

**Diversidad genética del virus de la
inmunodeficiencia humana en el plasma
seminal respecto a la sangre después del
tratamiento antirretroviral a corto plazo**



**UNIVERSIDAD
DE GRANADA**

Programa de Doctorado en Medicina Clínica y Salud Pública

Doctorando:

Miguel Ángel López Zúñiga

Directores:

Miguel Ángel López Ruz

Federico García García

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Miguel Ángel López Zúñiga
ISBN: 978-84-1306-557-1
URI: <http://hdl.handle.net/10481/63301>

AGRADECIMIENTOS

Este proyecto no hubiera sido posible sin ellos, sin mis directores. En primer lugar al Dr. García-García, gracias por tu disposición, tu aceptación; gracias por cedernos tu laboratorio, tus prestaciones técnicas y económicas y, sobre todo, gracias por guiarnos en el complicado mundo de la microbiología molecular viral.

Gracias a ti, al alma mater de este proyecto, al otro director de esta tesis, al Dr. López-Ruz; quién me invitó a coger las riendas de este proyecto, quién me guio en el proceso de llevar a cabo un proyecto de esta envergadura. Quién luchó sobremanera para que este saliera adelante.

Gracias a Omar, Alicia, Carmen, David, Natalia, Adolfo y a José Ángel por permitirme realizar este proyecto a través de su colaboración reclutando y realizando labores técnicas. Gracias a Rafa Luque y César Ramírez por abrirme las puertas del servicio de anatomía patológica para poder almacenar correctamente nuestras muestras. A Carolina Roldan, por su entera disposición y gestión en el traslado de muestras.

No puedo dejar de agradecer a Mercedes y su libreta, sin su riguroso control de la recogida de muestras, este proyecto hubiera sido mucho más

complejo. Gracias a José Juan por su apoyo y guía en el complejo mundo burocrático.

Por último, a mi familia, la de casa y la de unas casas más abajo, por haberme dado una educación ejemplar y haber hecho el esfuerzo para que pudiera estudiar. Por aguantarme, por llevarme en volandas durante una infancia que no fue fácil para nadie, pero sobre todo, por no levantarme cada vez que me caí. A ti mamá, a ti Dani, gracias por vuestra paciencia infinita. Sin vosotros no estaría escribiendo esto ahora.. Espero que me permitan hacer una mención especial a uno de mis directores, en su función de padre, por el esfuerzo que ha supuesto, por aguantar mis incomprensiones, por negarme la razón más allá de los sentimientos. Por hacerme crecer, por hacerme tal y como soy. Gracias a ti, papá.

Este nuevo avance, este nuevo paso, este doctorado es realidad gracias a cada uno de vosotros, a la unión de las fuerzas de cada uno de vosotros. Eternamente, gracias.


D.FEDERICO GARCÍA GARCÍA JEFE DEL SERVICIO DE MICROBIOLOGÍA DEL HOSPITAL CLÍNICO UNIVERSITARIO SAN CECILIO DE GRANADA.

CERTIFICA:

Que Don Miguel Ángel López Zúñiga ha realizado bajo mi dirección el trabajo de Tesis Doctoral sobre el tema “DIVERSIDAD GENÉTICA DEL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA EN EL PLASMA SEMINAL RESPECTO A LA SANGRE DESPUÉS DEL TRATAMIENTO ANTIRRETROVIRAL A CORTO PLAZO” que ha finalizado con aprovechamiento, habiendo sido revisado y estando conforme con su presentación para obtener el grado de Doctor, siempre que así lo considere la Universidad de Granada.

Granada, 9 de Mayo de 2020

GARCIA
GARCIA
FEDERICO -
28711062R



Firmado digitalmente
por GARCIA GARCIA
FEDERICO -
28711062R
Fecha: 2020.05.09
06:26:34 +02'00'

Fdo: Federico García García

El doctorando / The *doctoral candidate* [**Miguel Ángel López Zúñiga**] y los directores de la tesis / and the thesis supervisor/s: [**Miguel Ángel López Ruz y Federico García García**]

Garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

/

Guarantee, by signing this doctoral thesis, that the work has been done by the doctoral candidate under the direction of the thesis supervisor/s and, as far as our knowledge reaches, in the performance of the work, the rights of other authors to be cited (when their results or publications have been used) have been respected.

Lugar y fecha / Place and date:

Granada, 17 de mayo de 2020

Director/es de la Tesis / *Thesis supervisor/s*;

Doctorando / *Doctoral candidate*:

**LOPEZ RUZ
MIGUEL ANGEL
- 24130655K**

Firmado digitalmente
por LOPEZ RUZ MIGUEL
ANGEL - 24130655K
Fecha: 2020.05.17
17:51:30 +02'00'

**LOPEZ ZUÑIGA
MIGUEL
ANGEL -
75171366Y**

Firmado digitalmente
por LOPEZ ZUÑIGA
MIGUEL ANGEL -
75171366Y
Fecha: 2020.05.17
17:18:53 +02'00'

**GARCIA GARCIA
FEDERICO -
28711062R**

Firmado digitalmente
por GARCIA GARCIA
FEDERICO - 28711062R
Fecha: 2020.05.17
18:29:38 +02'00'

Firma / Signed

Firma / Signed

ÍNDICE

ABREVIATURAS	15
RESUMEN	17
SITUACIÓN ACTUAL DEL VIH	25
1. INTRODUCCIÓN AL VIH	27
2. ETIOLOGÍA	29
2.1. Características generales VIH	29
2.2. Estructura del VIH	30
2.3. Ciclo biológico del VIH	32
2.4. Diversidad genética y concepto de cuasiespecies	36
3. EPIDEMIOLOGÍA	37
3.1. Factores de riesgo e infectividad	37
4. PATOGENIA Y MANIFESTACIONES CLÍNICAS	43
5. DIAGNÓSTICO	49
5.1. Pruebas a realizar cuando se diagnostica una infección por el VIH	52
5.2. Implicaciones de salud pública	54
6. TRATAMIENTO	57
6.1. Objetivo del tratamiento	57
6.2. Grupos farmacológicos	59
6.3. Terapia inicial	64
6.4. Efectos secundarios del tratamiento antirretroviral	66
6.5. Interacciones	67
6.6. Síndrome de reconstitución inmune	68
7. PROFILAXIS DE LA INFECCIÓN VIH	71

8. PROFILAXIS EN EL PACIENTE VIH POSITIVO	75
9. SEGUIMIENTO DEL PACIENTE CON VIH	77
SITUACIÓN ACTUAL DEL PROBLEMA EN ESTUDIO	81
HIPÓTESIS	87
OBJETIVOS	91
MATERIAL Y METODOS	95
RESULTADOS	103
DISCUSIÓN	111
CONCLUSIONES	117
BIBLIOGRAFÍA	121
ARTÍCULO	135
ANEXO	159

ABREVIATURAS

3TC	Lamivudina
ABC	Abacavir
ATV	Atazanavir
BIC	Bictegravir
CVP	Carga viral plasmática
d4T	Estavudina
ddI	Didanosina
DRV	Darunavir
DTG	Dolutegravir
DOR	Doravirina
EFV	Efavirenz
ENF	Enfuvirtida
ETR	Etravirina
EVG	Elvitegravir
EVG/c	Elvitegravir potenciado con cobicistat
FAR	Fármacos antirretrovirales
FPV	Fosamprenavir
FTC	Emtricitabina
G6PD	Glucosa 6 fosfato-deshidrogenasa
HLA	Antígenos leucocitarios humanos
IGRA	Interferon-Gamma. Release Assay
INI	Inhibidor de la integrasa
IP	Inhibidor de la proteasa
IP/p	Inhibidor de la proteasa potenciado

IP/r/c	Inhibidor de la proteasa potenciado con ritonavir o cobicistat
ITIAN	Inhibidor transcriptasa inversa análogo de nucleósido/tido.
ITINN	Inhibidor transcriptasa inversa no nucleósido
ITS	Infecciones de transmisión sexual
LPV	Lopinavir
MVC	Maraviroc
NVP	Nevirapina
PPD	Prueba cutánea de derivado proteico purificado
RAL	Raltegravir
RCV	Riesgo cardiovascular
RHS	Reacción de hipersensibilidad
RPV	Rilpivirina
RTV	Ritonavir
SQV	Saquinavir
SNC	Sistema nervioso central
TAF	Tenofovir alafenamida
TAR	Tratamiento antirretroviral; ídem. de alta eficacia
TBC	Tuberculosis
TDF	Tenofovir disoproxil fumarato
TPV	Tipranavir
VIH-1	Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1
VIH-2	Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 2
VH	Virus de la hepatitis (A, B, C)
ZDV	Zidovudina

RESUMEN

La infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) es una de las epidemias que afectan a la población mundial. La vía sexual, seguida de la vía parenteral son las principales vías de transmisión del VIH; siendo el semen el vector responsable de la mayoría de las transmisiones sexuales a nivel mundial. Actualmente, la cuantificación de la carga viral en la sangre se utiliza, en la práctica clínica, para evaluar la eficacia de la terapia y el control de la enfermedad. Sin embargo, se sabe que la cinética de la replicación viral del VIH en el compartimento sanguíneo difiere de su cinética en el compartimento seminal. Sin embargo, el VIH libre en el plasma seminal parece ser el que resulta ser verdaderamente infeccioso, y dicha infectividad depende de la carga viral. La presencia del virus en este compartimento puede ser intermitente, independientemente del lapso de tiempo de un resultado negativo en la muestra de sangre. De forma similar, se ha encontrado ARN del VIH positivo en líquido seminal a pesar de existir un resultado negativo para el ARN del VIH en la sangre.

El tiempo hasta la de supresión virológica varía en función del régimen del TAR y el compartimento estudiado; siendo Inhibidores de la integrasa (INIs) y regímenes basados en la rilpivirina los mejores en plasma seminal seguido de inhibidores de la proteasa (IP).

A pesar de lo descrito anteriormente, lo que ocurre en el compartimento seminal no se entiende bien hasta la fecha. Por lo tanto, en

el presente estudio investigamos la cinética viral y las cuasispecies en pacientes infectados por el VIH que inician la terapia antirretroviral (TAR) con el doble objetivo de estudiar las cuasispecies en plasma seminal y sangre antes de iniciar el tratamiento antirretroviral y tras un mes de tratamiento; así como su comportamiento con las diferentes familias de antirretrovirales en el plasma seminal y en la sangre.

Para ello se incluyeron varones mayores de 18 años infectados por el VIH sin tratamiento antirretroviral previo. En todos ellos se obtuvieron muestras de sangre y plasma seminal antes del inicio del TAR (T0) y un mes (T1) después del inicio del TAR y se registraron las siguientes variables: edad, el sexo, las infecciones concomitantes de transmisión sexual, la carga viral del VIH (copias de ARN/ml), las resistencias basales y el recuento de células CD4 (células/ μ L), a través de la historia clínica y analíticas. El régimen de tratamiento se registró al inicio del estudio (T0). La carga viral del VIH, el recuento de CD4 y la diversidad del VIH se registraron en T0 y en T1. La diversidad de VIH se estudió en todas las muestras utilizando un protocolo de secuenciación masiva, registrándose únicamente las cuasispecies que representaban más del 5% de la población. La diversidad de la cuasispecies del VIH se calculó utilizando el índice Shannon.

Se reclutaron cuarenta y siete pacientes infectados por el VIH naive al TAR, con una mediana de edad de 30 años, una carga viral media de 29.2513 copias (log 4.56) y un recuento medio de CD4 de 494 células/ μ L. En la fase de reclutamiento (T0), 4 pacientes (8,51%) tenían signos clínicos de infección aguda por VIH, 6 (12,8%) pacientes iniciaron un régimen basado en los inhibidores de la transcriptasa inversa no nucleósidos (NNRTI), 10 (21,3%) pacientes iniciaron un régimen basado en IP, y 31 (65,6%) pacientes iniciaron un régimen basado en INI.

Al inicio, pudimos secuenciar 47 muestras de sangre y plasma seminal. El número medio de secuencias estudiadas en sangre fue de 68.458 (rango 58.307-79.352). El número medio de secuencias estudiadas en plasma seminal fue de 65.435 (rango 54.675-73.669). Usando el límite del 5% preconfigurado, el número de cuasiespecies en la sangre fue menor que en el compartimento seminal ($p < 0.01$).

Respecto al número de cuasiespecies, se encontró una mediana de 4 (IQR 2-5) cuasiespecies diferentes en el compartimento sanguíneo, mientras que una mediana de 6 (IQR 4-8) diferentes cuasiespecies se encontraron en el líquido seminal. Todos los pacientes, excepto uno, mostraron un mayor número de cuasiespecie en plasma seminal que en el compartimento sanguíneo. Del mismo modo, el índice Shannon fue más alto en el compartimento seminal que en la sangre (1,77 vs 0,64) ($p < 0.001$).

Para caracterizar aún más la evolución de la diversidad viral tanto en el compartimento seminal como en el compartimento sanguíneo, estudiamos la *env* en 33 pacientes para los que se tenían muestras en T0 y T1 emparejadas de sangre y plasma seminal. En T1 (1 mes después del tratamiento con ART), se encontró una disminución significativa ($p < 0.001$) tanto en sangre (T0: 3[2-5] vs T1: 0[0-1]) como en plasma seminal (T0: 6[4-7.5] vs T1: 0[0-2]). El ARN del VIH fue indetectable tanto en sangre como en plasma seminal en 16 pacientes (48,5%). Se encontraron resultados discordantes en 4/33 pacientes (12,1%) caracterizados por ARN VIH-1 detectable en el plasma seminal pero ARN VIH-1 indetectable en el plasma sanguíneo.

Los pacientes tratados con INI alcanzaron la indetectabilidad con mayor probabilidad tanto en sangre como en plasma seminal ($p < 0.001$) que los pacientes tratados con un IP o con un régimen basado en NNRTI, incluso partiendo (T0) de cargas sanguíneas virales superiores a otros regímenes (INI 47.423 [4,502-339,750], IP 8.220 [4,730-42,700], NNRTI 46,300 [32,050-83,650]). De igual forma, se produjo una disminución en el número de cuasiespecies en ambas muestras ($p < 0.001$) con INI, no encontrándose con los PI ni con los NNRTI.

Por ello, concluimos que existe una mayor variabilidad genética en el plasma seminal que en la sangre en el diagnóstico de la infección VIH y al

mes después de la iniciación del TAR; y que la disminución en el número de cuasiespecies es más eficiente con INI que con otros regímenes tanto en sangre como en plasma seminal.

SITUACIÓN ACTUAL DEL VIH

1. INTRODUCCIÓN AL VIH

El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) es el agente patógeno causal del síndrome de la inmunodeficiencia humana adquirida (SIDA). Este virus fue aislado por primera vez en 1983¹, pero no fue hasta 1985, cuando se desarrolló, por primera vez, una prueba serológica diagnóstica capaz de detectar el VIH. Un año antes se aceptaba el término SIDA para referirse a un síndrome denominado de la inmunodeficiencia adquirida, que estaba causando, desde 1981, en hombres previamente sanos que tenían relaciones sexuales con hombres, casos de infecciones oportunistas y enfermedades neoplásicas, característicamente, neumonía por *Pneumocystis jirovecii* y sarcoma de Kaposi².

En todos estos infectados se estableció un perfil común, similar al que presentaban pacientes infectados por el virus de la hepatitis B (VHB), que tenía 4 características clínico-epidemiológicas: heroinomanos, homosexuales, hemofílicos y hemotransfundidos³. El paralelismo con el VHB propició que se pensara en su transmisión sanguínea y sexual.

En 1987, cuatro años después del primer aislamiento del virus, se introdujeron los fármacos antirretrovirales en el tratamiento de estos pacientes, viéndose revolucionado por la terapia antirretroviral combinada (TARGA) en 1996. A pesar de la ausencia de una cura, la historia natural de la enfermedad cambió radicalmente, y ahora, las personas con infección por

VIH sin otras comorbilidades significativas que son tratadas antes de una inmunosupresión significativa pueden esperar una esperanza de vida próxima a la de la población general⁴. La atención clínica en la prevención de la transmisión y el control de las enfermedades asociadas al riesgo cardiovascular, que supone la principal causa de morbimortalidad en estos tiempos, ocupan una parte importante del seguimiento de estos pacientes.

2. ETIOLOGÍA

2.1 Características generales del VIH

El VIH pertenece a la familia de los retrovirus humanos, subfamilia de los lentivirus. Los lentivirus son retrovirus exógenos no oncogénicos que causan infecciones persistentes, dando lugar a enfermedades con largos periodos de incubación⁵.

Según diferentes variantes genéticas, el VIH se divide en dos tipos: VIH-1 y VIH-2. Paralelamente a la genética, su procedencia también parece ser diferente. El VIH-1 procede de chimpancés y gorilas del África occidental, mientras que el VIH-2 está relacionados con el primate africano del oeste; el mangabey gris⁶. Estos, a su vez, se dividen en grupos:

- El VIH-1 engloba los grupos: M, N, O y P. El Grupo M del VIH 1 tiene 9 subgrupos A-K y muchas formas recombinantes.
- El VIH-2 engloba los grupos A-H.

El VIH-1 es el responsable de la epidemia mundial de SIDA, mientras que el VIH-2 es endémico del África Oriental, de países como Senegal, Gambia, Liberia, Ghana o Nigeria. Siendo este último muchos menos virulento que el VIH-1, caracterizándose por viremias bajas y una menor transmisibilidad⁷.

2.2 Estructura del VIH

La partícula viral o virión tiene una estructura icosaédrica de un diámetro 80-120nm. Su estructura se compone de tres capas (*figura 1*):

- El virión se nutre de la célula hospedadora para elaborar una envoltura lipídica, que contienen estructuras proteicas, como moléculas HLA clase I y II o proteínas de adhesión, como la CAM-1, que también conforman la envoltura. Así mismo en esta envoltura se insertan diferentes complejos de glicoproteína (gp) formados por la unión de gp120 y gp41, que conforman trímeros.
- La cápside está formada por la proteína p24 (p26 en VIH-2). La proteína p24 es el antígeno más fácil de detectar y son los anticuerpos contra él, los que se utilizan para el diagnóstico de infección por VIH-1 por medio de ELISA⁸.
- En el núcleo del virus se encuentra el genoma viral acompañado de nucleoproteínas asociadas a la cápside como pueden ser p7/p9 y de múltiples enzimas necesarias para su replicación, principalmente: transcriptasa inversa, proteasa e integrasa¹.

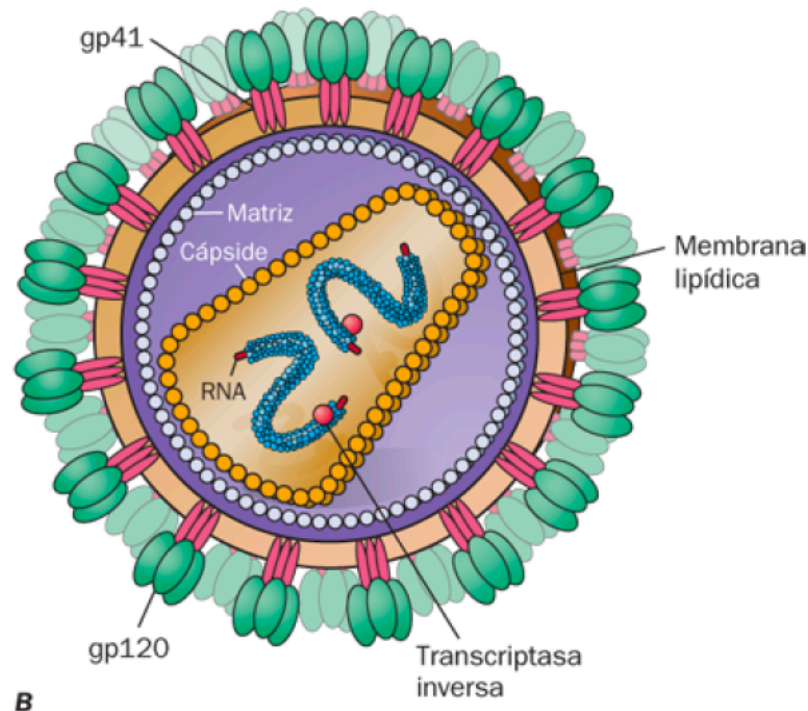


Figura 1. Estructura del VIH. Fuente: Fauci AS; Folker GKs; Lane HC. Enfermedad por el virus de la inmunodeficiencia humana: sida y trastornos relacionados. En: Larry Jameson J, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Losclazo J. Harrison. Principios de Medicina Interna, 20e. New York, NY: McGraw-Hill; 2018. Figura 197-2, Estructura del VIH-1: p 1396

El genoma del VIH está formado por dos hebras idénticas de ARNm con polaridad positiva, que contienen 3 genes fundamentales que codifican las proteínas estructurales del virus (*figura 2*):

- a) *Gag* que codifica las proteínas estructurales que forman el núcleo o core del virión, incluyendo p24
- b) *Pol* que codifica las enzimas: proteasa, transcriptasa inversa e integrasa, necesarias para la replicación del virus.
- c) *Env* que codifica las glicoproteínas de la envoltura

- d) Existen otros genes accesorios, así como secuencias repetidas (LTR) que participan en la patogénesis del virus permitiendo su integración en el genoma de la célula huésped

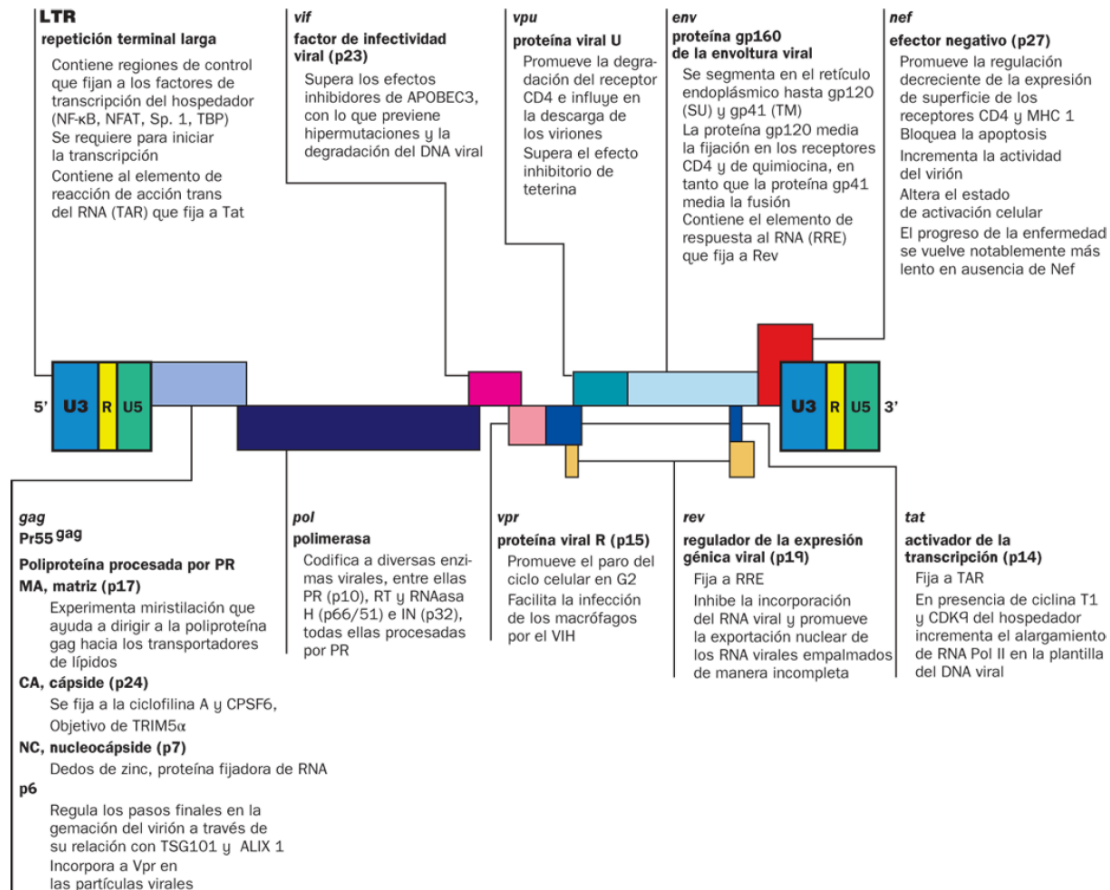


Figura 2. Genoma del VIH. Fuente: Fauci AS; Folker GKs; Lane HC. Enfermedad por el virus de la inmunodeficiencia humana: sida y trastornos relacionados. En: Larry Jameson J, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Losclazo J. Harrison. Principios de Medicina Interna, 20e. New York, NY: McGraw-Hill; 2018. Figura 197-5, Organización del genoma del provirus del VIH: p 1398

2.3 Ciclo biológico del VIH

El VIH penetra en el organismo a través de las mucosas, habitualmente genito-oral, o de la sangre, infectando, principalmente, a linfocitos T CD4+, células dendríticas y macrófagos. Esta infección celular está mediada por diferentes correceptores. Para que el virus penetre en la célula diana precisa

que los trímeros de la glicoproteína gp120 y gp41, sufran un cambio en su conformación tras su unión a la molécula CD4⁸. Esta primera unión permite la posterior interacción de estos trímeros con receptores de quimiocinas (CCR5 y/o CXCR4)⁹, que actúan como correceptores.

Independientemente del correceptor utilizado, esta pequeña cascada permite que la glucoproteína gp41 modifique su conformación y exponga una región hidrófoba, denominada péptido de fusión, que se inserta en la membrana celular y permite que la membrana del virus se fusione con la membrana de la célula diana⁹, permitiendo la entrada del virión (*figura 3*).

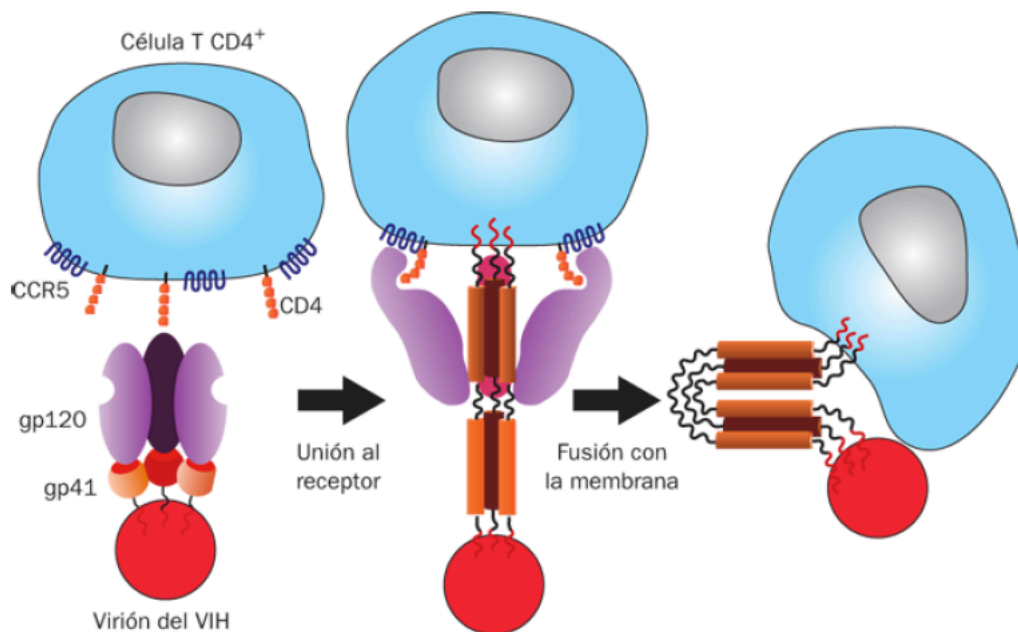


Figura 3. Proceso de fijación y fusión del VIH mediante la interacción de gp120 con los receptores celulares. Fuente: Fauci AS; Folker GKs; Lane HC. Enfermedad por el virus de la inmunodeficiencia humana: sida y trastornos relacionados. En: Larry Jameson J, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Losclazo J. Harrison. Principios de Medicina Interna, 20e. New York, NY: McGraw-Hill; 2018. Figura 197-4, Fijación y fusión del VIH-1 con su célula blanco: p 1398

En el citoplasma, las enzimas de la nucleoproteína se activan y rompen el núcleo nucleoproteico del virus, liberando el genoma y la retrotranscriptasa vírica, lo que permite la transcripción del ARNm en ADN vírico. Posteriormente, la integrasa vírica cataliza la integración del genoma vírico en el ADN celular.

El ADN del VIH-1 integrado se denomina provirus, la actividad del mismo puede variar, pudiendo estar latente¹⁰, es decir, no transcribirse durante meses o años, teniendo una producción escasa o nula de nuevos viriones; o puede transcribirse y, tras la intervención de la proteasa que procesa el virus, dar lugar a la formación de nuevos virus, tras adquirir la envoltura externa a partir de la membrana celular, liberándose finalmente los virus y produciéndose la muerte celular.

La última fase en la conformación de nuevos virus es el anclaje de poliproteínas gag-pol a la membrana plasmática de la célula y a las poliproteínas ARN del virus, siendo este último envuelto por las poliproteínas gag-pol y, paralelamente, de la membrana de la célula, adquiriendo su envuelta mediante gemación.

Se extiende por el tejido linfóide local (principalmente, el epitelio cervicovaginal, tonsilar y adenoidal¹¹) y a los pocos días, se produce una replicación viral con viremia y diseminación al tejido linfóide periférico.

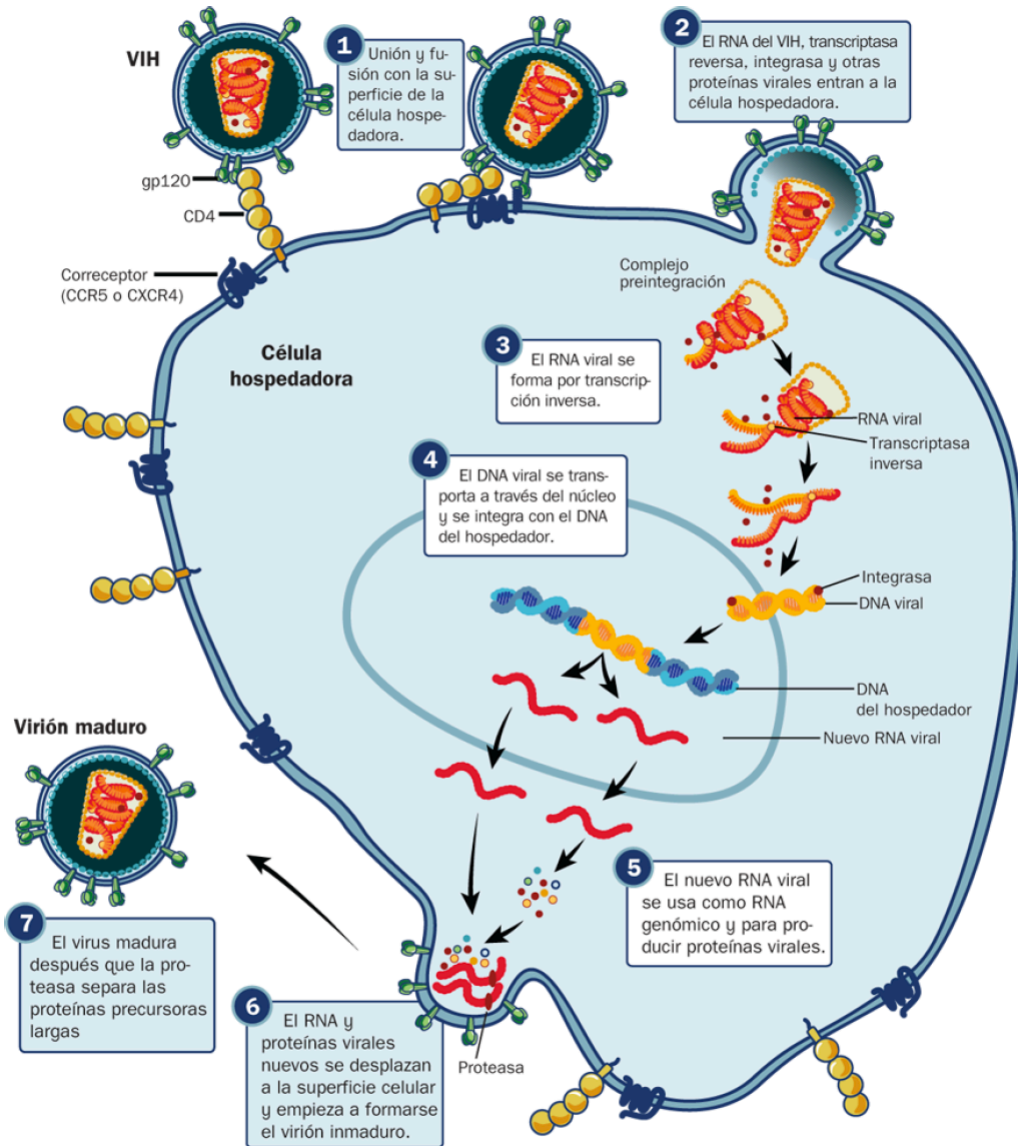


Figura 4. Ciclo de replicación del VIH. Fuente: Fauci AS; Folker GKs; Lane HC. Enfermedad por el virus de la inmunodeficiencia humana: sida y trastornos relacionados. En: Larry Jameson J, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Losclazo J. Harrison. Principios de Medicina Interna, 20e. New York, NY: McGraw-Hill; 2018. Figura 197-3, Ciclo de replicación del VIH: p 1397

Este paso al tejido linfóide periférico supone la línea roja para considerar la infección como irreversible.

2.4 Diversidad genética y concepto de cuasiespecies

Toda esta cascada de replicación vírica y formación de nuevos viriones está asociada a una alta tasa de error de la transcriptasa inversa viral (RT), altas tasas de replicación de virus y eventos de recombinación homóloga¹²; lo que conlleva una gran variabilidad e inestabilidad genética. Esto implica que el sistema inmune sea incapaz de generar mecanismos de eliminación y/o destrucción del virus.

Estas variaciones mínimas generan diferentes virus pero íntimamente relacionados genéticamente entre sí. A estas diferentes variantes se les denomina cuasiespecies^{13,14}. Dichas variantes están influenciadas por las tasas de mutación durante la replicación viral y en algunos casos también por recombinación molecular y reordenamiento del segmento genómico¹⁵. Cada una de estas variantes tienen unas características determinadas, pudiendo generar una mayor replicación¹⁶ o, potencialmente, generar algún tipo de resistencia a fármacos o perdurar más en determinados compartimentos. Esto conlleva una selección “natural” de las cuasiespecies víricas más resistentes a las presiones ejercidas sobre ellas¹⁷, permitiendo la adaptación de las cuasiespecie y su persistencia en el huésped y la capacidad de superar otras variantes menos adaptadas¹⁸. Esta capacidad de mutar y generar nuevas cuasiespecies supone un reto a nivel clínico y preventivo ya que, hasta la fecha, estas mutaciones permiten al virus eludir la respuesta inmunitaria.

3. EPIDEMIOLOGÍA

El binomio formado por la infección por el VIH y el SIDA, presente en todo el mundo, representa un dramático problema de salud mundial, con una mortalidad acumulada que supera los 35 millones de personas y una mortalidad anual mayor de 1 millón de personas¹⁹. Habiendo una incidencia acumulada de actualidad de 76 millones de casos.

Su extensión y morbimortalidad es mayor en países en vías de desarrollo, sobre todo en África y sudeste asiático (donde se encuentran el 77% de los afectados mundiales¹⁹), donde la escasez de recursos y acceso a la sanidad hacen del VIH/SIDA un drama. En los últimos años está habiendo un descenso del número de nuevos casos respecto al inicio de la pandemia y una disminución de la mortalidad en aquellos países que tienen acceso al tratamiento antirretroviral, aún así se registran más de 2 millones de casos nuevos anuales¹⁹.

3.1 Factores de riesgo e infectividad

La infección por VIH implica de forma preceptiva el intercambio de fluidos sanguíneos o genitales entre huésped y receptor. Se han descrito diversas vías infectivas por VIH: consumidores de drogas inyectables, los receptores de productos sanguíneos y los trabajadores sanitarios con exposición a pinchazos con aguja con sangre infectada o transmisión

perinatal y la vía sexual²⁰; siendo, actualmente, esta última la principal vía. La transmisión sexual es mayoritariamente heterosexual en los países en vías de desarrollo; mientras que en Europa y Estados Unidos la mayoría de las infecciones son por vía homosexual, habiendo disminuido de forma drástica en estos países la infección en adictos a drogas por vía parenteral ADVP, aunque está cogiendo fuerza en los países de la antigua Unión Soviética, de Europa del Este y algunas zonas de EEUU.

En relación a la vía sexual, la infectividad va a depender, principalmente, de la carga viral (mucho más altas en pacientes en periodo de primoinfección). La carga viral sanguínea y en líquido seminal parece seguir un patrón similar, aunque no siempre, adquiriendo los niveles más altos 20 días después de la infección o seis días después de la aparición de los síntomas para aquellos con un síndrome retroviral agudo^{21,22,23}. Así mismo existe un mayor riesgo de transmisión en prácticas sexuales que pudieran conllevar ruptura de la integridad mucosa, como son la relaciones entre varones homosexuales; y obviamente, un mayor riesgo a mayor número de contactos sexuales²⁴. Otro factor que conlleva una mayor infectividad es la presencia de otras infecciones de transmisión sexual (ITS), destacando aquellas que cursan con lesiones ulcerosas como el virus herpes simple o la sífilis^{25,26}, sin ser esto un factor excluyente²⁷.

Estas dos, la sexual y la sanguínea, suponen las dos principales vías de adquisición de la enfermedad. Muchas personas que usan drogas inyectables también participan en conductas sexuales de riesgo, como el sexo sin protección y el sexo con múltiples parejas, que aumenta el riesgo de infección por VIH²⁸.

Por último, los varones sin circuncisión parecen tener una mayor tasa de adquisición del virus^{29,30,31}; se teoriza que esto pudiera deberse a la alta presencia de células de Langerhans y los macrófagos, entre otras, en el prepucio masculino³². Sin embargo, no ha demostrado disminuir el riesgo de transmitir la enfermedad³³, si bien en este estudio las infecciones transmitidas en pacientes circuncidados fueron en los primeros 6 meses tras la cirugía, hecho que pudiera estar relacionado con la no correcta cicatrización y la existencia de componente sanguíneo.

Los factores de riesgo, que pueden influir en la infección tras la exposición involuntaria a la sangre de un infectado, varían ampliamente dependiendo del tipo de exposición (*tabla 1*). Los factores que influyen en la adquisición de la infección van a ser: la carga viral del paciente infectado, el tipo de aguja, una lesión profunda, lesión con un dispositivo que estaba visiblemente contaminado con la sangre del individuo de origen, lesión con una aguja que había sido colocada en una vena o arteria, y enfermedad terminal en el individuo de origen³⁴.

La posibilidad de transmisión materno-fetal, sin tratamiento antirretroviral a la madre durante el embarazo, está en torno al 25%. Con el tratamiento antirretroviral a la madre, programación de cesárea cuando la carga viral de la madre es mayor de 1000 copias/ml en el parto y con la administración de zidovudina (ZDV) a la madre en el parto por vía intravenosa y al recién nacido en solución durante 6 semanas, la tasa de transmisión materno-fetal está por debajo del 1%. La lactancia materna debe evitarse en la medida de lo posible en los países en vías de desarrollo y está totalmente prohibida en los países desarrollados. Si no puede prescindirse de la lactancia materna, es necesario que la madre esté en tratamiento antirretroviral con asociación de tres fármacos totalmente eficaces.

Ruta de exposición		Riesgo (%)
Exposición a sangre	Trasmisión sanguínea	90%
	Uso de drogas inyectables compartiendo agujas	0,0066%
	Aguja percutánea	0,0022%
	Exposición de la membrana mucosa a la sangre (p. Ej., Salpicaduras en los ojos)	0,001%
Exposición sexual	Coito anal receptivo	0,013%
	Sexo anal insertivo	0,0011%
	Coito receptivo pene-vaginal	0,0008%
	Sexo penetrante pene-vaginal	0,0004%
	Receptivo o inserción sexual pene-oral	< 0,0004%
Otro	Morder, escupir, arrojar fluidos corporales (incluyendo semen y saliva), compartir juguetes sexuales.	Anecdótico

Tabla 1. Estimación de riesgo según la exposición. Modificado de Cohen, MS. HIV infection: Risk factors and prevention strategies En: Bartlett JG, ed. *UpToDate*. Waltham, Mass.: UpToDate, 2020. https://ws003.sspa.juntadeandalucia.es:2060/contents/hiv-infection-risk-factors-and-prevention-.strategies?search=risk%20factor%20vih&source=search_result&selectedTitle=1~150&usage_type=default&display_rank=1 Consultado el 14 Marzo de 2020.

4. PATOGENIA Y MANIFESTACIONES CLÍNICAS

La sucesiva replicación vírica y contagio de nuevos linfocitos CD4, implica un deterioro funcional y pérdida de los mismos, produciéndose, con el tiempo, una profunda inmunodepresión, que da nombre al síndrome que provoca.

La enfermedad puede dividirse en tres periodos:

- Primoinfección o síndrome retroviral agudo. En el momento de la infección inicial por VIH, los pacientes tienen un gran número de células T CD4+ sanas pero susceptibles y ninguna respuesta inmunitaria específica ante el VIH. Por lo tanto, la replicación viral es rápida; los niveles plasmáticos de ARN del VIH pueden subir a más de 10^7 copias/ml y los niveles de antígeno p24 pueden superar los 100 pg/ml³⁵.

Este periodo, a menudo asintomático, puede cursar con clínica de mononucleosis infecciosa (fiebre, linfadenopatía, dolor de garganta, erupción cutánea, mialgia/artralgia, diarrea y dolor de cabeza) que puede acompañarse además de muguet, exantema, meningoencefalitis o diarrea, etc. Esta clínica de primoinfección, puede aparecer en los primeros días o semanas tras la adquisición de la infección, coincidiendo con el momento en que la viremia es máxima. Existe evidencia de que la presencia de síntomas graves^{36,37}

o la enfermedad sintomática prolongada (>14 días)³⁸ durante la infección aguda predice una progresión clínica más rápida al síndrome de inmunodeficiencia adquirida SIDA

- Posteriormente se entra en la de latencia clínica o fase crónica. En esta, el paciente suele estar asintomático durante varios años, y se caracteriza por la estabilidad relativa de la viremia y el descenso progresivo de los CD4. Cada paciente alcanza un nivel de viremia entre los 6 meses y 1 año, que es predictivo de la velocidad de progresión (si el enfermo no recibe ningún tratamiento antirretroviral)³⁹. En esta etapa se pueden desarrollar una serie de entidades que no son definitorias de SIDA, clasificadas en la categoría B (*tabla 2*)

En ausencia de terapia antirretroviral (TAR), el tiempo promedio desde la adquisición del VIH hasta un recuento de células CD4 <200 células/ μ L es de aproximadamente 8 a 10 años. Posteriormente, la adquisición de la condición de SIDA, una vez que el recuento es inferior a 200 células/ μ L, se estima en 12-18 meses⁴⁰.

- Tras una media de 10 años, la inmunodeficiencia que tiene el paciente es de la suficiente envergadura como para desarrollar infecciones oportunistas y tumores, incluidas en la categoría C (*tabla 2*), y que, por lo tanto, definen a la enfermedad como SIDA (*tabla 3*); que sin tratamiento, llevará, irremediablemente, al fallecimiento del paciente.

Previamente al desarrollo de estas infecciones oportunistas, los pacientes pueden desarrollar síntomas constitucionales inespecíficos como fatiga, sudoración o pérdida de peso, acompañados de una linfadenopatía generalizada caracterizada por ser generalmente simétricos, modestamente agrandados, móviles, indoloros, elásticos y se encuentran en las cadenas cervical, submandibular, occipital y axilar⁴¹.

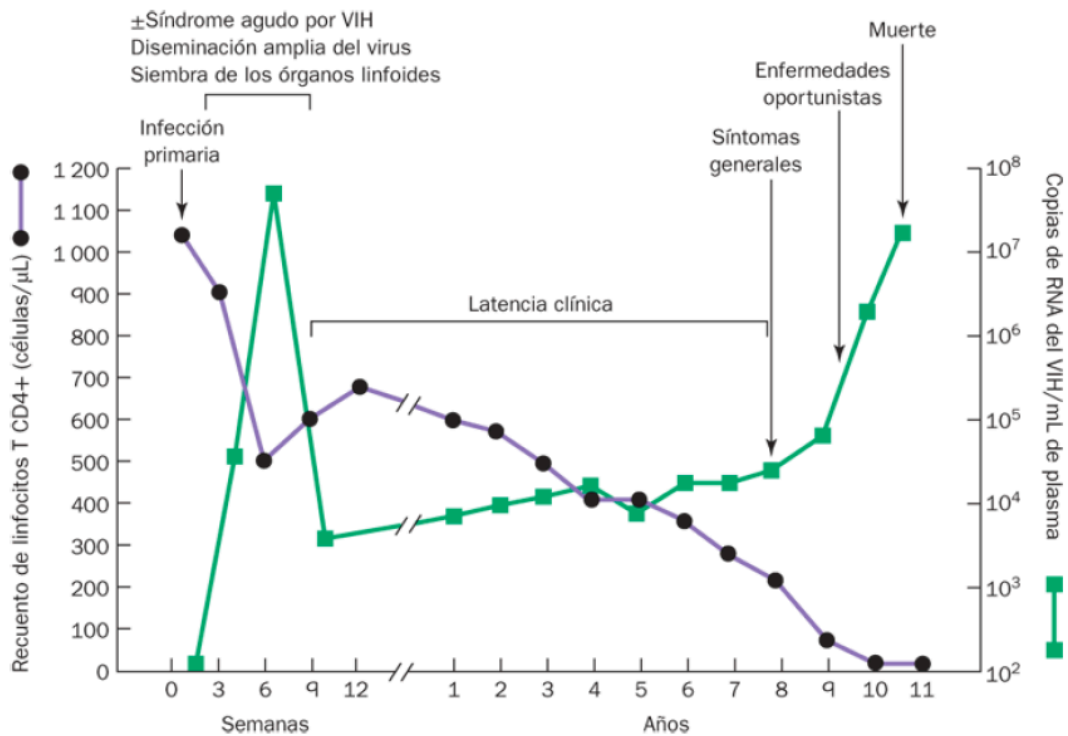


Figura 5. Evolución típica del paciente infectado por VIH sin TAR. Fuente: Fauci AS; Folker GKs; Lane HC. Enfermedad por el virus de la inmunodeficiencia humana: sida y trastornos relacionados. En: Larry Jameson J, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Losclazo J. Harrison. Principios de Medicina Interna, 20e. New York, NY: McGraw-Hill; 2018. Figura 197-17, Evolución típica de individuos infectados con VIH, sin tratamiento: p 1407

Atendiendo a las enfermedades oportunistas y al número de CD4 que presentan los pacientes, se incluyen a los pacientes en la clasificación en

estadios de la CDC (USA) o según el criterio seguido en Europa. Existiendo diferencias entre ambos. Todo paciente en categoría clínica C es considerado SIDA en ambos casos; añadiendo en USA también los pacientes <200 CD4/ μ L o $<14\%$ CD4+.

Categoría clínica A
<ul style="list-style-type: none"> • Enfermedad asintomática • Clínica de Primoinfección por VIH • Linfadenopatía Generalizada
Categoría clínica B
<ul style="list-style-type: none"> • Candidiasis oral • Candidiasis vulvovaginal recurrente/persistente o con mala respuesta • Leucoplasia oral vellosa • Herpes zoster 2 episodios o 1 episodio que afecte a 2 metámeras • Fiebre sin foco o diarrea de > 1 mes • Enfermedad pélvica inflamatoria (especialmente formas complicadas) • Púrpura trombopénica • Displasia cervical (moderada o grave) o carcinoma in situ • Neuropatía periférica • Listeriosis • Angiomatosis bacilar
Categoría clínica C
<ul style="list-style-type: none"> • Neumonía recurrente • Bacteriemia recurrente por <i>Salmonella</i> no thyphi • Tuberculosis pulmonar y extrapulmonar o diseminada • Infección diseminada por <i>M. avium</i>, <i>kansasii</i> u otras micobacterias extrapulmonares o diseminadas • Candidiasis esofágica, traqueal, bronquial o pulmonar • Coccidiomicosis pulmonar o linfática • Neumonía por <i>Pneumocystis jirovecii</i> • Criptococosis extrapulmonar • Criptosporidiasis con diarrea > 1 mes • Isosporiasis crónica

- Toxoplasmosis cerebral
- Citomegalovirus no hepático /ganglionar
- Sarcoma de Kaposi
- Linfoma no Hodgkin
- Carcinoma cervical invasiva
- Síndrome de caquexia
- Leucoencefalopatía multifocal progresiva
- Encefalopatía por VIH
- Herpes simple con lesión prolongada o extracutánea

Tabla 2. Categorías clínicas en pacientes VIH.

Estadios	A	B	C
1 (>500 CD4/ μ L)	A1	B1	C1
2 (200-500 CD4/ μ L)	A2	B2	C2
3 (<200 CD4/ μ L o <14% CD4*)	A3	B3	C3

Tabla 3. Estadios evolutivos y clasificatorios de SIDA. En gris, los casos considerados como SIDA en USA. *El porcentaje para catalogar el estadio sólo se utiliza en USA.

5. DIAGNÓSTICO

Ante un paciente en el que se sospecha una posible infección por VIH, es obligado el diagnóstico de la misma y el estudio de posibles contactos⁴². El diagnóstico de laboratorio de la infección por el VIH depende de la posibilidad de demostrar la presencia de anticuerpos, la detección del VIH o de sus componentes. Esta capacidad de detección y el uso de unas u otras técnicas va a depender, principalmente, del tiempo que haya pasado desde la fecha del posible contagio (*tabla 4*).

Test	Objeto de detección	Días aproximados hasta positividad
Inmunoanálisis enzimático		
1ª generación	Anticuerpos IgG	35-45
2ª generación	Anticuerpos IgG	25-35
3ª generación	Anticuerpos IgM e IgG	20-30
4ª generación	Anticuerpos IgM e IgG y antígeno p24	15-20
Western Blot		
	Anticuerpos IgM e IgG	35-50 (indeterminado) 45-50 (positivo)
Detección de carga viral		
Sensibilidad > 50 copias/ml	ARN	10-15
Ultrasensibilidad 1-5 copias/ml	ARN	5

Tabla 4. Detectabilidad de la infección VIH según técnica y tiempo. Fuente: Sax, PE. Acute and early HIV infection: Clinical manifestations and diagnosis . En: Bartlett JG, ed. *UpToDate*. Waltham, Mass.: UpToDate, 2020. https://ws003.sspa.juntadeandalucia.es:2060/contents/acute-and-early-hiv-infection-clinical-manifestations-and-diagnosis?search=VIH&source=search_result&selectedTitle=1~150&usage_type=default&display_rank=1. Tabla 2. Time to positivity of HIV diagnostic tests.

Hablamos de seroconversión para referirnos al tiempo en el que el desarrollo de anticuerpos contra el VIH es detectable en el laboratorio. Para cada anticuerpo existirá un tiempo a la seroconversión dado, en función de la técnica de detección utilizada, siendo menor a medida que las pruebas serológicas van adquiriendo mayor sensibilidad.

Actualmente, en España, para el diagnóstico en poblaciones cuya prevalencia es inferior al 10%, se recomienda el uso de tres técnicas con distinto principio o base antigénica, siendo obligado que una de ellas sea el Western Blot. Para diagnosticar a una persona como positiva las tres pruebas deben ser positivas⁴³. En la figura 6 se refleja el algoritmo diagnóstico de la infección VIH⁴³. Excepciones, contempladas en el algoritmo son, la primoinfección menor a las dos semanas, en las que el Western Blot no es sensible y por tanto se hará confirmación con la detección de carga viral; y aquellos en los que el Western Blot es indeterminado, donde necesitaremos nuevamente de la carga viral.

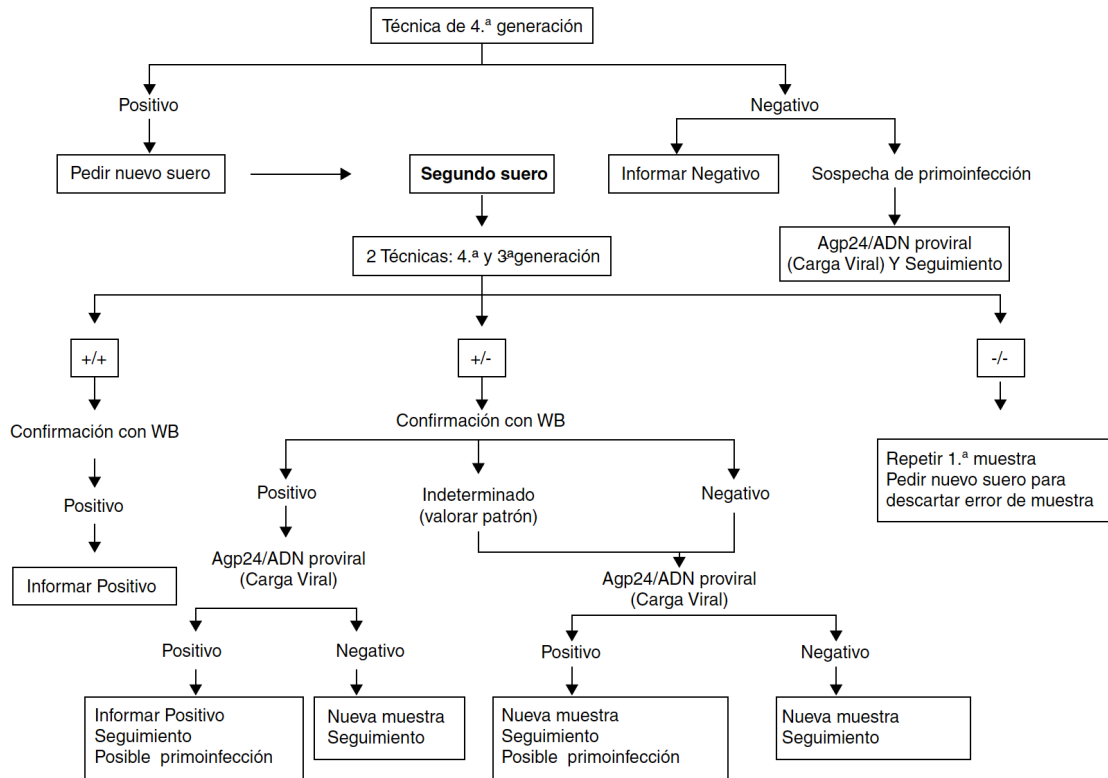


Figura 6, Algoritmo del diagnóstico de infección VIH. Fuente: García F, Álvarez M, Bernal C, Chueca N, Guillot V. Diagnóstico de laboratorio de la infección por el VIH, del tropismo viral y de las resistencias a los antirretrovirales. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2011;29(4):297–307. Figura 2, Algoritmo del diagnóstico de infección VIH; p. 301.

En todo paciente diagnosticado de VIH se deberá realizar una historia clínica completa, incluyendo en la anamnesis alergias medicamentosas, hábitos sexuales y consumo de tóxicos (incluidas las drogas asociadas a Chemsex), antecedentes de ITS, evaluación de vacunaciones, comorbilidades y evaluación del riesgo cardiovascular, medicación concomitante, consumo de productos de herboristería o terapias complementarias y uso previo de fármacos antirretrovirales; país donde ha vivido, viajes recientes, animales domésticos, soporte socio-familiar, nivel de estudios y evaluación de la necesidad de apoyo psicológico o psiquiátrico. En las mujeres, además, se deben investigar aspectos relacionados con el

deseo reproductivo, ciclo menstrual y la menopausia, uso de métodos anticonceptivos y resultados de controles ginecológicos previos. La evaluación clínica inicial es una ocasión muy importante para realizar estudio de contactos y establecer una relación médico-paciente efectiva y duradera y aconsejar hábitos saludables para evitar la transmisión del VIH⁴⁴.

5.1 Pruebas a realizar cuando se diagnóstica una infección por el VIH

A continuación, se enumeran las pruebas complementarias a realizar cuando se diagnóstica una infección por el VIH:

- Carga viral del VIH-1. A las 4 semanas del inicio o cambio del TAR y posteriormente cada 3-6 meses.
- Poblaciones linfocitarias: determinación de linfocitos T CD4+, linfocitos T CD8+ y cociente CD4+/CD8+; con el objetivo de conocer el estado inmunológico del paciente.
- Estudio genotípico de resistencia previo a la administración de TAR, aunque no es necesario esperar a conocer su resultado para iniciar el TAR, excepto si se va a iniciar éste con Inhibidor transcriptasa inversa no nucleósido (ITINN)⁴⁴.
- HLA B*570, necesario para conocer la posibilidad de uso de Abacavir (ABC)
- Tropicismo viral; necesario para el potencial uso de Maraviroc (MRV)

- Hemograma, Estudio básico de coagulación, Bioquímica sanguínea, perfil metabólico óseo (Ca, P y Vitamina D), análisis elemental de orina y sedimento y bioquímica en muestra aislada de orina: proteinuria y cociente proteína/creatinina
- Cálculo del riesgo cardiovascular (RCV)
- G6PD (si origen africano o asiático)
- Estudio de co-infecciones
 - Serología de VHA (IgG), VHB (HBsAg, anti-HBs, anti-HBc), VHC.
 - PPD o IGRA.
 - Cribado de ITS.
- Pruebas complementarias:
 - Radiografía de tórax
 - Electrocardiograma
 - Citología anal y/o cervical uterina
 - Según comorbilidades deberá realizarse: Ecografía hepática + Elastografía hepática, Esófago-gastroscopia, Densitometría, Cálculo de riesgo de fracturas por fragilidad ósea mediante FRAX.

5.2 Implicaciones de salud pública

El desconocimiento del paciente de que está infectado tiene graves consecuencias clínico-sociales. Al no ser conscientes de su afección, no pueden tomar precauciones y continúan participando en actividades sexuales de riesgo y compartiendo agujas, poniendo a otras personas en peligro; paralelamente, estos pacientes presentan una mayor carga viral, en sangre y secreciones genitales, en los primeros años de infección, lo que les hace altamente infectivos (con una carga viral sérica de ARN de 10^4 - 10^6 /ml en comparación con 30.000-50.000 copias/ml en la infección crónica sin tratamiento)^{45,46,47}; lo que conlleva una tasa de transmisión 9 a 15 veces mayor que el riesgo de transmisión durante la infección crónica⁴⁸. De igual manera, las mujeres embarazadas que no son conscientes de su infección y por tanto no reciben un diagnóstico y tratamiento adecuados, presentan un mayor riesgo de transmitir el VIH perinatalmente⁴⁹.

La importancia del diagnóstico precoz radica en la capacidad de parar la propagación de la infección, gracias al inicio precoz del TAR. Sin embargo, el diagnóstico de infección aguda o precoz por el VIH se realiza con poca frecuencia en la práctica clínica. Esto puede deberse a la nula o escasa sintomatología autolimitada que pueden presentar estos pacientes; al tabú que sigue suponiendo esta enfermedad y la incomodidad presente en muchos profesionales a la hora de interrogar sobre conductas sexuales y

consumo de drogas, así como la representación de este mismo tabú desde el paciente hacia el médico; todo ello junto a la falta de consciencia en la necesidad del diagnóstico precoz de estas enfermedades.

Es de vital importancia mantener un alto grado de sospecha al considerar la posibilidad de infección aguda por VIH en pacientes con enfermedades febriles mal definidas, independientemente de los factores de riesgo aparentes.

Se debe aconsejar a todos los pacientes con sospecha o confirmación de infección aguda o precoz por el VIH que adopten comportamientos que protejan contra la transmisión del VIH, incluido el uso constante y correcto del preservativo y evitar el uso compartido de material propio del uso de drogas inyectables, así como el inicio precoz del tratamiento antirretroviral.

6. TRATAMIENTO

6.1 Objetivo del tratamiento

Actualmente no existe un tratamiento curativo para la infección por VIH, dado que presenta una amplia variabilidad genética y se encuentra integrado en células de nuestro propio organismo en forma de ADN. El tratamiento o terapia anti-retroviral (TAR) del que disponemos pretende “la máxima y más duradera supresión de la carga viral, restablecer y preservar la función inmunológica, reducir la morbilidad asociada a la replicación del VIH y su efecto sobre otras comorbilidades, aumentar la supervivencia (figura 7) y prevenir la transmisión del VIH”^{44,50} de estos pacientes a otros seronegativos.

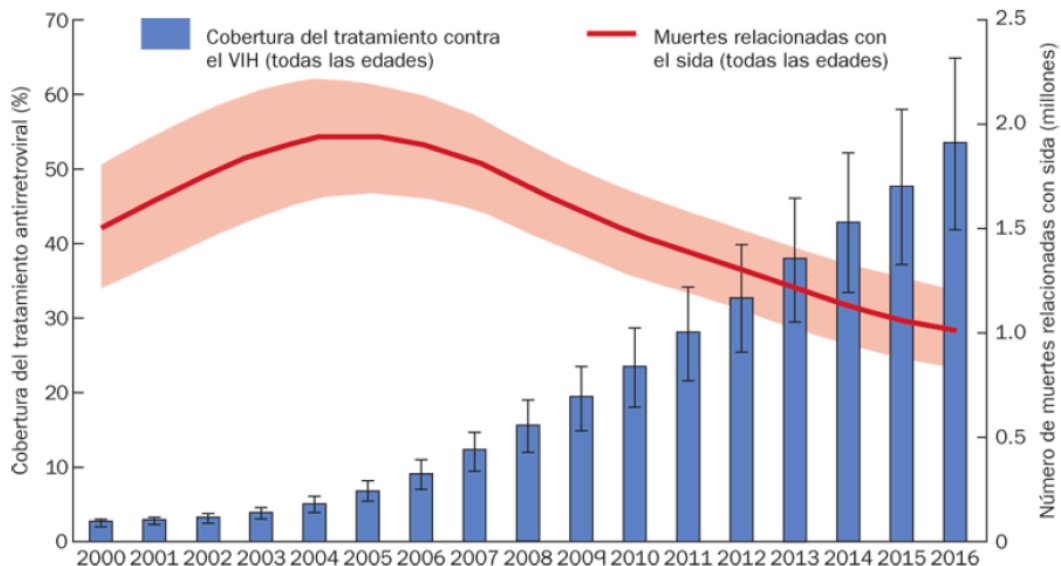


Figura 7. Incidencia del TAR en la mortalidad 2000-2016. Fuente: Fauci AS; Folker GK; Lane HC. Enfermedad por el virus de la inmunodeficiencia humana: sida y trastornos relacionados. En: Larry Jameson J, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Losclazo J. Harrison. Principios de Medicina Interna, 20e. New York, NY: McGraw-Hill; 2018. Figura 197-12, Cobertura global con tratamiento antirretroviral y número de muertes relacionadas con el sida, 2000-2016: p 1405

Atendiendo a los objetivos marcados previamente, tan pronto como sea posible, se debe iniciar el TAR en todos los pacientes con infección por VIH-1, con o sin sintomatología, y con independencia del número de linfocitos T CD4+, incluso en pacientes con cifras de CD4+ > 500/uL o infección reciente.

En la práctica clínica habitual, el inicio de tratamiento suele retrasarse hasta el conocimiento de las potenciales resistencias que pudiera presentar el enfermo. Sin embargo, cada vez es más frecuente la estrategia *test and treat*⁵¹ donde se plantea el inicio de TAR inmediato tras el diagnóstico, ya sea por una pobre situación clínica o por la ansiedad que este diagnóstico pudiera generar en nuestro paciente; en estas ocasiones, en las que no disponemos de toda la información necesaria para la selección de TAR, este tratamiento deberá cumplir⁴⁴: “buena tolerabilidad; no requerir estudio previo de HLA-B*5701; mínimo riesgo de interacciones farmacológicas; alta probabilidad de mantener actividad antiviral en presencia de carga viral plasmática (CVP) elevadas, cifras bajas de linfocitos T CD4+ o de virus con mutaciones de resistencia basales; y capacidad de suprimir VHB en caso de coinfección por este virus”.

Como se expresaba anteriormente, ciertos pacientes pudieran beneficiarse de una terapia precoz si su situación clínica es precaria, esta situación puede venir definida por presentar: “una carga viral >50.000

copias/mL, cociente CD4/CD8 <0,5, edad igual o mayor a 50 años⁵², pacientes con comorbilidades cuya progresión se ve facilitada por la propia infección por VIH-1 (como cirrosis hepática, hepatitis crónica por VHC, existencia de RCV elevado, los tumores no relacionados con el SIDA y los trastornos neurocognitivos), así como en mujeres embarazadas; en la coinfección por VHB o las parejas serodiscordantes que deseen disminuir al máximo el riesgo de transmisión del VIH (indetectable = intransmisible)⁴⁴”.

En aquellos pacientes, denominados controladores de élite, que mantienen carga viral indetectable de forma mantenida sin TAR, no existe información suficiente que permita valorar el efecto beneficioso del TAR.

6.2 Grupos farmacológicos

Existen 7 grupos de tratamiento antirretroviral con uso habitual frente al VIH, cada uno de ellos actúa frente un punto diferente del ciclo vital del VIH (*ver figura 8*).

1. *Inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos/tidos* (ITIAN). En España están comercializados seis ITIAN: Zidovudina (ZDV), didanosina (ddI), Estavudina (d4T), Lamivudina (3TC), Emtricitabina (FTC), Abacavir (ABC) y Tenofovir (TFV). Este último es un análogo de nucleótido, y puede coformularse como Tenofovir

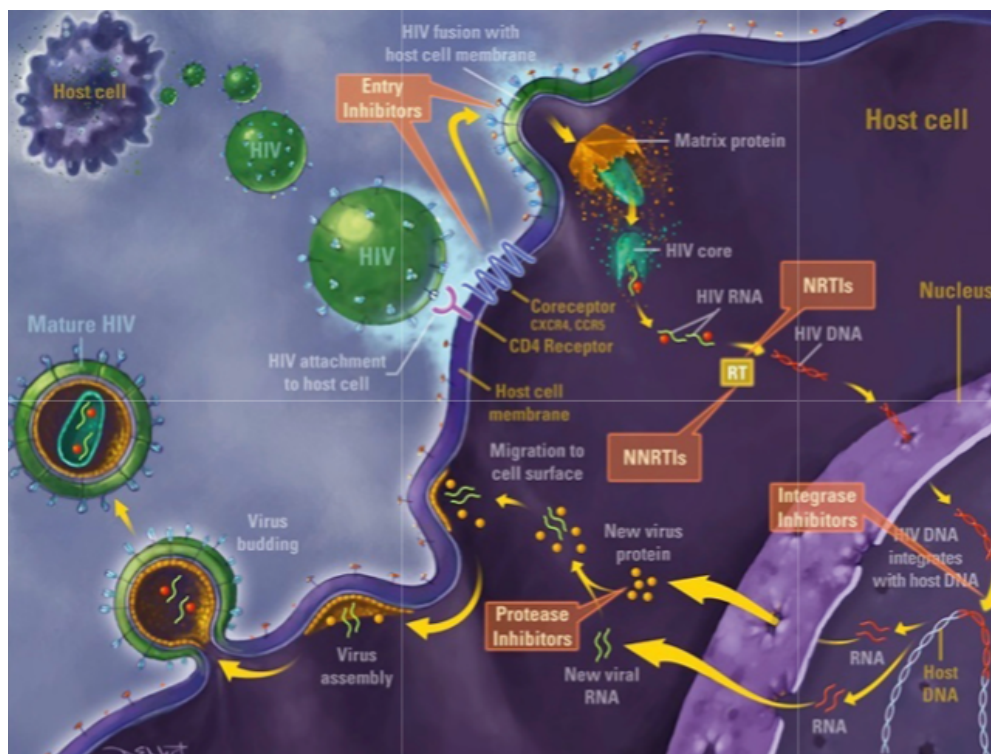


Figura 8: Locus de actuación de los diferentes fármacos antirretrovirales. Fuente: O'Halloran JA. Chapter 38 Comprehensive reviews of infectious diseases. En: Spec A, Escota G, Chrisler C, Davies B. Edimburg. Elsevier 2020. Antiretroviral therapy.. Pag 565

fumarato (TDF) y tenofovir alafenamida (TAF); la mayor diferencia entre ambos reside en que TAF requiere menores dosis, puede ser usado en insuficiencia renal, con filtrados $>30\text{ml/min}$, y por haber demostrado una menor toxicidad renal y menor reducción de la densidad mineral ósea que TDF^{53,54}.

Los ITIAN suponen la base del TAR, aportando, en la mayoría de las combinaciones, dos fármacos, que debieran administrarse en preparados coformulados, estas combinaciones son: FTC/TDF, FTC/TAF y ABC/3TC. NO existen estudios que demuestren una mayor eficacia de una de estas combinaciones frente a la otra, aunque

sí una mayor frecuencia de discontinuaciones debidas a efectos adversos con ABC⁵⁵.

2. *Inhibidores de la integrasa (INI)*. Existen cinco INI con aprobación para su uso como TAR de inicio: Raltegravir (RAL), Elvitegravir (EVG), Dolutegravir (DTG), Bictegravir (BIC*) y Cabotegravir. Estos pueden utilizarse en la mayoría de pacientes con una elevada eficacia y un riesgo bajo de toxicidad e interacciones en comparación con otras pautas. Además, se ha observado una mayor rapidez en la supresión virológica con las pautas que incluyen un INI en comparación con otras familias de FAR, por ello todas las pautas de inicio preferentes incluyen este tipo de fármacos (*tabla 5*). Existen varias coformulaciones junto a 2 ITIAN que permiten una mayor adherencia y comodidad (DTG+ABC+3TC / EVG-c+TNF+FTC / EVG-c+TAF+FTC / BIC+FTC+TAF).

Cabe destacar varias diferencias entre ellos: EVG es el único que debe ir potenciado con Cobicistat (c) (EVG-c). Siendo, así mismo, importante destacar que DTG presenta una barrera a las resistencias superior a la RAL y EVG, tanto en triple como en bi-terapia, como han demostrado diversos ensayos clínicos, donde no se ha observado

* Bictegravir ni cabotegravir no estaban comercializados en el momento que se realizó el estudio que presenta esta tesis doctoral.

una selección de mutaciones de resistencia con DTG en TAR de inicio⁴⁴. EVG no constituiría una terapia de inicio preferente pero sí alternativa (*tabla 6*).

Recientemente han sido publicados dos estudios^{56,57} con Cabotegrabir, un nuevo INI, de acción prolongada que se administra junto a Rilpivirina.

3. *Inhibidores de la transcriptasa inversa no nucleósidos (ITINN).*

Tenemos disponibles cuatro ITINN comercializados (Nevirapina (NVP), Efavirenz (EFV), Etravirina (ETR) y Rilpivirina (RPV)), y uno, doravirina[†] (DOR), aprobado pero pendiente de comercialización en España. NVP, EFV y ETR, son inductores de algunos isoenzimas del citocromo P450 y, por tanto, pueden interaccionar con otros fármacos metabolizados por esta vía. Existen coformulación con EFV + FTC+TDF / RPV + FTC/TDF o con FTC/TAF, DOR saldrá al mercado coformulado con 3TC+TDF. Actualmente no se considera preferente ninguna pauta basada en ITINN (*A-III*). RPV no debe utilizarse en pacientes con CVP >100.000 copias/mL (*A-I*)

4. *Inhibidores de la proteasa potenciados (IP).* En la actualidad existen seis IP/p (con Ritonavir (r) o cobicistat) disponibles para el uso en la

[†] Doravirina no estaba comercializado en el momento que se realizó el estudio que presenta esta tesis doctoral.

práctica clínica: Atazanavir (ATV), Darunavir (DRV), Lopinavir (LPV), Fosamprenavir (FPV), Saquinavir (SQV) y Tipranavir (TPV).

Los IP son inductores e inhibidores del citocromo P450 y frecuentemente pueden originar interacciones farmacológicas. Existen presentaciones coformuladas de DRV/c y ATV/c. Los IP se caracterizan por una elevada barrera genética que dificulta la selección de mutaciones de resistencia aun en situaciones desfavorables como la baja adherencia. Por otra parte, se asocian a hiperlipidemia, aunque en menor medida en el caso de ATV y DRV. DRV/c se encuentra coformulado en un comprimido único, así como con FTC/TAF (DRV/c/FTC/TAF).

5. Inhibidores de la entrada: Maraviroc (MVC) es el único antagonista del correceptor CCR5 del que disponemos. Se debe prescribir exclusivamente en los pacientes con infección por cepas del VIH-1 que sean R5-trópicas. El tropismo del VIH-1 se analiza habitualmente con métodos genotípicos, que determinan la secuencia de la región V3 de la envuelta viral (gp120)⁵⁸.
6. Inhibidores de la fusión: Sólo existe un fármaco comercializado, con escaso uso en la práctica clínica, Enfuvirtida (ENF).
7. Anticuerpos monoclonal frente al CD4. Su uso es intravenoso, en pacientes con multirresistencias, junto a otros antirretrovirales con actividad conservada.

6.3 Terapia inicial

La terapia antiretroviral inicial, hasta hace poco tiempo, consistía en la combinación de dos inhibidores de la transcriptasa inversa análogo de nucleósido/tido (ITIAN) asociados a un Inhibidor de la integrasa (INI), a un Inhibidor transcriptasa inversa no nucleósido o a un Inhibidor de la proteasa potenciado (IP/p). Existen estudios que demuestran la eficacia de una terapia dual con la combinación de un ITIAN (3TC) y un INI (DTG) o 3TC + LPV/r. El objetivo con cualquiera de estas opciones es conseguir una carga viral indetectables (<50 copias/mL) en más del 85% de los casos a las 48 semanas de tratamiento.

Estas pautas no son extrapolables en el caso de mujeres embarazadas o de pacientes con tuberculosis, en los que se deben utilizar la información existente en las guías específicas.

3er Fármaco	Pauta	Comentarios
INI	BIC/FTC/TAF	
	DTG/ABC/3TC	<ul style="list-style-type: none"> - ABC está contraindicado en pacientes con HLA-B*5701 positivo. - DTG no debe utilizarse en mujeres que deseen quedarse embarazadas o mujeres en edad fértil que no utilicen medidas anticonceptivas eficaces. - No utilizar en pacientes con hepatitis crónica por VHB.
	DTG+FTC/TAF	<ul style="list-style-type: none"> - DTG no debe utilizarse en mujeres que deseen quedarse embarazadas o mujeres en edad fértil que no utilicen medidas anticonceptivas eficaces
	RAL+FTC/TAF	<ul style="list-style-type: none"> - RAL puede administrarse indistintamente como 1 comprimido de 400 mg cada 12 horas, o 2 comprimidos de 600 mg cada 24 horas.
	DTG/3TC	<ul style="list-style-type: none"> - No recomendado en pacientes con cifra basal de CD4+ menor de 200/μL - DTG no debe utilizarse en mujeres que deseen quedarse embarazadas o mujeres en edad fértil que no utilicen medidas anticonceptivas eficaces - No utilizar en pacientes con hepatitis crónica por VHB
RPV/FTC/TAF	<ul style="list-style-type: none"> - No indicado en pacientes con CVP >100.000 copias/mL. - Realizar previamente un estudio genotípico que descarte mutaciones de resistencia a ITINN. - Contraindicado si se utilizan inhibidores de la bomba de protones. - Se debe tomar siempre con una comida. 	

Tabla 5. Combinaciones alternativas de TAR de inicio recomendadas. En el caso de mujeres embarazadas o de pacientes con tuberculosis estas recomendaciones no son válidas y se debe utilizar la información existente en guías específicas. Modificado de: Grupo de Estudio de Sida de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas. Documento de consenso de Gesida/plan nacional sobre el Sida respecto al tratamiento Antirretroviral en adultos Infeccionados por el virus de la Inmunodeficiencia humana (actualización enero 2020) <http://gesida-seimc.org/category/guias-clinicas/> (Consultado el 14/03/2018). Tabla 3. Combinaciones de TAR de inicio recomendadas; pág 104.

3er Fármaco	Pauta	Comentarios
INI	EVG/c/FTC/TAF	- Es imprescindible evaluar posibles interacciones.
IP potenciado	DRV/c/FTC/TAF o DRV/r+FTC/TAF	- Es imprescindible evaluar posibles interacciones.
ITINN	DOR+FTC/TAF	- Existe la combinación de DOR/3TC/TDF en comprimido único, que puede utilizarse siempre que se excluya la presencia de alteración renal o de osteopenia/osteoporosis, y no existan factores de riesgo para desarrollarlas.

Tabla 6. Combinaciones alternativas de TAR de inicio recomendadas. En el caso de mujeres embarazadas o de pacientes con tuberculosis estas recomendaciones no son válidas y se debe utilizar la información existente en guías específicas. Modificado de: Grupo de Estudio de Sida de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas. Documento de consenso de Gesida/plan nacional sobre el Sida respecto al tratamiento Antirretroviral en adultos Infeccionados por el virus de la Inmunodeficiencia humana (actualización enero 2020) <http://gesida-seimc.org/category/guias-clinicas/> (Consultado el 14/03/2020). Tabla 3. Combinaciones de TAR de inicio recomendadas; pág 104.

6.4 Efectos secundarios del tratamiento antirretroviral

El perfil de efectos adversos de los diferentes tratamientos antirretrovirales han ido mejorando progresivamente con la aparición de nuevos productos; sin embargo estos no son infrecuentes y pueden condicionar un déficit en la adherencia⁵⁹.

Según el momento de aparición de estos efectos adversos, podemos hablar de efectos secundarios inmediatos (muy reconocidos y definidos) o tardíos (difíciles de prever y mal definidos).

Entre los efectos inmediatos de los tratamientos actualmente recomendados: los IP/p pueden producir efectos digestivos; los ITINN de primera generación (particularmente NVP) hepáticos y reacción de

hipersensibilidad (RHS); ABC puede producir RHS en pacientes con HLA-B*5701 positivo⁴; DRV exantema; y EFV, RPV, DOR y los cuatro INI actualmente disponibles (BIC, DTG, EVG y RAL) pueden producir efectos neuropsicológicos. La experiencia post-comercialización sugiere que el insomnio o la discontinuación por efectos neuropsicológicos son inusuales con los INI disponibles, si bien son más frecuentes con DTG que con BIC, RAL o EVG. Ya que los efectos secundarios neuropsicológicos son subjetivos y los síntomas son tan variados y prevalentes, es preciso mejorar la recogida de información en las bases de datos clínicas para conocer mejor la incidencia, el espectro clínico, el curso evolutivo, los factores de riesgo, y los posibles mecanismos.

Los efectos secundarios tardíos más frecuentes se describen en el anexo I.

6.5 Interacciones

Gracias al TAR, muchos pacientes tienen cada vez una edad mayor, lo que implica que necesiten tomar medicación para hacer frente a diversas patologías. Estas medicaciones pueden interactuar con los fármacos antirretrovirales; por ello es necesario que todo sanitario evalúe las posibles

interacciones. Para ello existen diversas fuentes de fácil acceso a través de internet, como pudiera ser www.hiv-druginteractions.org.

6.6 Síndrome de reconstitución inmune

En pacientes con un recuento bajo de CD4, existe la posibilidad de que el inicio del TAR, en sus primeros meses, conlleve un empeoramiento clínico de una infección conocida o preexistente no reconocida en pacientes infectados por VIH. Este empeoramiento clínico se debe a la mejora rápida de la función inmune, con la consiguiente liberación de citoquinas proinflamatorias, secundaria a la respuesta inflamatoria del organismo frente al patógeno causante de la infección. Suele tener un trascurso autolimitado, si bien es verdad, puede conllevar secuelas a largo plazo e inclusive el fallecimiento del paciente, por lo que a veces se requiere tratamiento con AINES o corticoides.

No existen unos criterios firmes para el diagnóstico de este síndrome, sin embargo, la gran mayoría de los pacientes afectados deben tener:

- Un recuento de CD4 pretratamiento menor de 100 células/microL⁶⁰, siendo la tuberculosis una importante excepción, ya que este síndrome secundario a la TBC, pudiera darse en pacientes con CD4 >200 células/microL.

- Una respuesta virológica e inmunológica positiva tras el inicio del TAR⁶¹, así como una correlación temporal entre el inicio de la terapia y la aparición de síntomas.
- Una correcta adherencia, la ausencia de alergia a los compuestos del TAR o la resistencia a los mismos del VIH.
- Ausencia de una sobreinfección bacteriana.
- La presencia de manifestaciones clínicas concordantes con este síndrome.

Aunque el diagnóstico diferencial de este síndrome es amplio e incluye la progresión de la enfermedad, el control microbiológico de la carga viral del VIH puede ser de ayuda. Un descenso de la carga viral nos confirma la evolución favorable de la enfermedad y nos apoya el diagnóstico de este síndrome.

Entre los patógenos más frecuentes asociados al síndrome de reconstitución inmune se encuentran: *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium*, Citomegalovirus, *Cryptococcus neoformans*, *Pneumocystis jirovecii*, Virus del herpes simple, Virus de la hepatitis B o C, Virus del herpes humano 8 (asociado con sarcoma de Kaposi), parvovirus B19, *Candida albicans*, Virus Epstein Barr, herpes simple, *Bartonella henselae*, *Histoplasma capsulatum*, dermatofitosis, lepra, bacilo de

Calmette-Guérin (BCG), *Talaromyces marneffe*, *Schistosoma mansoni*, y el virus del molusco contagioso⁶².

El principal tratamiento para el síndrome de reconstitución inmune lo constituye el tratamiento de la infección oportunista subyacente. Así mismo, los AINES o glucocorticoides pueden constituir un tratamiento para disminuir la inflamación.

7. PROFILAXIS DE LA INFECCIÓN VIH

Existen estudios que demuestran que el tratamiento con TAR de pacientes con una reciente exposición a una fuente VIH positiva, puede disminuir las probabilidades de que el paciente expuesto finalmente adquiera el VIH. Existen diferentes escenarios en los que pudiera ser de utilidad esta profilaxis:

a. Profilaxis post-exposición tras accidente ocupacional.

Tras una exposición a sangre u otros fluidos corporales³, la acción inicial a realizar es la limpieza inmediata del sitio expuesto con agua y jabón; en caso de lesiones cutáneas se pueden usar agentes viricidas como el alcohol o la clorhexidina. En el caso de exposición en mucosas u ojos, se debe irrigar abundantemente con agua o suero salino.

Tras la correcta limpieza de la zona, el segundo paso a realizar es la confirmación, de manera urgente, de que la fuente es positiva a VIH (así como VHB y VHC) y, de ser así, documentar el tratamiento,

³ Nota: No se incluyen entre los fluidos corporales infectivos: heces, secreciones nasales, saliva, secreciones gástricas, esputo, sudor, lágrimas, orina y/o vómitos; a menos que contengan sangre. Así mismo, la piel intacta constituye una barrera eficaz contra el VIH, por lo que la contaminación de piel intacta no se considera exposición.

historial de resistencias a medicamentos de la fuente y la carga viral que posee.

b. Profilaxis post-exposición no accidental.

Algunas personas tienen contactos sexuales no protegidos o se exponen a sangre por uso de drogas recreativas.

c. Profilaxis pre-exposición.

Algunos pacientes tienen una exposición continuada a parejas potencialmente de riesgo alto. En estos casos, la profilaxis previa a la exposición, seguida de dosis a las 24 y a las 48h de la exposición, es una estrategia eficaz para reducir el riesgo de contagio⁶³.

En todos los casos, cuando la fuente sea VIH conocido o la confirmación de la misma vaya a retrasarse o no sea posibles, se debería iniciar tratamiento profiláctico post-exposición (TPEP), en las primeras dos horas post-exposición, viéndose una disminución de la eficacia con el paso de las horas, no recomendándose iniciar TPEP tras las 72h de la exposición⁶⁴. Debiendo suspender la misma si se demuestra que el paciente es VIH negativo⁶⁵.

La profilaxis incluye un régimen de tres fármacos durante 28 días; habitualmente TAF/FTC junto a un INI; siendo actualmente de preferencia aquellos DTG, BIC, debiendo evitar el primero de ellos en mujeres

embarazadas o con posibilidad de estarlo. También puede darse la asociación TAF/FTC/DRVc.

Independientemente de que inicie TPEP o no, se debe hacer seguimiento cercano de la persona expuesta, con una primera valoración a las 72h y una segunda a las 2 semanas de la exposición.

8. PROFILAXIS EN EL PACIENTE VIH POSITIVO

El paciente VIH positivo es, en general, un paciente inmunocomprometido. Como hemos desglosado con anterioridad, según el número de CD4+, podremos observar infecciones de ciertos microorganismos oportunistas que, antes del TAR, eran la principal causa de morbimortalidad en estos pacientes.

La mejor forma de evitar infecciones oportunistas es instaurar tratamiento antirretroviral y restaurar, en la medida de lo posible, la inmunidad celular. Adicionalmente existen otras vías de acción para evitar estas infecciones oportunistas:

- En aquellos pacientes que no han sufrido enfermedades oportunistas, el tratamiento antibiótico profiláctico debe prescribirse acorde a la infección que queremos prevenir. En pacientes con Mantoux/IGRA positivo⁶⁶ con Isoniacida durante 6-9 meses⁶⁷. Paralelamente, en aquellos pacientes con <200 CD4+/uL, el tratamiento antibiótico ha demostrado reducir estas infecciones oportunistas (como la neumonía *P. jirovecii*, toxoplasmosis o tuberculosis), presentando nueve veces menor riesgo que sin la misma. Sin embargo, esta profilaxis puede fallar en caso de falta de adherencia y/o inmunosupresión profunda (< 50 CD4+/uL)^{68,69,70}.

Esta profilaxis primaria se realiza con trimetoprim-sulfamethoxazol, pudiendo suspenderse cuando se produce una reconstitución del sistema inmune y se alcanza un recuento de CD4 a >200 células/microL durante más de 3 meses o un recuento de CD4 entre 100-200 células/microL si están recibiendo TAR y han tenido una carga viral indetectable durante aproximadamente seis meses⁷¹.

- En aquellos pacientes en los que se quiera prevenir la recurrencia de una infección oportunista podemos usar los antibióticos recogidos en la siguiente tabla:

Microorganismo	Antimicrobiano
P.jirovecii	Cotrimoxazol
MAI	Azitromicina
Toxoplasma	Pirimetamina-sulfadiacina
CMV	Ganciclovir/Valganciclovir
Criptococco	Fluconazol
Leishmaniasis	Anfotericina-liposomal

Tabla 8. Tratamiento específico de la profilaxis secundaria en el paciente VIH. Modificado de: López Ruz, MA. Capítulo 21: Síndrome de la inmunodeficiencia adquirida. Otros retrovirus. En: López-Ruz, MA. Manual de enfermedades infecciosas. Grado de Medicina. 1ª Edición. Granada: Tecnica Avicam; 2017. 15-26.

- La inmunización mediante vacunas (por ejemplo, la vacuna del neumococo, del VHB, VHC o la gripe).
- Evitar la exposición a ciertos patógenos, como pudiera ser el caso del Toxoplasma evitando el contacto con heces de gato o la ingesta de carne poco cocinada.

9. SEGUIMIENTO DEL PACIENTE CON VIH

Todo paciente con VIH positivo, esté en tratamiento TAR o no, necesita un seguimiento continuo, tanto de su situación clínica y psicológica como su evolución analítica, teniendo especial importancia la respuesta terapéutica e identificar eventos adversos relacionados con la administración crónica de estos fármacos.

Los pacientes que inician TAR deben ser valorados frecuentemente para conocer la tolerabilidad del mismo, adherencia, ofrecerles información y prevenirles sobre la transmisión; con una primera analítica a las dos semanas después del inicio del TAR y luego a intervalos de cuatro a ocho semanas hasta que el nivel caiga por debajo del límite de detección. Alcanzada la estabilidad, estos pacientes pueden disminuir el régimen de visitas a 3-6 meses. En estas visitas, los pacientes deben ser preguntados respecto a la adherencia a los medicamentos⁴⁴, teniendo en cuenta que la adherencia es variable en el tiempo y puede verse afectada por factores cambiantes (como la depresión y el consumo de sustancias)⁷². Las pruebas complementarias que deben evaluarse y su frecuencia quedan reflejadas en la Tabla 8.

En cada visita es de vital importancia la vigilancia de la carga viral, cuyo objetivo es mantenerla por debajo de los límites de detección; si bien es verdad, consideramos fallo virológico en aquellos pacientes que no se logra mantener < 50 copias/ml tras 24 semanas de tratamiento o si presenta

de forma sostenida (dos mediciones consecutivas) en el tiempo >200 copias/ml⁷³. Debemos diferenciar esto último de los blips virales, definidos como la detección de ARN del VIH puntual en alguna determinación que no es mantenida en el tiempo, en los que no hay que modificar TAR, hay que insistir en la adherencia y vigilar al paciente en el tiempo.

En referencia a la vigilancia de CD4+, en pacientes que logran y mantienen la supresión viral, la mejora inmunológica es progresiva durante muchos años⁷⁴. La supresión viral suele ir acompañada de un aumento en el recuento de CD4 de 50 células/microL a las cuatro a ocho semanas, seguido de aumentos incrementales más lentos de 50 a 100 células/microL por año⁷⁵. La tasa de aumento de las células CD4 puede ser más lenta en pacientes de edad avanzada o en aquellos con inmunocompromiso grave al inicio⁷⁶, pudiendo no llegar a recuperar en algunos pacientes.

Determinación de laboratorio	Primera Consulta	Antes del inicio TAR	2-8 semanas post inicio TAR	Cada 3-6 meses	Cada 12 meses	Si ha fallado TAR
Serología VIH	√					
Recuento CD4+	√	√		√ (primeros 2 años)	√ (tras los primeros 2 años con CV suprimida)	
Carga Viral VIH	√	√	√	√		
Test de resistencias	√	√				
HLA-B*5701	√					
G6PD	√					
Tropismo	√					
Hemograma	√	√		√		
Bioquímica básica (incluido perfil hepático)	√	√	√	√		
Perfil lipídico	√	√			√	
Análisis Urinario	√	√		√ (si tratamiento con TDF)	√	
Test de embarazo		√				
TBC	√					
VHA, VHB, VHC	√				√	
VHD, VHE						
Sífilis	√				√	
Cribado ITS	√				√	

Determinación de laboratorio	Primera Consulta	Antes del inicio TAR	2-8 semanas post inicio TAR	Cada 3-6 meses	Cada 12 meses	Si ha fallado TAR
Serología de VVZ, Sarampión, Rubeola, Toxoplasma	√					
IMC	√				√	
Evaluación riesgo cardio-vascular	√				√ (Cada 2 años)	
ECG						
Evaluación riesgo pulmonar	√				√	
Espirometría						
Ecografía y Elastometría hepática					√ (Pacientes con patología hepática)	
Evaluación riesgo óseo					√ (Cada 2 años)	
Cribado de depresión o deterioro cognitivo						
Citología anal					√ (En HSH)	

Tabla 8. Evaluación en la visita inicial y sucesivas de las personas infectadas por el VIH. Modificado de C...
 Noviembre 2019. Consultado el 12-3-20

**SITUACIÓN ACTUAL
DEL PROBLEMA
EN ESTUDIO**

La infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) es una de las epidemias que afectan a la población mundial. La vía sexual, seguida de la vía parenteral son las principales vías de transmisión del VIH; siendo el semen el vector responsable de la mayoría de las transmisiones sexuales a nivel mundial. Actualmente, la cuantificación de la carga viral en la sangre se utiliza, en la práctica clínica, para evaluar la eficacia de la terapia y el control de la enfermedad. Sin embargo, se sabe que la cinética de la replicación viral del VIH en el compartimento sanguíneo difiere de su cinética en el compartimento seminal. Varios autores han informado de la presencia de ADN viral en el líquido seminal con carga viral no detectable en la sangre^{77,78,79,80}. El ADN del VIH se puede encontrar no integrado en los leucocitos seminales, con forma lineal o circular o como provirus integrado⁸¹. Sin embargo, el VIH libre en el plasma seminal parece ser el que resulta ser verdaderamente infeccioso⁷⁷, y dicha infectividad depende de la carga viral. La presencia del virus en este compartimento puede ser intermitente⁸², independientemente del lapso de tiempo de un resultado negativo en la muestra de sangre⁸³. De forma similar, se ha encontrado ARN del VIH positivo en líquido seminal a pesar de existir un resultado negativo para el ARN del VIH en la sangre^{84,85,86}.

Se ha descrito que existen variantes diferentes en plasma seminal y plasma sanguíneo estudiado mediante secuenciación de genes de la proteasa

y la envoltura en el DNA proviral⁷⁷, así como diferencias entre los fluidos vaginales y el plasma sanguíneo de mujeres en Uganda y Zimbabwe⁸⁷.

La presencia del VIH en el plasma seminal parece depender de varios factores que pueden influir en su presencia en este compartimento, incluso cuando es indetectable en la sangre. Ejemplo de ello es que la cantidad de líquido seminal varía con la raza⁸⁸ o que la presencia de una enfermedad de transmisión sexual sintomática (la uretritis aguda⁸⁹, la infección por citomegalovirus⁹⁰ o el virus del herpes simple tipo 2⁹¹) aumentan el riesgo de transmisión del HIV^{92,93}. Del mismo modo, la seropositividad al virus del herpes simple tipo 2, el aumento de las citoquinas en el plasma seminal, el aumento de la activación de las células T mucosas y el número de cuasiespecies víricas⁷⁷ parecen influir en la presencia del virus en el plasma seminal. Paralelamente se ha publicado que la resolución de las uretritis resuelve la presencia de la carga viral en semen en pacientes con viremia indetectable⁹⁴.

El tiempo hasta la supresión virológica varía en función del régimen del TAR y el compartimento estudiado; siendo Inhibidores de la integrasa (INIs) y regímenes basados en la rilpivirina los mejores en plasma seminal^{95,96} seguido de inhibidores de la proteasa (IP).

A pesar de lo descrito anteriormente, lo que ocurre en el compartimento seminal no se entiende bien hasta la fecha. Por lo tanto, en

el presente estudio investigamos la cinética viral y las cuasispecies en pacientes infectados por el VIH que inician la terapia antirretroviral (TAR).

HIPÓTESIS

Este trabajo se realiza bajo las siguientes hipótesis:

- 1) Existe una mayor variabilidad genética, en forma de cuasiespecies, en plasma seminal que en plasma sanguíneo.

- 2) Los Inhibidores de la integrasa reducirían más eficazmente la carga viral y las cuasiespecies comparados con otros antirretrovirales

OBJETIVOS

En este trabajo se han planteado los siguientes objetivos:

- 1) Estudiar las cuasiespecies en plasma seminal y sangre antes de iniciar el tratamiento antirretroviral y tras un mes de tratamiento.
- 2) Estudiar el comportamiento del número de cuasiespecies al mes de tratamiento con las diferentes familias de antirretrovirales en el plasma seminal y en la sangre.

MATERIAL Y MÉTODOS

Criterios de inclusión y declaración de ética

Los criterios de inclusión de nuestro estudio fueron: sexo masculino, infectados por el VIH, pacientes naive al tratamiento antirretroviral y mayores de 18 años. Antes de empezar el estudio, se obtuvo la aprobación del Comité de ética del Hospital Universitario San Cecilio en Granada (España) (1184-N-16). . Todos los pacientes a los que se les propuso participar en el estudio aceptaron, y previa a su inclusión en el mismo, firmaron un consentimiento informado por escrito. Criterios de exclusión: presencia de otras enfermedades de transmisión sexual en el momento de este estudio.

Métodos

Se obtuvieron muestras de sangre y plasma seminal antes del inicio del TAR (T0) y un mes (T1) después del inicio del TAR. En el momento del diagnóstico, se registraron: la edad, el sexo, las infecciones concomitantes de transmisión sexual, la carga viral del VIH (copias de ARN/ml), las resistencias basales y el recuento de células CD4 (células/ μ L), a través de la historia clínica y analíticas. El régimen de tratamiento se registró al inicio del estudio (T0). La carga viral del VIH, el recuento de CD4 y la diversidad del VIH se registraron en T0 y en T1.

Las muestras de sangre y el plasma seminal se obtuvieron por venopunción y masturbación respectivamente, y se almacenaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su envío al laboratorio. Para la determinación de la carga viral de VIH, tanto en sangre como en plasma seminal, se utilizó la tecnología Cobas® 6800/8800 (Roche Diagnostics) con un límite de detección de 20 copias/ml. La diversidad de VIH se estudió en todas las muestras utilizando un protocolo de secuenciación masiva “in house”, utilizando los protocolos de Nextera y V3 en una plataforma MiSeq Illumina, amplificando un fragmento de 500 pares de bases de la región env C2V3C3 de VIH-1⁹⁷. Seleccionamos la región env por ser la región de VIH con mayor variabilidad^{98,99,100,101}. Para ello, el ARN del VIH se extrajo de muestras de plasma sanguíneo y seminal utilizando el Sistema “Magna Pure Compact” (Roche) siguiendo las instrucciones del fabricante. Este sistema se basa en una tecnología de partículas magnéticas. El plasma seminal se obtuvo a partir de muestras de semen por centrifugación a 2500 rpm durante 10 min. Después de la extracción, el ARN fue purificado usando el kit Ampure Agencourt RNAClean XP (Beckman Coulter) antes de la síntesis del ADNc. La cuantificación del ácido nucleico se realizó con un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, DE, USA). El rendimiento del ácido nucleico se determinó midiendo las relaciones de absorbancia espectrofotométricamente.

El kit RT-PCR (Roche) de un solo paso de Transcriptor se utilizó para la síntesis de ADNc. Todas las PCRs se realizaron en volúmenes de reacción de 25 μ L que contenían una mezcla pre-preparada de Hotstart HIFI KAPA de 12,5 μ l 2X KAPA (KAPA Biosystems, Woburn, MA, EE. UU.), 5 μ L de cada primer y 2,5 μ l de RNA extraído (10 ng). Las condiciones de PCR fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 95°C durante 3 min, seguido de 8 ciclos de desnaturalización a 95°C/30s, 55°C/30s, y 72°C/30s, con una extensión final a 72°C durante 5 min. Para la purificación de los productos de PCR se utilizó AMPure XP (Beckman Coulter, Indianápolis, IN, EE.UU.). Finalmente se llevó a cabo la secuenciación en Illumina utilizando el Nextera XT Index Kit (Illumina, San Diego, CA, USA). Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: 95 °C durante 3 min; 8 ciclos de 95°C/30 s, 55°C/30s, 72°C para 30 s; 72 °C durante 5 min, y mantener a 4 °C. Los productos de PCR se volvieron a purificar en AMPure XP (Beckman Coulter, Indianapolis, IN, USA) antes de la cuantificación. Los amplicones resultantes se secuenciaron en La plataforma MiSeq (Illumina, San Diego, CA, EE. UU.). Todos los experimentos se ejecutaron en una concentración equimolar de amplicones.

Los archivos FASTA obtenidos fueron demultiplexados para obtener un archivo FASTA para cada muestra y para la hebra. La herramienta Ugene¹⁰² se utilizó para la evaluación de la calidad de las lecturas en bruto,

que se ensamblaron, alinearon y examinaron en función de la longitud mínima de 200 bp y una longitud máxima de 500 bp. Las secuencias se filtraron y se eliminaron las quimeras utilizando Usearch¹⁰³, aceptando únicamente aquellas con $Q > 30$ y un grupo de semillas de 30. Finalmente, el número de cuasiespecies en cada muestra fue investigado usando BLAST. Sólo se registraron las cuasiespecies que representaban más del 5% de la población; este límite se utilizó para sesgar cualquier error de método, ya que este es el límite estándar para el análisis de resistencia¹⁰⁴.

La diversidad de la cuasiespecies del VIH se¹⁰⁵ calculó utilizando el índice Shannon como se informó anteriormente utilizando la herramienta de entropía del VIH de Los Alamos (https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/ENTROPY/entropy_one.html). Esta puntuación numérica es un número representativo y la frecuencia relativa de las cuasiespecies del VIH que se encuentra en cada muestra.

Pudimos investigar el tropismo viral del VIH utilizando¹⁰⁶ la herramienta geno2pheno del VIH porque nuestro fragmento de *env* abarcaba el bucle V3. El número y la ubicación de los posibles sitios de glicosilación N vinculados (PNGS) para cada secuencia se estimaron utilizando la herramienta web N-GLYCOSITE de la base de datos de VIH de Los Alamos (<http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/GLYCOSITE/glycosite.html>).

Análisis estadístico

La normalidad de las variables se ha analizado utilizando la prueba Shapiro-Wilks para el análisis estadístico. Las características basales se expresan como proporciones para variables categóricas y como medianas e intervalos intercuartílicos (IQR) para variables continuas. El test no paramétrico U de Mann-Whitney se ha utilizado para comparar las diferencias en el número de cuasiespecies entre la sangre y el plasma seminal. El test de Wilcoxon se utilizó para las diferencias en el número de cuasiespecies antes y después del tratamiento. Se aplicó el test Wilcoxon, corrigiendo el valor p obtenido por el número de comparaciones, para analizar si la disminución del número de cuasiespecies fue significativa en función del tipo de régimen. La prueba chi-cuadrada de Pearson se utilizó para variables cualitativas. Para correlacionar el número de cuasiespecies con la carga sanguínea viral inicial (T0) y el recuento de células T nadir CD4, se utilizó el coeficiente de correlación del Spearman. Se consideró una $p < 0.05$ significativa. Los datos se han analizado utilizando el software IBM SPSS Statistics 19.

RESULTADOS

Se reclutaron cuarenta y siete pacientes infectados por el VIH naive al TAR de los diferentes lugares participantes (Hospital Universitario Virgen del Rocío, Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Hospital Universitario San Cecilio y Hospital Universitario de Jaén) para el estudio entre septiembre de 2016 y noviembre de 2018. Los pacientes tenían una mediana de edad de 30 años, una carga viral media de 29.2513 copias (log 4.56) y un recuento medio de CD4 de 494 células/ μ L. En la fase de reclutamiento (T0), 4 pacientes (8,51%) tenían signos clínicos de infección aguda por VIH, 6 (12,8%) pacientes iniciaron un régimen basado en los inhibidores de la transcriptasa inversa no nucleósidos (NNRTI), 10 (21,3%) pacientes iniciaron un régimen basado en IP, y 31 (65,6%) pacientes iniciaron un régimen basado en INI. La Tabla 9 muestra las características basales de los pacientes.

Al inicio, pudimos secuenciar 47 muestras de sangre y plasma seminal. El número medio de secuencias estudiadas en sangre fue de 68.458 (rango 58.307-79.352). El número medio de secuencias estudiadas en plasma seminal fue de 65.435 (rango 54.675-73.669). Usando el límite del 5% pre-configurado, el número de cuasiespecies en la sangre fue menor que en el compartimento seminal ($p < 0.01$).

	N = 47
Edad ^a (años)	30 [26-41]
Infección aguda por VIH, n (%)	4 (8.51%)
Carga viral (Log copies/mL) ^a	4.48 [3.98-5.06]
Recuento de CD4 (células/L) ^a	494.5 [301.75-641.5]
Tratamiento del VIH, n (%)	
Basado en NNRTI	6 (12.8%)
Basado en PI	10 (21.3%)
Basado en INI	31 (65.6%)
Infecciones anteriores	
Chlamydia	4 (8.7%)
Sífilis	9 (19.1%)
Gonorrea	0 (0%)
VHC	2 (4.3%)
VPH	10 (21.3%)

Tabla 9. Características basales de los pacientes. ^amediana [rango intercuartil (IQR), percentil 25-75]; VHC: Virus de la hepatitis C; VPH: Virus del papiloma humano; NNRTI: Inhibidores de la transcriptasa inversa no nucleósidos; PI: Inhibidores de la proteasa; INI: Inhibidores de la Integrasa.

Respecto al número de cuasispecies, se encontró una mediana de 4 (IQR 2-5) cuasispecies diferentes en el compartimento sanguíneo, mientras que una mediana de 6 (IQR 4-8) diferentes cuasispecies se encontraron en el líquido seminal. Todos los pacientes, excepto uno, mostraron un mayor número de cuasispecies en plasma seminal que en el compartimento sanguíneo. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la diversidad viral entre pacientes con infección aguda por VIH y sin ella. Del mismo modo, el índice Shannon fue más alto ($p < 0.001$) en el compartimento seminal que en la sangre (1,77 vs 0,64). Los pacientes fueron infectados predominantemente con virus CCR5 (80,9% en sangre y 83% en

plasma seminal). Curiosamente, encontramos un tropismo diferente en sangre y muestras seminales en dos pacientes. Estos datos se muestran en la tabla 10.

	Sangre N=47	Plasma seminal N=47	P
Cuasiespecies ^a	4 (2-5)	6 (4-8)	<0.001
Shannon Index ^a	0.64 [0.41-1.01]	1.77[1.21-2.32]	<0.001
Tropismo CXCR4 CCR5	9 (19.1%) 38 (80.9%)	8 (17%) 39 (83%)	0.789
Las secuencias estudiaron ^a	68,963 [57,699-79,352]	62,577 [54,335-73,669]	0.155

Tabla 10. Características virológicas en sangre y plasma seminal. ^amediana [IQR, percentil 25-75].

Los análisis secundarios no mostraron ninguna relación entre la diversidad viral en la sangre y la carga viral inicial ($p = 0,196$), el recuento de células T nadir CD4 ($p = 0,119$) o la infección aguda por el VIH ($p = 0,594$). Del mismo modo, no se encontró una relación entre la infección aguda por el VIH y la diversidad viral en el plasma seminal ($p = 0,652$). Del mismo modo, en 11 pacientes para los que pudimos analizar la carga viral seminal, no se encontró ninguna relación entre la diversidad viral y la carga viral inicial ($p = 0,382$).

Para caracterizar aún más la evolución de la diversidad viral tanto en el compartimento seminal como en el compartimento sanguíneo, estudiamos

la *env* en 33 pacientes para los que se tenían muestras en T0 y T1 emparejadas de sangre y plasma seminal. La Tabla 11 muestra el número de cuasiespecies virales para cada paciente y la mediana de los valores. En T1 (1 mes después del tratamiento con ART), se encontró una disminución significativa ($p < 0.001$) tanto en sangre (T0: 3[2-5] vs T1: 0[0-1]) como en plasma seminal (T0: 6[4-7.5] vs T1: 0[0-2]). El ARN del VIH fue indetectable tanto en sangre como en plasma seminal en 16 pacientes (48,5%). Se encontraron resultados discordantes en 4/33 pacientes (12,1%) caracterizados por ARN VIH-1 detectable en el plasma seminal pero ARN VIH-1 indetectable en el plasma sanguíneo.

	T0		T1		Régimen antirretroviral
	Sangre	Seminal Plasma	Sangre	Seminal Plasma	
1	3	6	1	2	TDF + FTC + RPV
2	5	7	0	0	TDF + FTC + RPV
3	4	6	1	1	TDF + FTC + RPV
4	1	3	1	1	TDF + FTC + RPV
5	2	4	1	2	TDF + FTC + DRV/rtv
6	4	7	2	4	TDF + FTC + DRV/rtv
7	7	10	3	6	TDF + FTC + DRV/rtv
8	3	4	1	1	TDF + FTC + DRV/rtv
9	4	5	1	1	TDF + FTC + DRV/rtv
10	2	3	0	0	TDF + FTC + DRV/rtv
11	5	8	0	0	TDF + FTC + EVG/c
12*	2	4	0	0	TAF + FTC + EVG/c
13	2	3	0	0	TAF + FTC + EVG/c
14	3	6	0	0	TAF + FTC + EVG/c
15	2	3	1	2	TAF + FTC + EVG/c
16	1	2	0	0	TAF + FTC + EVG/c
17	3	6	1	2	TAF + FTC + EVG/c
18	2	7	0	0	TAF + FTC + EVG/c

19	8	11	0	6	TAF + FTC + EVG/c
20	4	2	0	1	TAF + FTC + EVG/c
21	3	5	0	0	TAF + FTC + EVG/c
22*	7	11	3	5	TAF + FTC + EVG/c
23*	3	6	0	5	TAF + FTC + EVG/c
24	2	4	1	6	TAF + FTC + EVG/c
25	5	7	0	3	TAF + FTC + DRV/c
26	6	11	0	0	3TC + ABC + DTG
27	3	6	0	0	3TC + ABC + DTG
28	3	5	0	0	3TC + ABC + DTG
29	5	8	0	0	3TC + ABC + DTG
30*	6	9	0	0	3TC + ABC + DTG
31	1	2	0	0	3TC + ABC + DTG
32	4	8	0	0	3TC + ABC + DTG
33	2	4	1	1	3TC + ABC + DTG

Tabla 11. Número de cuasiespecies virales en cada uno de los 33 pacientes en los que estuvieron disponibles muestras sangre y plasma seminales en T0 y T1. TDF: tenofovir fumarato; FTC: emtricitabina; 3TC: lamivudina; TAF: tenofovir alafenamida; ABC: abacavir; RPV: rilpivirina; DRV/rtv: darunavir/ritonavir; DTG: dolutegravir; EVG/c: elvitegravir/cobicistat; DTG: dolutegravir. *Pacientes con infección aguda. 0: carga viral indetectable, no se detectaron cuasiespecies.

Los pacientes tratados con INI alcanzaron la indetectabilidad con mayor probabilidad tanto en sangre como en plasma seminal ($p < 0.001$) que los pacientes tratados con un IP o con un régimen basado en NNRTI, incluso partiendo (T0) de cargas sanguíneas virales superiores a otros regímenes (INI 47.423 [4,502-339,750], IP 8.220 [4,730-42,700], NNRTI 46,300 [32,050-83,650]). La Tabla 12 muestra las cuasiespecies de acuerdo con el régimen de tratamiento prescrito con respecto a los 33 pacientes; encontramos que el INI produjo una disminución en el número de cuasiespecies en ambas muestras ($p < 0.001$); esta disminución no se encontró con los PI ni con los NNRTI. En cuanto al número de cuasiespecies en T1 en los 13 pacientes con

carga viral positiva en plasma y sangre seminales, la diversidad viral se mantuvo más alta en el plasma seminal [mediana 2 (IQR 1-4.5)] que en la sangre [mediana 1 (IQR 1-1.5)] $p=0,139$.

	N	T0 a	T1 a	P
Sangre	33			
INI	22	3[2-5]	0[0-0.25]	<0.001
IP	7	4[2-5]	1[0-2]	0.051
NNRTI	4	3.5[1.5-4.75]	1[0.25-1]	0.327
Seminal Plasma	33			
INI	22	6[3.75-8]	0[0-2]	<0.001
IP	7	5[4-7]	2[0-4]	0.051
NNRTI	4	6[3.75-6.75]	1[0.25-1.75]	0.204

Tabla 12. Número de cuasiespecies según el régimen de tratamiento prescrito.
^amediana [IQR, percentil 25-75].

DISCUSIÓN

Comprender la diversidad genética viral del VIH en el plasma seminal de pacientes infectados por el VIH es de suma importancia para dilucidar la transmisión sexual del VIH. Hasta nuestro conocimiento, nuestro estudio es uno de los estudios más grandes que analizan muestras de sangre y plasma seminal emparejados de pacientes infectados por el VIH-1 naive a TAR. Encontramos un mayor número y una mayor variabilidad de las cuasiespecies virales del *env* VIH-1 en el plasma seminal que en la sangre mediante el uso de la secuenciación profunda. Tras el inicio del TAR de primera línea, descubrimos que la diversidad viral del *env* VIH-1 era mayor en plasma seminal que en la sangre, y el VIH permaneció detectable en plasma seminal en más pacientes que en sangre.

El contacto sexual es actualmente la principal vía de transmisión del VIH-1. El tracto genital masculino se ha caracterizado como un reservorio^{107,108}, como un compartimento¹⁰⁹, y un santuario para los fármacos¹¹⁰. La compartimentación del VIH y la diversidad en el plasma seminal se han estudiado previamente utilizando diversas metodologías. Ghosn J et al¹¹¹ analizaron el patrón de resistencia genotípica en pacientes con infección por VIH establecidos en TAR con una mediana de 7 tratamientos antirretrovirales anteriores (rango 3-15), mostrando diferentes patrones de resistencia genotípica en la sangre y los compartimentos genitales en seis pacientes. Curiosamente, el análisis filogenético de clones

del gen de la proteasa del VIH mostró que las cepas virales podrían originarse a partir de la producción local en plasma seminal. Pillai S et al¹¹² analizaron secuencias del *env* VIH-1 en muestras apareadas de sangre y plasma seminal de la base de datos de secuencias de VIH de Los Alamos, sugiriendo el tracto genital masculino como un entorno selectivo que contribuye a cuellos de botella genéticos asociados con la transmisión sexual del VIH-1¹¹² En coherencia con nuestro estudio, Jiao YM et al¹¹³ describieron una mayor diversidad genética del VIH-1 en los compartimentos seminales que en la sangre de siete hombres que tenían relaciones sexuales con hombres (MSM) con infección temprana por VIH-1.

Es bien sabido que el VIH puede permanecer positivo en el plasma seminal después de iniciar el tratamiento durante períodos más largos que en sangre^{96,114}. Du P et al⁸¹ describieron cómo las cantidades de ARN del VIH y ADN del VIH seguían siendo altas en el plasma seminal de pacientes chinos infectados por el VIH después de seis meses de TAR, incluso cuando el ARN del VIH era indetectable en la sangre.

Además, evaluamos longitudinalmente la diversidad genética en el plasma seminal después de un mes de iniciar el TAR de primera línea. Hasta donde sabemos, este es el primer estudio que comunica una mayor diversidad genética en el plasma seminal incluso después del inicio del TAR de primera línea.

Del mismo modo, varios estudios han abordado la presencia de VIH-1 en los compartimentos rectales y vaginales. A pesar de usar diferentes métodos y medidas para abordar la diversidad, de manera similar a nuestro estudio, la diversidad del VIH fue consistentemente mayor en estos compartimentos que en la sangre. García-Payá et al¹¹⁵ informaron de una mayor presencia rectal de ARN VIH-1 en MSM suprimidos virológicamente, lo que sugiere que las mediciones de ARN VIH-1 de sangre pueden no reflejar necesariamente las concentraciones virales en el reservorio rectal. No hay una explicación segura de la mayor diversidad viral en el plasma seminal respecto a la sangre disponible hasta la fecha; una posible causa podría ser una selección inmune más baja en el tracto genitourinario en comparación con la sangre y, por lo tanto, una capacidad de eliminación más baja en el plasma seminal.

Una de las principales ventajas de prevenir la transmisión del VIH se presenta en el informe final del estudio PARTNER. En este estudio, Rodger AJ et al⁶³ sugieren que el riesgo de transmisión del VIH en parejas homosexuales a través del sexo sin condón cuando se suprime la carga viral del VIH es, efectivamente, cero. Nuestros hallazgos en plasma seminal, junto con los estudios mencionados anteriormente realizados en plasma seminal y en mucosa rectal deben interpretarse con precaución.

Nuestro estudio tiene varias limitaciones, siendo el seguimiento a

corto plazo (1 mes) su principal limitación. Aunque nuestro estudio fue longitudinal, nuestro seguimiento sólo se amplió un mes después de la iniciación del TAR. La detección de una mayor variabilidad en el plasma seminal que en la sangre en este estudio de seguimiento, a pesar de ser relevante, no debe interpretarse como una advertencia para la propagación del VIH, especialmente después de los resultados del estudio PARTNER, donde los pacientes estuvieron en tratamiento TAR una mediana (IQR) de 4,3 (1,8–9,3) años. Junto con el corto plazo de seguimiento, nuestro tamaño de la muestra también fue limitado. Por último, aunque nuestro estudio hubiera sido más potente si se hubiera secuenciado el genoma completo, elegimos el gen *env*, que en ausencia de genoma completo es el estándar de oro para estudiar la variabilidad del VIH.

Se ha demostrado que la carga viral en el plasma seminal se vuelve negativa más pronto con los INI y rilpivirina que con los IP⁹⁵. Todavía se desconoce la influencia de los distintos regímenes terapéuticos en la variación en el número de cuasiespecies en la sangre o el plasma seminal. En nuestro estudio, encontramos una disminución significativa en el número de cuasiespecies en T1 en comparación con T0 en sangre y plasma seminal con INI, pero no se encontró una disminución significativa con IP ni con NNRTI.

CONCLUSIONES

Tras la realización de este proyecto de investigación, concluimos que:

- 1) Existe una mayor variabilidad genética en el plasma seminal que en la sangre en el diagnóstico de la infección VIH y al mes después de la iniciación del TAR.

- 2) Los INI disminuyen el número de cuasiespecies de manera más eficiente que IP y NNRTI tanto en sangre como en plasma seminal.

BIBLIOGRAFIA

1. Alcamí J. Avances en la inmunopatología de la infección por el VIH. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2004;22(8);486-96.
2. Kaposi's sarcoma and Pneumocystis pneumonia among homosexual men in New York City and California. *Morb Mortal Wkly Rep*. 1981: 30(25);305-8.
3. Gallo RC, Sarin PS, Gelmann EP, Robert-Guroff M, Richardson E, Kalyanarman VS et al. Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 1983;220(4599);865-67.
4. Samji H, Cescon A, Hogg RS, Modur SP, Althoff KN, Buchacz K et al. Closing the gap: increases in life expectancy among treated HIV-positive individuals in the United States and Canada. *PLoS One* 2013; 8:e81355
5. Santana A, Domínguez C, Lemes A, Molero T, Salido E. Biología celular y molecular del virus de inmunodeficiencia humana (VIH). *Rev Diagn Biol* vol.52 no.1 ene./mar. 2003
6. Sharp PM, Hahn BH. Origins of HIV and the AIDS pandemic. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2011 Sep;1(1):a006841.
7. Maroto Vela, C; Bernal Zamora, C; García García, F. Diagnóstico y tratamiento de las infecciones por el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 2 Departamento de Microbiología. Facultad de Medicina. Hospital Clínico San Cecilio. Control de Calidad SEIMC. Obtenido de: <https://seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/serologia/Vih-2.pdf>
8. Jose Ángel Fernández-Caballero Rico. Resistencias a antirretrovirales: nuevos métodos de detección, nuevas aplicaciones. Tesis doctoral. 2017.
9. Delgado R. Características virológicas del VIH. *Enferm Infecc. Microbiol Clin*. 2011;29(1);58-65.
10. Ferrer P, Rodríguez C, Tordecilla R, Guzmán M, Afani A. Antagonistas de CCR5 en la infección por virus de inmunodeficiencia humana (VIH): aspectos generales y tropismo viral. *Rev Hosp Clín Univ Chile*. 2012;23;346-53.
11. Kahn JO, Walker BD. Acute human immunodeficiency virus type 1 infection. *N Engl J Med* 1998; 339:33.
12. Alves BM, Siqueira JD, Garrido MM, Botelho OM, Prellwitz IM, Ribeiro SR et al. Characterization of HIV-1 Near Full-Length Proviral Genome Quasispecies from Patients

- with Undetectable Viral Load Undergoing First-Line HAART Therapy. *Viruses*. 2017 Dec 19;9(12).
13. Quiñones-Mateu M. Is HIV-1 evolving to a less virulent (pathogenic) virus? *AIDS*. 2005;19;1689-90.
 14. Wain-Hobson S. The fastest genome evolution ever described: HIV variation in situ. *Curr Opin Genet Dev*. 1993 Dec;3(6):878-83.
 15. Domingo E, Sheldon J, Perales C. Viral quasispecies evolution. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2012 Jun;76(2):159-216
 16. José Maximiliano Medina Ramírez. Búsqueda de respuesta humoral neutralizante en pacientes VIH-1 con niveles indetectables de viremia. Tesis doctoral. 2012.
 17. María del Carmen Casañas Carrillo. Modelos de interpretación de la resistencia del virus de la inmunodeficiencia humana a los fármacos antirretrovirales. Valoración de la capacidad predictora de la respuesta virológica. Tesis doctoral. 2008.
 18. Overbaugh J, Bangham CR. Selection forces and constraints on retroviral sequence variation. *Science*. 2001 May 11;292(5519):1106-9.
 19. World Health Organisation. HIV/AIDS topics. https://www.who.int/health-topics/hiv-aids/#tab=tab_1. Accedido el 09/03/20
 20. Tindall B, Cooper DA, Donovan B, Penny R. Primary human immunodeficiency virus infection. Clinical and serologic aspects. *Infect Dis Clin North Am*. 1988 Jun;2(2):329-41.
 21. Pilcher CD, Tien HC, Eron JJ Jr, Vernazza PL, Leu SY, Stewart PW et al. Brief but efficient: acute HIV infection and the sexual transmission of HIV. *J Infect Dis* 2004; 189:1785.
 22. Powers KA, Poole C, Pettifor AE, Cohen MS. Rethinking the heterosexual infectivity of HIV-1: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 2008; 8:553.
 23. Liebenberg LJ, Masson L, Arnold KB, Mckinnon LR, Werner L, Proctor E et al. Genital-Systemic Chemokine Gradients and the Risk of HIV Acquisition in Women. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2017; 74:318.
 24. Pao D, Fisher M, Hué S, Dean G, Murphy G, Cane PA et al. Transmission of HIV-1 during primary infection: relationship to sexual risk and sexually transmitted infections. *AIDS*. 2005 Jan 3;19(1):85-90.
 25. Freeman EE, Weiss HA, Glynn JR, Cross PL, Whitworth JA, Hayes RJ. Herpes simplex virus 2 infection increases HIV acquisition in men and women: systematic review and meta-analysis of longitudinal studies. *AIDS* 2006; 20:73.

26. Reynolds SJ, Risbud AR, Shepherd ME, Rompalo AM, Ghatge MV, Godbole SV et al. High rates of syphilis among STI patients are contributing to the spread of HIV-1 in India. *Sex Transm Infect* 2006; 82:121.
27. Fleming DT, Wasserheit JN. From epidemiological synergy to public health policy and practice: the contribution of other sexually transmitted diseases to sexual transmission of HIV infection. *Sex Transm Infect* 1999; 75:3.
28. Spiller MW, Broz D, Wejnert C, Nerlander L, Paz-Bailey G. HIV infection and HIV-associated behaviors among persons who inject drugs--20 cities, United States, 2012. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2015; 64:270.
29. Auvert B, Taljaard D, Lagarde E, Sobngwi-Tambekou J, Sitta R, Puren A. et al. Randomized, controlled intervention trial of male circumcision for reduction of HIV infection risk: the ANRS 1265 Trial. *PLoS Med* 2005; 2:e298.
30. Bailey RC, Moses S, Parker CB, Agot K, Maclean I, Krieger JN et al. Male circumcision for HIV prevention in young men in Kisumu, Kenya: a randomised controlled trial. *Lancet* 2007; 369:643.
31. Gray RH, Kigozi G, Serwadda D, Makumbi F, Watya S, Nalugoda F et al. Male circumcision for HIV prevention in men in Rakai, Uganda: a randomised trial. *Lancet* 2007; 369:657.
32. Donoval BA, Landay AL, Moses S, Agot K, Ndinya-Achola JO, Nyagaya EA et al. HIV-1 target cells in foreskins of African men with varying histories of sexually transmitted infections. *Am J Clin Pathol* 2006; 125:386.
33. Wawer MJ, Makumbi F, Kigozi G, Serwadda D, Watya S, Nalugoda F et al. Circumcision in HIV-infected men and its effect on HIV transmission to female partners in Rakai, Uganda: a randomised controlled trial. *Lancet* 2009; 374:229.
34. Cohen, MS. HIV infection: Risk factors and prevention strategies En: Bartlett JG, ed. *UpToDate*. Waltham, Mass.: UpToDate, 2020. https://ws003.sspa.juntadeandalucia.es:2060/contents/hiv-infection-risk-factors-and-prevention-strategies?search=risk%20factor%20vih&source=search_result&selectedTitle=1~150&usage_type=default&display_rank=1 Consultado el 14 Marzo de 2020.
35. Sax, PE. Acute and early HIV infection: Pathogenesis and epidemiology. En: Bartlett JG, ed. *UpToDate*. Waltham, Mass.: UpToDate, 2020. https://ws003.sspa.juntadeandalucia.es:2060/contents/acute-and-early-hiv-infection-pathogenesis-and-epidemiology?search=VIH&topicRef=86984&source=related_link.

36. Pedersen C, Lindhardt BO, Jensen BL, Lauritzen E, Gerstoft J, Dickmeiss E et al. Clinical course of primary HIV infection: consequences for subsequent course of infection. *BMJ* 1989; 299:154.
37. Dorrucchi M, Rezza G, Vlahov D, Pezzotti P, Sinicco A, Nicolosi A et al. Clinical characteristics and prognostic value of acute retroviral syndrome among injecting drug users. Italian Seroconversion Study. *AIDS* 1995; 9:597.
38. Niu MT, Stein DS, Schnittman SM. Primary human immunodeficiency virus type 1 infection: review of pathogenesis and early treatment intervention in humans and animal retrovirus infections. *J Infect Dis* 1993; 168:1490- 501.
39. López Ruz, MA. Capítulo 21: Síndrome de la inmunodeficiencia adquirida. Otros retrovirus. En: López-Ruz, MA. Manual de enfermedades infecciosas. Grado de Medicina. 1ª Edición. Granada: Tecnica Avicam; 2017. 15-26.
40. Karon JM, Buehler JW, Byers RH, Farizo KM, Green TA, Hanson DL et al. Projections of the number of persons diagnosed with AIDS and the number of immunosuppressed HIV-infected persons--United States, 1992-1994. *MMWR Recomm Rep* 1992 Dec 25;41(RR-18):1-29.
41. Sterling T, Chaisson R. General clinical manifestations of Human Immunodeficiency Virus infection (including the acute antiretroviral syndrome and oral, cutaneous, renal, ocular, metabolic, and cardiac diseases). In: Principles and Practice of Infectious Diseases, 7, Mandell GL, Bennet JE, Dolin R (Eds), 2010. p.1705
42. Ferreira A, Young T, Mathews C, Zunza M, Low N. Strategies for partner notification for sexually transmitted infections, including HIV. *Cochrane Database Syst Rev* 2013:CD002843.
43. García F, Álvarez M, Bernal C, Chueca N, Guillot V. Diagnóstico de laboratorio de la infección por el VIH, del tropismo viral y de las resistencias a los antirretrovirales. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2011;29(4):297–307
44. Grupo de Estudio de Sida de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas. Documento de consenso de Gesida/Plan Nacional sobre el Sida respecto al tratamiento Antirretroviral en adultos Infeccionados por el virus de la Inmunodeficiencia humana (actualización enero 2020) <http://gesida-seimc.org/category/guias-clinicas/> (Consultado el 14/03/2018).

45. Daar ES, Moudgil T, Meyer RD, Ho DD. Transient high levels of viremia in patients with primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *N Engl J Med* 1991 Apr 4;324(14):961-4.
46. Celum CL, Robinson NJ, Cohen MS. Potential effect of HIV type 1 antiretroviral and herpes simplex virus type 2 antiviral therapy on transmission and acquisition of HIV type 1 infection. *J Infect Dis* 2005 Feb 1;191 Suppl 1:S107-14
47. Colfax GN, Buchbinder SP, Cornelisse PG, Vittinghoff E, Mayer K, Celum C. Sexual risk behaviors and implications for secondary HIV transmission during and after HIV seroconversion. *AIDS* 2002 Jul 26;16(11):1529-35.
48. Hollingsworth TD, Pilcher CD, Hecht FM, Deeks SG, Fraser C. High Transmissibility During Early HIV Infection Among Men Who Have Sex With Men-San Francisco, California. *J Infect Dis* 2015 Jun 1;211(11):1757-60.
49. Patterson KB, Leone PA, Fiscus SA, Kuruc J, McCoy SI, Wolf L et al. Frequent detection of acute HIV infection in pregnant women. *AIDS* 2007 Nov 12;21(17):2303-8
50. Cohen MS, Chen YQ, McCauley M, Gamble T, Hosseinipour MC, Kumarasamy N et al. Antiretroviral therapy for the prevention of HIV-1 transmission. *N Engl J Med* 2016;375:830-9.
51. Ford N, Migone C, Calmy A, et al. Benefits and risks of rapid initiation of antiretroviral therapy. *AIDS*. 2018;32:17-23.
52. Molina JM, Grund B, Gordin F, Williams I, Schechter M, Losso M, et al. Which HIV-infected adults with high CD4 T-cell counts benefit most from immediate initiation of antiretroviral therapy? A post-hoc subgroup analysis of the START trial. *Lancet HIV*. 2018;5:e172-e180
53. Arribas JR, Thompson M, Sax PE, Haas B, McDonald C, Wohl DA et al. Randomized, double-blind comparison of tenofovir alafenamide (TAF) vs tenofovir disoproxil fumarate (TDF), each coformulated with elvitegravir, cobicistat, and emtricitabine (E/C/F) for initial HIV-1 treatment: week 144 results. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2017;75:211-8.
54. Venter WDF, Moorhouse M, Sokhela S, Fairlie L, Mashabane N, Masenya M et al. Dolutegravir plus Two Different Prodrugs of Tenofovir to Treat HIV. *N Engl J Med*. 2019 Aug 29;381:803-15
55. Cruciani M, Mengoli C, Malena M, Serpelloni G, Parisi SG, Moyle G et al. Virological efficacy of abacavir: systematic review and meta-analysis. *J Antimicrob Chemother* 2014;69:3169-80.

56. Swindells S, Andrade-Villanueva JF, Richmond GJ, Rizzardini G, Baumgarten A, Masiá M et al. Long-Acting Cabotegravir and Rilpivirine for Maintenance of HIV-1 Suppression. *N Engl J Med*. 2020 Mar 19;382(12):1112-112
57. Orkin C, Arasteh K, Górgolas Hernández-Mora M, Pokrovsky V, Overton ET, Girard PM et al. Long-Acting Cabotegravir and Rilpivirine after Oral Induction for HIV-1 Infection. *N Engl J Med*. 2020 Mar 19;382(12):1124-1135.
58. Poveda E, Alcamí J, Paredes R, Córdoba J, Gutiérrez F, Llibre JM et al. Genotypic determination of HIV tropism - clinical and methodological recommendations to guide the therapeutic use of CCR5 antagonists. *AIDS Rev* 2010;12:135-48.
59. Li H, Marley G, Ma W, Wei C, Lackey M, Ma Q et al. The role of ARV associated adverse drug reactions in influencing adherence among HIV-infected individuals: a systematic review and qualitative meta-synthesis. *AIDS Behav* 2017;21:341-51.
60. Manabe YC, Campbell JD, Sydnor E, Moore RD. Immune reconstitution inflammatory syndrome: risk factors and treatment implications. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2007; 46:456.
61. Breton G, Duval X, Estellat C, Poaletti X, Bonnet D, Mvondo Mvondo D et al. Determinants of immune reconstitution inflammatory syndrome in HIV type 1-infected patients with tuberculosis after initiation of antiretroviral therapy. *Clin Infect Dis* 2004; 39:1709.
62. Wolfe C. Immune reconstitution inflammatory syndrome. En: Bartlett JG, SX PE ed. *UpToDate*. Waltham, Mass.: UpToDate, 2020. https://ws003.sspa.juntadeandalucia.es:2060/contents/immune-reconstitution-inflammatory-syndrome?search=s%C3%ADndrome%20de%20reconstituci%C3%B3n%20inmune&source=search_result&selectedTitle=1~150&usage_type=default&display_rank=1 Consultado el 23 Marzo de 2020.
63. Rodger AJ, Cambiano V, Bruun T, Vernazza P, Collins S, Degen O et al. PARTNER Study Group. Risk of HIV transmission through condomless sex in serodifferent gay couples with the HIV-positive partner taking suppressive antiretroviral therapy (PARTNER): final results of a multicentre, prospective, observational study. *Lancet*. 2019 Jun 15;393(10189):2428-2438.
64. Kuhar DT, Henderson DK, Struble KA, Heneine W, Thomas V, Cheever LW et al. Updated US Public Health Service guidelines for the management of occupational exposures to

- human immunodeficiency virus and recommendations for postexposure prophylaxis. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2013; 34:875.
65. Documento de consenso sobre profilaxis postexposición ocupacional y no ocupacional en relación con el VIH, VHB Y VHC en adultos y niños. Marzo 2015. <http://gesida-seimc.org/wp-content/uploads/2017/02/gesida-guiasclinicas-2015-Profilaxispostexposicion-VIH-VHC-VHB.pdf>. Consultado el 12/4/2020
66. Aberg JA, Gallant JE, Ghanem KG, Emmanuel P, Zingman BS, Horberg MA. Primary care guidelines for the management of persons infected with HIV: 2013 update by the HIV medicine association of the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2014; 58:e1
67. Documento de prevención y tratamiento de infecciones oportunistas y otras coinfecciones en pacientes con infección por VIH. GESIDA. MAYO 2015. <http://gesida-seimc.org/wp-content/uploads/2017/02/gesida-guiasclinicas-2015-InfeccionesOportunistasyCoinfeccionesVIH.pdf>. Consultado el 12/4/2020.
68. Saah AJ, Hoover DR, Peng Y, Phair JP, Visscher B, Kingsley LA et al. Predictors for failure of *Pneumocystis carinii* pneumonia prophylaxis. Multicenter AIDS Cohort Study. *JAMA* 1995; 273:1197.
69. Teshale EH, Hanson DL, Wolfe MI, Brooks JT, Kaplan JE, Bort Z et al. Reasons for lack of appropriate receipt of primary *Pneumocystis jirovecii* pneumonia prophylaxis among HIV-infected persons receiving treatment in the United States: 1994-2003. *Clin Infect Dis* 2007; 44:879.
70. Heffelfinger JD, Voetsch AC, Nakamura GV, Sullivan PS, McNaghten AD, Huang L. Non adherence to primary prophylaxis against *Pneumocystis jirovecii* pneumonia. *PLoS One* 2009; 4:e5002.
71. Sax PE. Overview of prevention of opportunistic infections in HIV-infected patients. En: Hirsch MD ed. *UpToDate*. Waltham, Mass.: UpToDate, 2020. https://ws003.sspa.juntadeandalucia.es:2060/contents/overview-of-prevention-of-opportunistic-infections-in-hiv-infected-patients?search=Visi%C3%B3n%20general%20de%20la%20prevenci%C3%B3n%20de%20infecciones%20oportunistas%20en%20pacientes%20infectados%20por%20el%20VIH&source=search_result&selectedTitle=1~150&usage_type=default&display_rank=1. Consultado el 28 Marzo de 2020.

72. Lazo M, Gange SJ, Wilson TE, Anastos K, Ostrow DG, Witt MD et al. Patterns and predictors of changes in adherence to highly active antiretroviral therapy: longitudinal study of men and women. *Clin Infect Dis* 2007; 45:1377.
73. Sax PE. Patient monitoring during HIV antiretroviral therapy. En: Hirsch MD ed. *UpToDate*. Waltham, Mass.: UpToDate, 2020. https://ws003.sspa.juntadeandalucia.es:2060/contents/patient-monitoring-during-hiv-antiretroviral-therapy?search=Monitoreo%20del%20paciente%20durante%20la%20terapia%20antirretroviral%20del%20VIH&source=search_result&selectedTitle=1~150&usage_type=default&display_rank=1 Consultado el 29 Marzo de 2020.
74. Mocroft A, Phillips AN, Gatell J, Ledergerber B, Fisher M, Clumeck N et al. Normalisation of CD4 counts in patients with HIV-1 infection and maximum virological suppression who are taking combination antiretroviral therapy: an observational cohort study. *Lancet* 2007; 370:407.
75. Le Moing V, Thiébaud R, Chêne G, Leport C, Cailleton V, Michelet C et al. Predictors of long-term increase in CD4(+) cell counts in human immunodeficiency virus-infected patients receiving a protease inhibitor-containing antiretroviral regimen. *J Infect Dis* 2002; 185:471.
76. Grabar S, Kousignian I, Sobel A, et al. Immunologic and clinical responses to highly active antiretroviral therapy over 50 years of age. Results from the French Hospital Database on HIV. *AIDS* 2004; 18:2029.
77. Gupta P, Leroux C, Patterson B, Kingsley L, Rinaldo Ch, Ging Ming et al. Human immunodeficiency virus type 1 shedding pattern in semen correlates with the compartmentalisation of viral quasispecies between blood and semen. *Journal Infectious Diseases* 2000; 182: 79-87
78. Chéret A, Durier C, Mélard A, Ploquin M, Heitzmann J, Lécuroux C et al. Impact of early cART on HIV blood and semen compartments at the time of primary infection. *Plos One* 2017;12(7): e0180191
79. Marcellin AG, Tubiana R, Lambert –Niclot G, Lefebvre G, Dominguez S, Bonmarchand M et al. Detection of HIV-1 RNA in seminal plasma samples from treated patients with undetectable HIV-1 RNA in blood plasma. *AIDS* 2008; 22: 1677-79.

80. Lambert-Niclot, S, Tubiana R, Beaudoux, C, Lefebvre G, Caby F, Bonmarchand M et al. Detection of HIV-1 RNA in seminal plasma samples from treated patients with undetectable HIV-1 RNA in blood plasma on a 2002–2011 survey. *AIDS* 2012 26:971-75.
81. Du P, Liu A, Jiao Y, Liu C, Jiang T, Zhu W et al. HIV RNA and proviral HIV DNA can be detected in semen after 6 months of antiretroviral therapy although HIV RNA is undetectable in blood. *Microbiol Immunol* 2016;60: 187-195.
82. Sheth PM, Kovacs C, Kemal KS, Jones RB, Raboud JM, Pilon R et al. Persistent HIV RNA shedding in semen despite effective antiretroviral therapy. *AIDS* 2009; 23(15):2050-54.
83. Ferrarreto X, Estellat C, Damond F, Longuet P, Epelboin S, Yazbeck Ch et al. Timing of intermittent seminal HIV-1 plasma viral load under combination antiretroviral therapy. *Plos One* 2014;9 :e 88922.
84. López Ruz MA, López Zúñiga MA, Gonzalvo MC, Sampedro A, Pasquau J, Hidalgo C et al. Effect of monotherapy with darunavir/cobicistat on viral load and semen quality of HIV-1 patients. *PLoS One*. 2018 Apr 24;13(4):e0196257. doi: 10.1371/journal.pone.0196257. eCollection 2018.
85. López-Ruz MA, Navas P, López-Zúñiga MA, Gonzalvo MC, Sampedro A, Pasquau J et al. Effect of Monotherapy with Darunavir/Ritonavir on Viral Load in Seminal Fluid, and Quality Parameters of Semen in HIV-1-Positive Patients. *PLoS One*. 2016 Jul 21;11(7):e0159305.
86. Torres-Cornejo A, Ben Marzouk-Hidalgo OJ, Alicia Gutiérrez-Valencia, Viciano P, Sánchez-Sánchez B, López-Ruz MA et al. HIV-1 shedding in male genital tract of patients treated with ritonavir-boosted protease inhibitor monotherapy or triple therapy. *Clin Microbiol Infect* 2016 Jan;22(1):98.e7-98.e10.
87. Klein K, Nickel G, Nankya I, Kyeyune F, Demers K, Ndashimye E et al. Higher sequence diversity in the vaginal tract than in blood at early HIV-1 infection. *PLoS Pathog* 2018 14(1): e1006754.
88. Pilcher CD, Joaki G, Hoffman IF, Martinson FE, Mapanje C, Stewart PW et al. Amplified transmission of HIV-1: comparison of HIV-1 concentrations in semen and blood during acute and chronic infection. *AIDS* 2007 21:1723-30.
89. Laga M, Manoka A, Kivuvu M, Malele B, Tuliza M, Nzila N et al. Non-ulcerative sexually transmitted diseases as risk factors for HIV-1 transmission in women: results from a cohort study. *AIDS*. 1993 Jan;7(1):95-1022

90. Gianella S, Smith D, Vargas M, Little S, Richman D, Daar E et al. Shedding of HIV and human herpesvirus in the semen effectively treated HIV 1 infected men who have sex with men. *CID* 2013;57:441-447.
91. Looker KJ, Elmes JAR, Gottlieb SL, Schiffer JT, Vickerman P, Turner KME, et al. Effect of HSV-2 infection on subsequent HIV acquisition: an updated systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis*. 2017 Dec;17(12):1303-1316.
92. Anderson BL, Wang CC, DeLong AK, Liu T, Kojic EM, Kurpewski J et al. Genital tract leukocytes and shedding of genital HIV type 1 RNA. *CID* 2008;47: 1216-21.
93. Anderson DJ, O'Brien TR, Politch JA, Martinez A, Seage GR, Padian Net al. Effects of disease stage and zidovudine therapy on the detection of human immunodeficiency virus type 1 in semen. *JAMA* 1992;267: 2769-74.
94. Chen JS, Matoga M, Massa C, Ndalama B, Jere E, Tegha G, et a. Back to the future: even in the ART era, men co-infected with HIV and urethritis pose a potential transmission threat. *HIV Research por Prevention(HIVR4P)*. October 21-25 Madrid. Abstract. P28. 21LB.
95. Gutiérrez Valencia A, Benmarzouk O, Rivas-Jeremías I, Trujillo-Rodriguez M, Fernández-Magdaleno T, Viciano P et al. Viral kinetics in semen with different antirretroviral families in treatment-naive human immunodeficiency virus-infected patients: a randomized trial. *CID* 2017: 65: 551-56.
96. Fabrizio C, de Gennaro N, Volpe A, Scudeller L, Lagioia A, Falasca K et al. HIV-RNA decay in paired blood and semen samples of subjects receiving their first dolutegravir-based ART regimen. *J Clin Virol*. 2018 Dec;109:45-49. .
97. Villarreal JL, Gutiérrez J, Palacio L, Peñuela M, Hernández R, Lemay G et al. Characterization of HIV type 1 envelope sequence among viral isolates circulating in the northern region of Colombia, South America. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2012 Dec;28(12):1779-83.
98. Rao M, Peachman KK, Kim J, Gao G, Alving CR, Michael NL et al. HIV-1 variable loop 2 and its importance in HIV-1 infection and vaccine development. *Curr HIV Res*. 2013 Jul;11(5):427-38
99. de Camp A, Hraber P, Bailer RT, Seaman MS, Ochsenbauer C, Kappes J et al. Global panel of HIV-1 Env reference strains for standardized assessments of vaccine-elicited neutralizing antibodies. *J Virol*. 2014 Mar;88(5):2489-507.

100. Kitawi RC, Hunja CW, Aman R, Ogutu BR, Muigai AW, Kokwaro GO, Partial HIV C2V3 envelope sequence analysis reveals association of coreceptor tropism, envelope glycosylation and viral genotypic variability among Kenyan patients on HAART. *Virol J.* 2017 Feb 14;14(1):29
101. Hamoudi M, Simon-Loriere E, Gasser R, Negroni M. Genetic diversity of the highly variable V1 region interferes with Human Immunodeficiency Virus type 1 envelope functionality. *Retrovirology.* 2013 Oct 24;10:114.
102. Okonechnikov K, Golosova O, Fursov M; UGENE team. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics.* 2012 Apr 15;28(8):1166-7.
103. Edgar EC, Flyvbjerg H. Error filtering, pair assembly and error correction next-generation sequencing reads. *Bioinformatics.* 2015 Nov 1;31(21):3476-82
104. Herbert A, Mbunkah HA, Bertagnolio S, Hamers RL, Hunt G, Inzaule S et al. Low-abundance drug-resistant HIV-1 variants in antiretroviral drug-naïve individuals: A systematic review of detection methods, prevalence, and clinical impact. *J Infect Dis.* 2019 Dec 6. pii: jiz650. doi: 10.1093/infdis/jiz650..
105. Hoffman NG, Seillier-Moisewitsch F, Ahn J, Walker JM, Swanstrom R. Variability in the human immunodeficiency virus type 1 gp120 Env protein linked to phenotype associated changes in the v3 loop. *J Virol* 2002 Apr;76(8):3852-64.
106. Lengauer T, Sander O, Sierra S, Thielen A, Kaiser R. Bioinformatics prediction of HIV coreceptor usage. *Nat Biotechnol.* 2007 Dec;25(12):1407-10.
107. Smith DM, Kingery JD, Wong JK, Ignacio CC, Richman DD, Little S J. The prostate as a reservoir for HIV-1. 2004;AIDS 18:6–8.
108. Zhang, H, Dornadula G, Beumont M, Livornese L Jr, Van Uiter B, Henning K et al. Human immunodeficiency virus type 1 in the semen of men receiving highly active antiretroviral therapy. *N. Engl. J. Med* 1998;339:1803–1809.
109. Delwart, EL, Mullins JI, Gupta P, Learn GH Jr, Holodniy M, Katzenstein D et al. Human immunodeficiency virus type 1 populations in blood and semen. *J. Virol* 1998;72:617–623.
110. Taylor S, van Heeswijk RP, Hoetelmans RM, Workman J, Drake S M, White DJ et al. Concentrations of nevirapine, lamivudine and stavudine in semen of HIV-1-infected men. *AIDS* 2000;14:1979–1984.

111. Ghosn J, Viard JP, Katlama C, de Almeida M, Tubiana R, Letourmeur F et al. Evidence of genotypic resistance diversity of archived and circulating viral strains in blood and semen of pre-treated HIV-infected men. *AIDS* 2004; 18(3) 447-457
112. Pillai SK, Good B, Pond SK, Wong JK, Strain MC, Richman DD et al. Semen-specific genetic characteristics of human immunodeficiency virus type 1 env. *J Virol* 2005;79(3):1734-42.
113. Jiao YM, Chen GL, Zhu WJ, Huang HH, Fu JL, Chen WW et al. Higher viral load and genetic diversity of HIV-1 in seminal compartments than in blood of seven Chinese men who have sex with men and have early HIV-1 infection. *Microbiol Immunol.* 2017 Jun;61(6):239-246.
114. Fernández-González M, García JA, Padilla S, García-Abellán J, Agulló V, Gutiérrez F et al. Rectal and seminal HIV-1 RNA decay towards virological suppression in infected MSM initiating dolutegravir/abacavir/lamivudine. *J Antimicrob Chemother.* 2020 Mar 1;75(3):668-674
115. García-Payá E, Fernández M, Padilla S, García JA, Robledano C, de la Tabla VO et al. High-grade anal intraepithelial neoplasia is associated with HIV-1 RNA rectal shedding in virologically suppressed MSM. *AIDS.* 2018 May 15;32(8):1017-1024.

ARTÍCULO

López Zúñiga MÁ, Chueca N, de Salazar A, et al Genetic diversity of HIV in seminal plasma remains higher than in blood after short-term antiretroviral therapy Sexually Transmitted Infections Published Online First: 03 April 2020. doi: 10.1136/sextrans-2020-054439

Genetic diversity of human immunodeficiency virus in seminal plasma remains higher than in blood after short-term antiretroviral therapy

López-Zuñiga MA¹, Chueca N², de Salazar A², Fernández-Caballero JA², Gutierrez-Valencia A³, Vinuesa García D⁴, Omar Mohamed-Balghata M⁵, Hidalgo Tenorio C⁶, López-Ruz, MA^{6,7#}, García F^{2,7#}

1 Internal Medicine Service. Hospital Universitario de Jaén. Jaén, Spain.

2 Microbiology Department. Hospital Universitario San Cecilio. 3 Infectious Diseases Service. Hospital Virgen del Rocío. Sevilla, Spain

4 Infectious Diseases Service. Hospital Clinico San Cecilio, Granada, Spain.

5 Infectious Diseases Service. Hospital Universitario de Jaén. Jaén, Spain.

6 Infectious Diseases Service. Hospital Virgen de las Nieves.

7 Instituto de Investigación Ibs.Granada. Granada, Spain.

These authors contributed equally to the paper

Abstract

Objective: To provide insight on viral kinetics and genetic diversity of human immunodeficiency virus in seminal plasma at baseline and one month after initiating antiretroviral therapy (ART).

Patients and methods: Blood and seminal samples from newly diagnosed HIV patients were obtained before ART initiation (T0) and one month after ART initiation (T1). HIV *env* genetic diversity was studied using deep sequencing Nextera and V3 chemistry in a MiSeq Illumina platform. The number of viral quasispecies (5% cutoff) and Shannon Index were used to analyse diversity.

Results: Forty-seven ART-naive patients were recruited between September 2016 and November 2018. At enrolment, the number of quasispecies in blood [median 4 (IQR 2-5)] was lower than in the seminal compartment [median 6, (IQR 4-8)] ($p<0.01$); the Shannon Index was also higher ($p<0.001$) in the seminal compartment than in blood (1.77 vs 0.64). At T1, for the 13 patients with detectable HIV in both blood/seminal plasma, viral diversity remained higher ($p=0.139$) in seminal plasma [median 2 (IQR 1-4.5)] than in blood [median 1 (IQR 1-1.5)] Integrase inhibitors (INI)-based regimens achieved higher levels of undetectability and led more frequently to lower variability ($p<0.001$) than protease inhibitors (PI) or non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTI).

Conclusion: We provide here further evidence of a larger genetic diversity in seminal plasma, both at diagnosis and short term after ART initiation. Our results strengthen previous findings on HIV diversity in seminal plasma. In addition, INI decrease variability more rapidly than PI and NNRTI in both blood and seminal plasma.

Key words: Genetic diversity, human immunodeficiency virus, HIV, seminal plasma, semen, blood, antiretroviral therapy, quasispecies, variability.

Key messages:

1. There is a greater viral HIV diversity in seminal plasma than in blood before treatment.
2. There is a greater viral HIV diversity in seminal plasma than in blood one month after treatment.
3. Integrase inhibitors decrease the viral load in seminal plasma more rapidly than protease inhibitors or nonnucleosides, regardless of the viral load found before starting treatment.

Introduction

Infection with the human immunodeficiency virus (HIV) is one of the epidemics affecting the global population. Sexual route, followed by parenteral route, are the main transmission routes of HIV, and semen is the vector responsible for majority of sexual transmissions globally. Currently, quantification of viral load in blood is used in clinical practice to assess therapy effectiveness and disease control. However, it is known that the kinetics of the HIV viral replication in the blood compartment differs from its kinetics in the seminal compartment. Several authors have reported the presence of viral DNA in seminal fluid with undetectable viral load in blood^{1,2}. The HIV DNA can be found in seminal leukocytes as nonintegrated with linear or circular form or as integrated provirus³. Nevertheless, cell-free HIV in seminal plasma seems to be actually infective¹, and infectivity is based on viral load. The presence of virus in this compartment can be intermittent, regardless of the time lapse from a negative result in the blood sample⁴. Similarly, seminal positive result for HIV RNA was found despite a negative result for HIV RNA was found in blood⁵.

Gene sequencing of proviral protease and DNA envelope genes has shown different variants in seminal plasma and blood¹.

The presence of HIV in seminal plasma seems to depend on various factors that may influence its presence in this compartment, even when it is undetectable in blood. Thus, the presence of a symptomatic sexually transmitted disease, such as acute urethritis⁶, cytomegalovirus infection⁷, or herpes simplex virus type 2⁸, increases the risk of HIV transmission without showing association with previous or asymptomatic urethritis. Similarly, seropositivity to herpes simplex virus type 2, the increase in

cytokines in seminal plasma, the increase in activation of mucosal T cells and the number of compartmentalised viral quasiespecies¹ seems to influence the presence of the virus in seminal plasma.

Time to virological suppression varies based on the ART regimen and compartment; being INIs and rilpivirine-based ART regimens the best ones in seminal plasma^{9,10} followed by protease inhibitors.

Despite the above described, the seminal compartment is not well understood to date. Therefore, in the present study we investigated viral kinetics and quasispecies in HIV-infected patients initiating antiretroviral therapy (ART).

Patients & Methods

Inclusion criteria and Ethics Statement

The inclusion criteria of our study were: male sex, HIV infected, ART-naive and over 18 years of age patients. All approached patients agreed to participate in the study. Before entering the cohort, ethics approval was obtained from the Ethics Committee of San Cecilio University Hospital in Granada (Spain) (1184-N-16). Patients signed a written informed consent to participate in the study. No patient had other sexually transmitted diseases at the time of this study.

Methods

Blood and seminal samples were obtained before ART initiation (T0) and one month (T1) after ART initiation. At diagnosis, age, sex, concomitant sexually transmitted infections, HIV viral load (RNA copies/mL), baseline resistance, and CD4 cell count (cells/ μ L) were recorded (retrieved from their medical records). Treatment regimen was recorded at the study entry (T0). HIV viral load, CD4 count and HIV env diversity were recorded at T0 and at T1.

All blood and seminal plasma were obtained by venipuncture and masturbation, respectively, and stored at -80 °C until transfer to the laboratory. Quantitative nucleic acid test for use on the Cobas[®] 6800/8800 Systems (Roche Diagnostics) with a limit of detection 20 copies/mL was used for HIV RNA viral load test in both blood and seminal plasma. The diversity of HIV was studied in all viraemic samples using an in house, deep sequencing protocol, using the Nextera and V3 chemistry in a MiSeq Illumina platform. We amplified a 500 bp of the HIV type 1 (HIV-1) *env* C2V3C3 region for these studies¹¹.

We selected *env* because this is the HIV gene with the largest variability^{12, 13, 14, 15}. Briefly, HIV RNA was extracted from blood and seminal plasma samples using the Magna Pure Compact System (Roche) following the manufacturer's instructions. This system is based on a magnetic-bead technology. RNA was eluted into 50 µL of the kit buffer from sample volumes of 400 or 1000 µL according to availability. Seminal plasma was obtained from semen samples by centrifugation at 2500 rpm for 10 min. After extraction, RNA was purified using Ampure Agencourt RNAClean XP (Beckman Coulter) before cDNA synthesis. Quantification was performed with a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, DE, USA). The nucleic acid yield was determined by measuring absorbance ratios spectrophotometrically. The measurement included A260/280 nm for protein contamination and A260/230 nm for salt and phenol contamination.

The Transcriptor One-Step RT-PCR (Roche) kit was used for cDNA synthesis. All PCRs were performed in 25 µL reaction volumes containing 12.5 µL 2X KAPA HiFi Hotstart ready mix (KAPA Biosystems, Woburn, MA, USA), 5 µL of each forward and reverse primers (1 µM) and 2.5 µL of extracted RNA (10 ng). The PCR conditions were the following : initial denaturation at 95 °C for 3 min, followed by cycles of denaturation at 95 °C for 30 s, annealing at 55 °C for 30 s, and elongation at 72 °C for 30 s, with a final extension at 72 °C for 5 min. PCR clean-up was performed using AMPure XP beads (Beckman Coulter, Indianapolis, IN, USA) to purify the *env* amplicon away from free primers and primer dimer species. Then, the next step was the index PCR, which attaches dual indices and Illumina sequencing adapters using the Nextera XT Index Kit (Illumina, San Diego, CA, USA). The conditions of the second PCR were the following: 95 °C for 3 min; 8 cycles of 95 °C for 30 s, 55 °C for 30 s, 72 °C for 30 s; 72 °C for 5 min, and hold

at 4 °C. The pooled PCR products were purified using AMPure XP beads (Beckman Coulter, Indianapolis, IN, USA) before quantification. The resulting amplicons were sequenced at MiSeq Platform (Illumina, San Diego, CA, USA), using a paired-end (2x300nt) sequencing system. All experiments were run on an equimolar concentration of amplicons.

The FASTA files obtained were demultiplexed to obtain a FASTA file for each sample and for the strand. Ugene tool¹⁶ was used for quality assessment of raw reads, which were assembled, aligned and screened based on the minimum length of 200 bp and a maximum length of 500 bp. Sequences were filtered and chimera were removed using Usearch¹⁷, accepting only those with Q>30 and a seed cluster of 30. Finally, the number of quasispecies in each sample was investigated using BLAST. Only the quasispecies representing more than 5% of the population were recorded; this limit was used to skew any method error, since this is the standard limit for resistance analysis¹⁸.

The diversity of the HIV quasispecies was calculated using the Shannon Index as previously reported¹⁹ using the entropy tool from Los Alamos HIV (https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/ENTROPY/entropy_one.html). This numerical score is a representative number and relative frequency of the HIV quasispecies found in each sample.

We were able to investigate HIV viral tropism using the HIV genotopheno tool²⁰ because our *env* fragment encompassed the V3 loop. The number and location of potential N-linked glycosylation sites (PNGSs) for each sequence were estimated using the N-GLYCOSITE web tool from the Los Alamos HIV database (<http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/GLYCOSITE/glycosite.html>).

Normality of the variables has been analysed using the Shapiro-Wilks test for the statistical analysis. Baseline characteristics are expressed as proportions for categorical variables and as medians and interquartile ranges (IQR) for continuous variables. Mann-Whitney U non-parametric test has been used to compare differences in the number of quasispecies between blood and seminal plasma. Wilcoxon test was used for the differences in the number of quasispecies before and after therapy. Wilcoxon test was applied, correcting the p value obtained by the number of comparisons, to analyse whether the decrease in the number of quasispecies was significant based on the type of regimen. Pearson chi-square test was used for qualitative variables. To correlate the number of quasispecies with initial viral blood load (T0) and the nadir CD4 T-cell count, the Spearman's correlation coefficient was used. A $p < 0.05$ was considered significant. Data has been analysed using the IBM SPSS software Statistics 19.

Results

Forty-seven ART-naive HIV-infected patients from the different participating locations (Virgen del Rocio University Hospital, Virgen de las Nieves University Hospital, San Cecilio University Hospital and Jaén University Hospital) were recruited for the study between September 2016 and November 2018. Patients had a median age of 30 years, a mean viral load of 29,2513 copies (log 4.56), and a mean CD4 count of 494 cells/ μ L. At enrolment (T0), 4 patients (8.51%) had clinical signs of acute HIV infection, 6 (12.8%) patients initiated a non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTI)-based regimen, 10 (21.3%) patients initiated a PI-based regimen, and 31 (65.6%) patients initiated an INI-based regimen. Table 1 shows the baseline characteristics of the patients.

	n=47
Age ^a (years)	30 [26-41]
Acute HIV Infection, n (%)	4 (8.51%)
Viral load (Log copies/mL) ^a	4.48 [3.98-5.06]
CD4 count (cells/ μ L) ^a	494.5 [301.75-641.5]
HIV Treatment, n (%)	
NNRTI-based	6 (12.8%)
PI-based	10 (21.3%)
INI-based	31 (65.6%)
Previous Infections	
Chlamydia	4 (8.7%)
Syphilis	9 (19.1%)
Gonorrhoea	0 (0%)
HCV	2 (4.3%)
HPV	10 (21.3%)

Table 1. Baseline characteristics of patients. ^aMedian [interquartile range (IQR), 25th-75th percentile]; HCV: Hepatitis C Virus; HPV: Human papillomavirus; NNRTI: Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors; PI: Protease inhibitors; INI: Integrase Inhibitors.

At baseline, we were able to sequence 47 blood and seminal samples. The mean number of sequences studied in blood was 68,458 (range 58,307-79,352). The mean number of sequences studied in seminal plasma was 65,435, (range 54,675-73,669). Using the prespecified 5% cutoff, the number of quasispecies in blood was lower than in the seminal compartment ($p < 0.01$). In fact, a median of 4 (IQR 2-5) different quasispecies was found in the blood compartment, while a median of 6 (IQR 4-8) different quasispecies were found in the seminal tract. All patients except one showed a higher number of quasispecies in seminal plasma than in the blood compartment. No statistically significant differences in viral diversity were found between patients with and without acute HIV infection. Similarly, the Shannon Index was higher ($p < 0.001$) in the seminal compartment than in blood (1.77 vs 0.64). Patients were infected predominantly with CCR5 viruses (80.9% in blood and 83% in seminal plasma). Interestingly, we found a different tropism from blood to seminal samples in two patients. These data are shown in table 2.

	Blood n=47	Seminal plasma n=47	p
Quasispecies ^a	4 (2-5)	6 (4-8)	<0.001
Shannon Index ^a	0.64[0.41-1.01]	1.77[1.21-2.32]	<0.001
Tropism			0.789
CXCR4	9(19.1%)	8(17%)	
CCR5	38(80.9%)	39(83%)	
Sequences studied ^a	68,963[57,699-79,352]	62,577[54,335-73,669]	0.155

Table 2. Virological characteristics in blood and seminal plasma. ^a Median [IQR, 25th-75th percentile]. CXCR4: Chemokine receptor type 4; CCR5: Chemokine coreceptor type 5.

Secondary analysis showed no relationship between viral diversity in blood and initial viral load ($p = 0.196$), nadir CD4 T-cell count ($p = 0.119$) or acute HIV infection ($p = 0.594$). Similarly, no relationship was found between acute HIV infection and viral diversity in seminal plasma ($p = 0.652$). Likewise, in 11 patients for whom we could analyse the seminal viral load, no relationship was found between viral diversity and the initial viral load ($p = 0.382$).

To further characterise the evolution of viral diversity in both the seminal and the systemic compartment, we studied *env* quasispecies in 33 patients for whom paired T0 and T1 samples from blood and seminal plasma were available. Table 3 shows the number of viral quasispecies for each patient and the median of these values. At T1 (1 month after ART treatment), a significant decrease ($p < 0.001$) in both blood (T0: 3[2-5] vs T1: 0[0-1]) and seminal plasma (T0: 6[4-7.5] vs T1: 0[0-2]) was found. HIV-RNA was undetectable in both blood and seminal plasma in 16 patients (48.5%). Discordant results were found in 4/33 patients (12.1%) characterised by detectable HIV-1 RNA in the seminal plasma but undetectable HIV-1 RNA in the blood plasma.

Patient	T0		T1		Antiretroviral Regimen
	Blood	Seminal Plasma	Blood	Seminal Plasma	
1	3	6	1	2	TDF + FTC + RPV
2	5	7	0	0	TDF + FTC + RPV
3	4	6	1	1	TDF + FTC + RPV
4	1	3	1	1	TDF + FTC + RPV
5	2	4	1	2	TDF + FTC + DRV/rtv

6	4	7	2	4	TDF + FTC + DRV/rtv
7	7	10	3	6	TDF + FTC + DRV/rtv
8	3	4	1	1	TDF + FTC + DRV/rtv
9	4	5	1	1	TDF + FTC + DRV/rtv
10	2	3	0	0	TDF + FTC + DRV/rtv
11	5	8	0	0	TDF + FTC + EVG/c
12*	2	4	0	0	TAF + FTC + EVG/c
13	2	3	0	0	TAF + FTC + EVG/c
14	3	6	0	0	TAF + FTC + EVG/c
15	2	3	1	2	TAF + FTC + EVG/c
16	1	2	0	0	TAF + FTC + EVG/c
17	3	6	1	2	TAF + FTC + EVG/c
18	2	7	0	0	TAF + FTC + EVG/c
19	8	11	0	6	TAF + FTC + EVG/c
20	4	2	0	1	TAF + FTC + EVG/c
21	3	5	0	0	TAF + FTC + EVG/c
22*	7	11	3	5	TAF + FTC + EVG/c
23*	3	6	0	5	TAF + FTC + EVG/c
24	2	4	1	6	TAF + FTC + EVG/c
25	5	7	0	3	TAF + FTC + DRV/c
26	6	11	0	0	3TC + ABC + DTG
27	3	6	0	0	3TC + ABC + DTG
28	3	5	0	0	3TC + ABC + DTG
29	5	8	0	0	3TC + ABC + DTG
30*	6	9	0	0	3TC + ABC + DTG
31	1	2	0	0	3TC + ABC + DTG
32	4	8	0	0	3TC + ABC + DTG
33	2	4	1	1	3TC + ABC + DTG

López Zúñiga MÁ, Chueca N, de Salazar A, et al Genetic diversity of HIV in seminal plasma remains higher than in blood after short-term antiretroviral therapy Sexually Transmitted Infections Published Online First: 03 April 2020. doi: 10.1136/sextrans-2020-054439

Table 3. Number of viral quasispecies in each of the 33 patients from whom paired T0-baseline- and T1-1 month after baseline- blood and seminal samples were available. TDF: tenofovir disoproxil fumarate; FTC: emtricitabine; 3TC: lamivudine; TAF: tenofovir alafenamide; ABC: abacavir; RPV: rilpivirine; DRV/rtv: darunavir/ritonavir; DTG: dolutegravir; EVG/c: elvitegravir/cobicistat; DTG: dolutegravir. *Patients with acute infection. 0: undetectable viral load, no quasispecies were detected.

Patients treated with INI were more likely to reach undetectability in both blood and seminal plasma ($p < 0.001$) than patients treated with a PI or with an NNRTI-based regimen, even from viral blood loads (T0) higher than other regimens (INI 47,423 [4,502-339,750], IP 8,220 [4,730-42,700], NNRTI 46,300 [32,050-83,650]). Table 4 shows the quasispecies according to the prescribed treatment regimen regarding the 33 patients, we found that INI led to a decrease in the number of quasispecies in both samples ($p < 0.001$); this decrease was not found with PI nor with NNRTI. Regarding the number of quasispecies at T1 in the 13 patients with positive viral load in seminal plasma and blood, viral diversity remained higher in seminal plasma [median 2 (IQR 1-4.5)] than in blood [median 1 (IQR 1-1.5)] $p = 0.139$.

	n	T0 ^a	T1 ^a	P
Blood	33			
INI	22	3[2-5]	0[0-0.25]	<0.001
PI	7	4[2-5]	1[0-2]	0.051
NNRTI	4	3.5[1.5-4.75]	1[0.25-1]	0.327
Seminal Plasma	33			
INI	22	6[3.75-8]	0[0-2]	<0.001
PI	7	5[4-7]	2[0-4]	0.051
NNRTI	4	6[3.75-6.75]	1[0.25-1.75]	0.204

	n	T0 ^a	T1 ^a
Blood	33		
INI	22	3[2-5]	0[0-0.25]
PI	7	4[2-5]	1[0-2]
NNRTI	4	3.5[1.5-4.75]	1[0.25-1]
Seminal Plasma	33		
INI	22	6[3.75-8]	0[0-2]
PI	7	5[4-7]	2[0-4]
NNRTI	4	6[3.75-6.75]	1[0.25-1.75]

Table 4. Number of quasispecies according to the prescribed treatment regimen. ^aMedian [IQR, 25th-75th percentile].

Discussion

Understanding HIV viral genetic diversity in seminal plasma of HIV infected patients is of utmost importance to elucidate HIV sexual transmission. To our knowledge, our study is one of the largest studies analysing paired blood and seminal plasma samples from HIV-1 infected ART-naive patients. We found a consistent larger number and variability of HIV-1 *env* viral quasiespecies in seminal plasma than in blood by using deep sequencing. After starting first-line treatment, we also found that HIV-1 *env* viral diversity was higher in seminal plasma than in blood, and HIV remained detectable in seminal plasma in more patients than in blood.

Sexual contact is currently the main route of transmission of HIV-1. The male genital tract has been characterised as a reservoir^{21,22}, a compartment²³, and a drug sanctuary²⁴. HIV compartmentalisation and diversity in seminal plasma has been previously studied using various methodologies. Ghosn J et al²⁵ analysed the genotypic resistance pattern in HIV patients established on ART with a median of 7 previous antiretroviral treatments (range 3-15), showing different genotypic resistance patterns in the blood and genital compartments of six patients. Interestingly, phylogenetic analysis of clones of HIV protease gene showed that viral strains could originate from local production in seminal plasma. Pillai S et al²⁶ analysed HIV-1 *env* sequences derived from paired blood and seminal plasma samples from Los Alamos HIV Sequence Database, suggesting the male genital tract as a selective environment contributing to the genetic bottlenecks associated with the sexual transmission of HIV-1²⁶. In consistency with our study, Jiao YM²⁷ et al reported a higher genetic diversity of HIV-1 in the seminal compartments and blood of seven men who have sex with men (MSM) with early HIV-1 infection.

It is well known that HIV can remain positive in the seminal plasma after starting ART for longer periods than in blood^{10,28}. Du P et al³ described how amounts of HIV RNA and HIV DNA remained high in seminal plasma of HIV-infected Chinese patients after six months undergoing an ART, even when HIV RNA was undetectable in blood. In addition, we evaluated longitudinally the genetic diversity in the seminal plasma after one month of initiating first-line ART. To our knowledge, this is the first study reporting a higher genetic diversity in the seminal plasma even after initiation of first-line ART.

Similarly, several studies have addressed HIV-1 shedding in the rectal and vaginal tracts. Although using different methods and measures to address diversity, similarly to our study, HIV diversity was consistently higher in these compartments than in blood. García-Payá et al²⁹ reported a higher HIV-1 RNA rectal shedding in virologically suppressed MSM, suggesting that blood HIV-1 RNA measurements may not necessarily reflect the viral concentrations at the rectal reservoir. No certain explanation to the greater viral diversity in seminal plasma than in the blood is available to date; a possible cause could be a lower immune selection in the genitourinary tract compared to blood and, therefore, a lower purifying selection in the seminal plasma.

One of the major advantages of preventing HIV transmission are presented in the final report of the PARTNER study. In this study, Rodger AJ et al³⁰ suggested that the risk of HIV transmission in gay couples through condomless sex when HIV viral load is suppressed is effectively zero. Our findings in seminal plasma, along with the above-mentioned studies conducted in seminal plasma and in rectal mucosa must be interpreted with caution.

Our study has several limitations, being the short-term (1 month) follow-up its main limitation. Although our study was longitudinal, our follow-up was only extended one

month after ART initiation. Finding a larger variability in seminal plasma than in blood at this follow-up, despite being relevant, must not be interpreted as a caveat for HIV spread, especially after the results of the PARTNER study, where patients had been on ART for a median (IQR) of 4.3 (1.8–9.3) years. Together with the short-term follow-up, our sample size was also limited. Finally, although our study would have been strengthened if full-genome sequencing had been available, we chose the *env* gene, which in the absence of full-genome is the gold standard to study HIV variability.

Viral load in seminal plasma has been shown to become negative earlier after treatment with INI and rilpivirine than with PI⁹. The influence of the various therapeutic regimens on variation in the number of quasispecies in blood or seminal plasma is still unknown. In our study, we found a significant decrease in the number of quasispecies in T1 compared to T0 in both blood and seminal plasma with INI, but no significant decrease was found with PI nor with NNRTI.

In summary, we provide here strong evidence of a larger genetic variability in seminal plasma than in blood at diagnosis and short term after ART initiation. Our results strengthen previous findings on HIV diversity in seminal plasma. Furthermore, INI decrease the number of quasispecies more efficiently than PI and NNRTI in both blood and seminal plasma.

Acknowledgments

This study is part of the Ph.D. thesis of M.A. López Zúñiga, University of Granada, in Clinical Medicine and Public Health.

López Zúñiga MÁ, Chueca N, de Salazar A, et al Genetic diversity of HIV in seminal plasma remains higher than in blood after short-term antiretroviral therapy Sexually Transmitted Infections Published Online First: 03 April 2020. doi: 10.1136/sextrans-2020-054439

We acknowledge Nutraceutical Translations for English language editing of this manuscript.

Financial Disclosure

This paper has been funded in part by grants from Fondo de Investigación Sanitaria (www.isciii.es) (PI18/ 00819), Plan Nacional de I+D+I and Fondo Europeo de Desarrollo Regional-FEDER (www.redes/redes/inicio) (RD16/0025/0040).

The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Transparency declaration:

The authors have declared that no competing interests exist.

References

- ¹ Gupta P, Leroux C, Patterson B, Kingsley L, Rinaldo Ch, Ging Ming et al. Human immunodeficiency virus type 1 shedding pattern in semen correlates with the compartmentalization of viral quasispecies between blood and semen. *Journal Infectious Diseases* 2000; 182: 79-87
- ² Chéret A, Durier C, Mélard A, Ploquin M, Heitzmann J, Lécuroux C et al. Impact of early cART on HIV blood and semen compartments at the time of primary infection. *Plos One* 2017;12(7): e0180191
- ³ Du P, Liu A, Jiao Y, Liu C, Jiang T, Zhu W et al. HIV RNA and proviral HIV DNA can be detected in semen after 6 months of antiretroviral therapy although HIV RNA is undetectable in blood. *Microbiol Immunol* 2016;60: 187-195
- ⁴ Ferrarreto X, Estellat C, Damond F, Longuet P, Epelboin S, Yazbeck Ch et al. Timing of intermittent seminal HIV-1 plasma viral load under combination antiretroviral therapy. *Plos One* 2014;9 :e 88922.
- ⁵ López-Ruz MA, Navas P, López-Zúñiga MA, Gonzalvo MC, Sampedro A, Pasquau J et al. Effect of Monotherapy with Darunavir/Ritonavir on Viral Load in Seminal Fluid, and Quality Parameters of Semen in HIV-1-Positive Patients. *PLoS One*. 2016 Jul 21;11(7):e0159305.
- ⁶ Laga M, Manoka A, Kivuvu M, Malele B, Tuliza M, Nzila N et al. Non-ulcerative sexually transmitted diseases as risk factors for HIV-1 transmission in women: results from a cohort study. *AIDS*. 1993 Jan;7(1):95-102
- ⁷ Gianella S, Smith D, Vargas M, Little S, Richman D, Daar E et al. Shedding of HIV and human herpesvirus in the semen effectively treated HIV 1 infected men who have sex with men. *CID* 2013;57:441-447.
- ⁸ Looker KJ, Elmes JAR, Gottlieb SL, Schiffer JT, Vickerman P, Turner KME et al. Effect of HSV-2 infection on subsequent HIV acquisition: an updated systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis*. 2017 Dec;17(12):1303-1316.
- ⁹ Gutiérrez Valencia A, Benmarzouk O, Rivas-Jeremías I, Trujillo-Rodriguez M, Fernández-Magdaleno T, Viciano P et al. Viral kinetics in semen with different antiretroviral families in treatment-naive human immunodeficiency virus-infected patients: a randomized trial. *CID* 2017; 65: 551-56.
- ¹⁰ Fabrizio C, de Gennaro N, Volpe A, Scudeller L, Lagioia A, Falasca K et al. HIV-RNA decay in paired blood and semen samples of subjects receiving their first dolutegravir-based ART regimen. *Journal Clinical Virology* 2018;109:45-49.
- ¹¹ Villarreal JL, Gutiérrez J, Palacio L, Peñuela M, Hernández R, Lemay G et al. Characterization of HIV type 1 envelope sequence among viral isolates circulating in the northern region of Colombia, South America. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2012 Dec;28(12):1779-83.
- ¹² Rao M, Peachman KK, Kim J, Gao G, Alving CR, Michael NL et al. HIV-1 variable loop 2 and its importance in HIV-1 infection and vaccine development. *Curr HIV Res*. 2013 Jul;11(5):427-38.
- ¹³ de Camp A, Hraber P, Bailer RT, Seaman MS, Ochsenbauer C, Kappes J et al. Global panel of HIV-1 Env reference strains for standardized assessments of vaccine-elicited neutralizing antibodies. *J Virol*. 2014 Mar;88(5):2489-507.

-
- ¹⁴ Kitawi RC, Hunja CW, Aman R, Ogutu BR, Muigai AW, Kokwaro GO, Partial HIV C2V3 envelope sequence analysis reveals association of coreceptor tropism, envelope glycosylation and viral genotypic variability among Kenyan patients on HAART. *Virology*. 2017 Feb 14;14(1):29.
- ¹⁵ Hamoudi M, Simon-Loriere E, Gasser R, Negroni M. Genetic diversity of the highly variable V1 region interferes with Human Immunodeficiency Virus type 1 envelope functionality. *Retrovirology*. 2013 Oct 24;10:114.
- ¹⁶ Okonechnikov K, Golosova O, Fursov M; UGENE team. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics*. 2012 Apr 15;28(8):1166-7.
- ¹⁷ Edgar RC, Flyvbjerg H. Error filtering, pair assembly and error correction for next-generation sequencing reads. *Bioinformatics*. 2015 Nov 1;31(21):3476-82.
- ¹⁸ Herbert A, Mbunkah HA, Bertagnolio S, Hamers RL, Hunt G, Inzaule S et al. Low-abundance drug-resistant HIV-1 variants in antiretroviral drug-naïve individuals: A systematic review of detection methods, prevalence, and clinical impact. *J Infect Dis*. 2019 Dec 6. pii: jiz650. doi: 10.1093/infdis/jiz650.
- ¹⁹ Hoffman NG, Seillier-Moisewitsch F, Ahn J, Walker JM, Swanstrom R. Variability in the human immunodeficiency virus type 1 gp120 Env protein linked to phenotype-associated changes in the V3 loop. *J Virol* 2002 Apr;76(8):3852-64.
- ²⁰ Lengauer T, Sander O, Sierra S, Thielen A, Kaiser R. Bioinformatics prediction of HIV coreceptor usage. *Nat Biotechnol*. 2007 Dec;25(12):1407-10.
- ²¹ Smith DM, Kingery JD, Wong JK, Ignacio CC, Richman DD, Little S J. The prostate as a reservoir for HIV-1. 2004;AIDS 18:6–8.
- ²² Zhang, H, Dornadula G, Beumont M, Livornese LJr, Van Uitert B, Henning K et al. Human immunodeficiency virus type 1 in the semen of men receiving highly active antiretroviral therapy. *N. Engl. J. Med* 1998;339:1803–1809.
- ²³ Delwart, EL, Mullins JI, Gupta P, Learn GH Jr, Holodniy M, Katzenstein D et al. Human immunodeficiency virus type 1 populations in blood and semen. *J. Virol* 1998;72:617–623.
- ²⁴ Taylor S, van Heeswijk RP, Hoetelmans RM, Workman J, Drake S M, White DJ et al. Concentrations of nevirapine, lamivudine and stavudine in semen of HIV-1-infected men. *AIDS* 2000;14:1979–1984.
- ²⁵ Ghosn J, Viard JP, Katlama C, de Almeida M, Tubiana R, Letourmeur F et al. Evidence of genotypic resistance diversity of archived and circulating viral strains in blood and semen of pre-treated HIV-infected men. *AIDS* 2004; 18(3) 447-457
- ²⁶ Pillai SK, Good B, Pond SK, Wong JK, Strain MC, Richman DD et al. Semen-specific genetic characteristics of human immunodeficiency virus type 1 env. *J Virol* 2005;79(3):1734-42.
- ²⁷ Jiao YM, Chen GL, Zhu WJ, Huang HH, Fu JL, Chen WW et al. Higher viral load and genetic diversity of HIV-1 in seminal compartments than in blood of seven Chinese men who have sex with men and have early HIV-1 infection. *Microbiol Immunol*. 2017 Jun;61(6):239-246.

²⁸ Fernández-González M, García JA, Padilla S, García-Abellán J, Agulló V, Gutiérrez F et al. Rectal and seminal HIV-1 RNA decay towards virological suppression in infected MSM initiating dolutegravir/abacavir/lamivudine. *J Antimicrob Chemother.* 2020 Mar 1;75(3):668-674.

²⁹ García-Payá E, Fernández M, Padilla S, García JA, Robledano C, de la Tabla VO et al. High-grade anal intraepithelial neoplasia is associated with HIV-1 RNA rectal shedding in virologically suppressed MSM. *AIDS.* 2018 May 15;32(8):1017-1024.

³⁰ Rodger AJ, Cambiano V, Bruun T, Vernazza P, Collins S, Degen O et al. PARTNER Study Group. Risk of HIV transmission through condomless sex in serodifferent gay couples with the HIV-positive partner taking suppressive antiretroviral therapy (PARTNER): final results of a multicentre, prospective, observational study. *Lancet.* 2019 Jun 15;393(10189):2428-2438.

ANEXO

ANEXO I. Efectos secundarios tardíos de los antirretrovirales

Fármacos	Efectos adversos
<p>Tenofovir disoproxil fumarato (TDF) (Factores de riesgo: afectación renal u ósea previas, presencia de factores de riesgo convencionales, duración de la exposición a TDF, bajo peso y edad avanzada, uso de potenciadores como ritonavir o cobicistat)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Afectación tubular renal y descenso del filtrado glomerular. • Puede producir hipofosfatemia por tubulopatía proximal renal y déficit de vitamina D, • Disminución de la densidad mineral ósea. Puede aumentar el riesgo de osteoporosis y fracturas osteoporóticas • La sustitución de TDF por tenofovir alafenamida (TAF) disminuye marcadamente la toxicidad renal y ósea de tenofovir. • La sustitución de TDF por TAF se ha asociado con aumento de peso.
<p>Abacavir</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Se ha asociado a riesgo de infarto de miocardio en pacientes con alto riesgo cardiovascular, aunque este efecto clínico es controvertido.
<p>Inhibidores de la proteasa</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Pueden aumentar el riesgo de enfermedad cardiovascular por su efecto hiperlipemiante y quizás por otros efectos no bien conocidos • LPV/r y DRV/r se han asociado a un mayor riesgo de infarto de miocardio, • ATV puede producir hiperbilirrubinemia y excepcionalmente ictericia y colelitiasis. Es el único IP actual que no se ha implicado en un mayor riesgo de infarto de miocardio. La hiperbilirrubinemia de ATV se ha asociado a efectos cardiovasculares protectores • LPV/r y ATV/r se han asociado a un mayor riesgo de disminución del filtrado glomerular que podría deberse a la interacción con TDF cuando se administran concomitantemente • ATV/r y, en menor medida, DRV/r se han asociado ocasionalmente a litiasis renal • Los IP se han asociado a descensos en la densidad mineral ósea superiores a otros

	<p>fármacos en pacientes naive. Este efecto está mediado al menos en parte por la interacción con TDF</p>
Efavirenz	<ul style="list-style-type: none"> • Trastornos neuropsicológicos mantenidos, (aunque sean de bajo grado pueden resultar difíciles de tolerar a largo plazo) • Aumento del riesgo de suicidio • Se ha asociado a un mayor riesgo de deterioro neurocognitivo, aunque este efecto clínico es controvertido. En cultivos neuronales induce neurotoxicidad • Disminuye el nivel plasmático de 25-OH vitamina D, pero el significado clínico de este efecto es desconocido • Se ha asociado a ginecomastia, aunque este efecto clínico es controvertido • Se ha asociado a teratogenicidad en modelos animales y en alteraciones neurológicas fetales. EFV no es un fármaco de elección en las 8 primeras semanas de gestación: si la mujer está tomando ya EFV cuando queda embarazada es posible continuar su uso.
Rilpivirina	<ul style="list-style-type: none"> • La ficha técnica de RPV indica que puede asociarse a efectos adversos del SNC (ver Tabla 7), cuya frecuencia e intensidad clínica es muy inferior a la descrita para EFV.
Etravirina	<ul style="list-style-type: none"> • La ficha técnica de ETV indica que puede asociarse a efectos adversos del SNC (ver Tabla 7), cuya frecuencia e intensidad clínica es muy inferior a la descrita para EFV.
Doravirina	<ul style="list-style-type: none"> • La ficha técnica de DOR indica que puede asociarse a efectos adversos del SNC (ver Tabla 7), cuya frecuencia e intensidad clínica es muy inferior a la descrita para EFV.
Inhibidores de la integrasa	<ul style="list-style-type: none"> • Todos los INI disponibles se han asociado con efectos secundarios neuropsicológicos. Se han descrito más frecuentemente asociados a DTG. Los más frecuentemente descritos son insomnio,

	<p>cefalea, irritabilidad o ansiedad. Generalmente suelen ser leves y transitorios, aunque se han reportado casos que han obligado a la discontinuación.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Aunque los estudios de toxicología reproductiva no han mostrado ningún hallazgo relevante, DTG se ha asociado a un exceso de riesgo de defectos neurológicos en recién nacidos cuyas madres tomaron DTG en el momento de la concepción y se ha descrito un caso en el hijo de una paciente que inició DTG en la semana 8 de embarazo. • El tratamiento con INI, y particularmente con DTG, se ha asociado a una ganancia de peso, cuyo significado clínico se desconoce.
--	--

Anexo I. Efectos secundarios tardíos más característicos de los antirretrovirales más utilizados en la actualidad. Fuente: Grupo de Estudio de Sida de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas. Documento de consenso de Gesida/plan nacional sobre el Sida respecto al tratamiento Antirretroviral en adultos Infeccionados por el virus de la Inmunodeficiencia humana (actualización enero 2020) <http://gesida-seimc.org/category/guias-clinicas/> (Consultado el 14/03/2018). Tabla 8. Efectos secundarios tardíos más característicos de los antirretrovirales más utilizados en la actualidad; pág 116-117.