine/019 Study Group. *Ann Intern Med* 1997; 126 (5): 355-363.
- Steigbigel R, Kumar P, Eron J, *et al.* Results of BENCHMRK-2, a phase III study evaluating the efficacy and safety of MK-0518, a novel HIV-1 integrase inhibitor, in patients with triple-class resistant virus. 14th Conference on Retrovirus and Opportunistic Infections (CROI). Los Angeles, 2007. Abstract 105bLB.
- Swanson P, Soriano V, Devare SG, Hackett J, Jr. Comparative performance of three viral load assays on human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) isolates representing group M (subtypes A to G) and group O: LCx HIV RNA quantitative, AMPLICOR HIV-1 MONITOR version 1.5, and Quantiplex HIV-1 RNA version 3.0. *J Clin Microbiol* 2001; 39 (3): 862-870.
- Tatt ID, Barlow KL, Nicoll A, Clewley JP. The public health significance of HIV-1 subtypes. *AIDS* 2001; 15 (Suppl. 5): S59-71.
- Temin HM, Mizutani S. RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature* 1970; 226:1211-1213.
- The TMC-125 C233 Writing Group. Efficacy and safety of etravirine (TMC125) in patients with highly resistant HIV-1: primary 24-week analysis. *AIDS* 2007; 30; 21(6): F1-F10.
- The Working Group on Antiretroviral Therapy and Medical Management of HIV-Infected Children. Guidelines for the Use of Antiretroviral Agents in Pediatric HIV Infection. October 26, 2006 (Disponibile en: <http://aidsinfo.nih.gov>)
- Tomasselli AG, Henrikson RL. Targeting the HIV-protease in AIDS therapy: a current clinical perspective. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1477: 189-214.
- Torti C, Quiros-Roldan E, Keulen W, Scudeller L, Lo Caputo S, Boucher C, *et al.* Comparison between rules-based human immunodeficiency virus type 1 genotype interpretations and real or virtual phenotype: concordance analysis and correlation with clinical outcome in heavily treated patients. *J Infect Dis* 2003; 188(2): 194-201.
- Torti C, Uccelli MC, Quiros-Roldan E, Gargiulo F, Tirelli V, Lapadula G, *et al.* Prediction of early and confirmed virological response by genotypic inhibitory quotients for lopinavir in patients naïve for lopinavir with limited exposure to previous protease inhibitors. *J Clin Virol* 2006; 35 (4): 414-9.

- Trujillano J, March J, Badia M, Rodríguez A, Sorbías A. Aplicación de las redes neuronales artificiales para la estratificación de riesgo de mortalidad hospitalaria. *Gac Sanit* 2003; 17(6):504-511.
- Trujillano J, March J y Sorribas A. Aproximación metodológica al uso de redes neuronales artificiales para la predicción de resultados en Medicina. *Med Clin* 2004; 12 (Supl 1): 59-67.
- Tural C, Ruiz L, Holtzer C, Schapiro J, Viciano P, Gonzalez J, Domingo P, Boucher C, Rey-Joly C, Clotet B; Havana Study Group. Clinical utility of HIV-1 genotyping and expert advice: the Havana trial. *AIDS* 2002; 16(2): 209-18.
- Tuset M y Miró JM. Farmacología de tenofovir DF. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2004; 3 (2): 2-9.
- Underwood M, St Clair M, Ross L, Gerondelis P, Parkin N, Lanier R. Cross-resistance of clinical samples with K65R, L74V, and M184V mutations. In: Program and abstracts of the 12th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections; February 22-25, 2005; Boston, Mass. Abstract 714.
- Valdez H, Hall DB, Kohlbrenner VM, Boucher CA, Schapiro J, Baxter J *et al.* Non-response to tipranavir is associated with pretreatment resistance characterized by tipranavir phenotype or genotypic tipranavir score. XIV International HIV Drug Resistance Workshop: basic principles and clinical implications, 7-11 June 2005, Québec City, Québec, Canada, abstract 27.
- Van Leth F, Andrews S, Grinsztejn B, Wilkins E, Lazanas MK, Lange JM, *et al.* The effect of baseline CD4 cell count and HIV-1 viral load on the efficacy and safety of nevirapine or efavirenz-based first-line HAART. *AIDS* 2005; 19 (5): 463-471.
- Vanden Haesevelde M, Decourt JL, De Leys RJ, Vanderborght B, van der Groen G, van Heuverswijn H, Saman E. Genomic cloning and complete sequence analysis of a highly divergent African human immunodeficiency virus isolate. *J Virol* 1994; 68 (3): 1586-1596..
- Van Vaerenbergh K, Harrer T, Schmit JC, Carbonez A, Fontaine E, Kurowski M, *et al.* Initiation of HAART in drug-naïve HIV type 1 patients prevents viral breakthrough for a median period of 35. 5 months in 60% of the patients. *AIDS Res Hum Retrov* 2002;18 (6): 419-426.
- Vandamme AM, Sönnnerborg A, Ait-Khaled M, Albert J, Asjo B, Bacheler L *et al.* Updated European recommendations for the clinical use of HIV drug resistance testing. *Antiviral Therapy* 2004; 9 (6): 829–848.

- Vandamme AM, Van Vaerenbergh K, De Clercq E. Anti-human immunodeficiency virus drug combination strategies. *Antivir Chem Chemother* 1998; 9 (3): 187-203.
- Van Harmelen J, Wood R, Lambrick M, Rybicki EP, Williamson AL, Williamson C. An association between HIV-1 subtypes and mode of transmission in Cape Town, South Africa. *AIDS* 1997; 11:81-87.
- Vercauteren J and Vandamme AM. Algorithms for the interpretation of HIV-1 genotypic drug resistance information. *Antiviral Research* 2006; 71: 335–342.
- Villalba N, Soriano V, Gómez-Cano M, Castilla J, Mas A, González-Lahoz J. Short-term efficacy and safety of stavudine in pretreated HIV-infected patients. *Antivir Ther* 1997; 2:185-189.
- Vingerhoets J, Buelens A, Peeters M, Picchio G, Tambuyzer L, Van Marck H, *et al.* Impact of baseline NNRTI mutations on the virological response to TMC125 in the Phase III clinical trials DUET-1 and DUET-2. XVIth International HIV Drug Resistance Workshop, Barbados, 12-16 June 2007. *Antivir Ther* 2007; 12: S34. Abstract 32.
- Wainberg MA. HIV resistance to nevirapine and other non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2003; 34 (Suppl. 1): S2-7.
- Wainberg MA, Turner D. Resistance issues with nucleoside/nucleotide backbone options. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2004; 37:S36-S43.
- Wang D, DeGrutola V, Hammer S, Harrigan R, Larder B, Wegner S *et al.* A collaborative HIV resistance response database initiative: predicting virological response using neural networks models. *Antivir Ther* 2002; 7: S96-S97. Abstract 119.
- Wang D, Larder B, Revell A, Harrigan R, Montaner J. A neural network model using clinical cohort data accurately predicts virological response and identifies regimens with increased probability of success in treatment failures. *Antivir Ther* 2003**b**; 8: S112.
- Wang D, Larder B. Enhanced prediction of lopinavir resistance from genotype by use of artificial neural networks. *JID* 2003**a**; 188: 653–660.
- Waters J, Margot N., McColl D, Zhong L, Miller M. K65R, L74V and thymidine analog mutations in HIV-1 RT associated with reduced response to tenofovir DF in ART-experienced patients. 13th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. Denver, Colorado (EEUU). 5-8 Febrero 2006. Abstract 633.
- Weinstein MC, Goldie SJ, Losina E, Cohen CJ, Baxter JD, Zhang H, *et al.* Use of genotypic resistance testing to guide HIV therapy: clinical impact and cost-effectiveness. *Ann Intern Med* 2001; 134: 440-450.

- Whitcomb JM, Parkin NT, Chappey C, Hellmann NS, Petropoulos CJ. Broad nucleoside reverse-transcriptase inhibitor cross-resistance in human immunodeficiency virus type 1 clinical isolates. *J Infect Dis* 2003;188 (7): 992-1000.
- White KL, Chen JM, Margot NA, Wrin T, Petropoulos CJ, Naeger LK, Swaminathan S, Miller MD. Molecular mechanisms of tenofovir resistance conferred by human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase containing a diserine insertion after residue 69 and multiple thymidine analog-associated mutations. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48 (3): 992-1003.
- Wilson JW. Update on Antiretroviral Drug Resistance Testing: Combining Laboratory Technology With Patient Care. *AIDS Read* 2003;13 (1): 25-38.
- Wong JK, Hezareh M, Günthard HF, Havlir DV, Ignacio CC, Spina CA, Richman DD. Recovery of replication-competent HIV despite prolonged suppression of plasma viremia. *Science* 1997; 278 (5341): 1291-1295.
- Yamaguchi J, Bodelle P, Vallari AS, Coffey R, McArthur CP, Schochetman G, *et al.* HIV infections in Northwestern Cameroon: Identification of HIV type 1 group O and dual HIV type 1 group M and group O infections. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2004; 20: 944-957.
- Yerly S, Vora S, Günthard H, Vernazza P, Furrer H, Hirsch H, *et al.* Virological response following switch to Atazanavir/Ritonavir in relation to baseline genotypic resistance pattern. XIII HIV International Drug Resistance Workshop. 8-12 de Junio de 2004. Tenerife, Islas Canarias, España. Abstract 149.
- Zaccarelli M, Perno CF, Forbici F, Soldani F, Bonfigli S, Gori C, *et al.* Q151M-mediated multinucleoside resistance: prevalence, risk factors, and response to salvage therapy. *Clin Infect Dis* 2004; 38 (3): 433-437.
- Zennou V, Mammano F, Paulous S, Mathez D, Clavel F. Loss of viral fitness associated with multiple Gag and Gag-Pol processing defects in human immunodeficiency virus type 1 variants selected for resistance to proteasa inhibitors in vitro. *J Virol* 1998; 72: 3300-3306.
- Zolopa AR, Lazzeroni LC, Rinehart A, Brun-Vezinet F, Clavel F, Collier A *et al.* Accuracy, precision and consistency of expert HIV type 1 genotype interpretation: an international comparison (the GUESS study). *Clin Infect Dis* 2005; 41: 92-99.
- Zoloppa A. Incorporating drug-resistance measurements into the clinical management of HIV-1 infection. *JID* 2006;194 (Supl.1); S59-64.

Zolopa AR, Lampiris H, Blick G, Walworth C, Zhong L, Chuck SL, *et al*. The HIV integrase inhibitor elvitegravir has potent and durable activity in treatment-experienced patients with optimized background therapy. 47th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Chicago, Illinois, USA. 17-20 de Septiembre de 2007. Abstract H-714.