

**UNIVERSIDAD DE GRANADA**

**Departamento de Microbiología**



**TESIS DOCTORAL**

**INTERPRETACIÓN DE LA RESISTENCIA GENOTÍPICA DEL  
VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA. RELACIÓN CON  
EL SUBTIPO INFECTANTE**

**Silvia Carlos Chillerón**

**Granada 2007**









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

Certifican:

Que la Tesis Doctoral que presenta la Licenciada ***Silvia Carlos Chillerón*** “**INTERPRETACIÓN DE LA RESISTENCIA GENOTÍPICA DEL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA. RELACIÓN CON EL SUBTIPO INFECTANTE**” ha sido realizada bajo nuestra dirección, habiendo sido revisada y estando conformes con su presentación para obtener el grado de Doctor, siempre que así lo considere el tribunal que designe la Universidad de Granada.

Granada, abril de 2007

Fdo: María Carmen Maroto Vela

Fdo: Federico García García

Fdo: José Hernández Quero



**No es tanto lo que hacemos  
sino el amor que ponemos en lo que hacemos  
lo que agrada a Dios**

**Madre Teresa de Calcuta**









## ÍNDICE



<b>1. Introducción .....</b>	<b>1</b>
1.1. Antecedentes históricos .....	3
1.2. Clasificación .....	3
1.3. Estructura .....	4
1.4. Ciclo biológico .....	6
1.5. Evolución de los parámetros virológicos e inmunológicos .....	11
1.6. Variabilidad genética .....	12
1.6.1. Tasa de mutación .....	13
1.6.2. Cinética de replicación .....	14
1.6.3. Concepto de cuasiespecie .....	14
1.6.4. Eficacia biológica o <i>fitness</i> viral .....	16
1.7. Diversidad genética .....	16
1.7.1. Clasificación del VIH .....	16
1.7.1.1. Tipos .....	16
1.7.1.2. Grupos y subtipos .....	18
1.7.1.3. Formas circulantes recombinantes (CRFs) .....	19
1.7.2. Distribución geográfica del VIH .....	23
1.7.3. Técnicas para el estudio de la diversidad genética del VIH .....	26
1.7.4. Implicaciones clínicas y epidemiológicas de los subtipos del VIH .....	28
1.8. Fármacos antirretrovirales .....	30
1.8.1. Inhibidores de la transcriptasa inversa .....	32
1.8.1.1. Inhibidores de la RT análogos de nucleósidos .....	33
1.8.1.2. Inhibidores de la RT análogos de nucleótidos .....	34
1.8.1.3. Inhibidores de la RT no análogos de nucleósidos .....	34
1.8.2. Inhibidores de la proteasa .....	35
1.8.3. Inhibidores de la entrada .....	37
1.8.4. Nuevos fármacos .....	38
1.8.5. Combinaciones de antirretrovirales .....	39
1.8.6. Monitorización terapéutica de antirretrovirales .....	40
1.9. Fracaso virológico .....	42
1.10. Resistencia a los fármacos antirretrovirales .....	43
1.10.1. Dinámica de generación de resistencias .....	43
1.10.2. Mecanismos de resistencia .....	45

1.10.2.1. Resistencia a inhibidores de la RT análogos de nucleósidos	46
1.10.2.2. Resistencia a inhibidores de la RT no análogos de nucleósidos.....	52
1.10.2.3. Resistencia a inhibidores de la proteasa .....	53
1.10.2.4. Resistencia a inhibidores de la entrada .....	55
1.10.2.5. Resistencias celulares .....	56
1.10.2.6. Resistencia cruzada y multirresistencia.....	57
1.10.3. Métodos de laboratorio para la detección de resistencias .....	58
1.10.3.1. Técnicas genotípicas .....	59
1.10.3.2. Técnicas fenotípicas .....	63
1.10.4. Interpretación de las mutaciones de resistencia .....	67
1.10.4.1. Interpretación de las pruebas genotípicas .....	67
1.10.4.2. Interpretación de las pruebas fenotípicas .....	71
1.10.4.3. Correlación genotipo-fenotipo.....	72
1.10.5. Utilidad en la práctica clínica .....	74
1.10.6. Resistencia en subtipos no-B .....	77
<b>2. Objetivos .....</b>	<b>81</b>
<b>3. Pacientes y métodos .....</b>	<b>85</b>
3.1. Definición de algoritmos de interpretación .....	87
3.1.1. Pacientes .....	87
3.1.2. Métodos .....	92
3.1.2.1. Determinación de la carga viral .....	92
3.1.2.2. Detección e interpretación de mutaciones de resistencia.....	92
3.1.2.2.1. Procesamiento de la muestra: extracción del ácido nucleico .....	93
3.1.2.2.2. Amplificación del ácido nucleico: RT-PCR.....	94
3.1.2.2.3. Secuenciación bidireccional y electroforesis de los secuenciados .....	96
3.1.2.2.4. Alineamiento de las secuencias e interpretación de los resultados.....	99
3.1.2.3. Mutaciones estudiadas .....	100

3.1.2.4. Metodología estadística.....	100
3.2. Vigilancia epidemiológica de subtipos no-B .....	103
3.2.1. Pacientes .....	103
3.2.2. Métodos .....	106
3.2.2.1. Determinación del ARN viral.....	106
3.2.2.2. Detección de mutaciones de resistencia .....	106
3.2.2.3. Subtipado del VIH-1.....	107
3.2.2.4. Metodología estadística.....	107
<b>4. Resultados .....</b>	<b>109</b>
4.1. Desarrollo de algoritmos de interpretación de resistencia de VIH.....	111
4.1.1. Algoritmo de interpretación de resistencia de TENOFOVIR considerando la respuesta virológica a los 3 meses.....	111
4.1.2. Algoritmo de interpretación de resistencia de TENOFOVIR considerando la respuesta virológica a los 6 meses.....	114
4.1.3. Algoritmo de interpretación de resistencia de DIDANOSINA considerando la respuesta virológica a los 3 meses.....	118
4.1.4. Algoritmo de interpretación de resistencia de DIDANOSINA considerando la respuesta virológica a los 6 meses.....	122
4.1.5. Algoritmo de interpretación de resistencia de ESTAVUDINA considerando la respuesta virológica a los 3 meses.....	124
4.1.6. Algoritmo de interpretación de resistencia de ESTAVUDINA considerando la respuesta virológica a los 6 meses.....	127
4.1.7. Algoritmo de interpretación de resistencia de LOPINAVIR/RITONAVIR considerando la respuesta virológica a los 3 meses.....	130
4.1.8. Algoritmo de interpretación de resistencia de LOPINAVIR/RITONAVIR considerando la respuesta virológica a los 6 meses.....	133
4.1.9. Algoritmo de interpretación de resistencia de FOSAMPRENAVIR/RITONAVIR considerando la respuesta virológica a los 3 meses.....	137
4.1.10. Análisis multivariante .....	142
4.2. Epidemiología del VIH en Andalucía Oriental .....	146
4.2.1. Prevalencia de subtipos no-B y CRFs .....	146



4.2.2. Caracterización de la infección por subtipos no-B .....	148
4.2.2.1. Pacientes infectados por subtipos no-B .....	148
4.2.2.2. Polimorfismos en el gen de la proteasa de subtipos no-B .....	151
4.2.2.2.1. Mutaciones en el gen de la proteasa. Diferencias entre subtipos B y no-B .....	151
4.2.2.2.2. Efecto de los polimorfismos de subtipos no-B en las reglas de interpretación de resistencia .....	153
4.2.2.2.3. Estudio de polimorfismos en los distintos subtipos no-B...	158
<b>5. Discusión.....</b>	<b>159</b>
5.1. Interpretación de la resistencia de VIH basada en respuesta clínica ..	161
5.2. Vigilancia epidemiológica de subtipos no-B .....	182
5.2.1. Prevalencia de subtipos no-B y CRFs .....	182
5.2.2. Polimorfismos en el gen de la proteasa de subtipos no-B .....	189
<b>6. Conclusiones .....</b>	<b>197</b>
<b>7. Bibliografía .....</b>	<b>205</b>

## ABREVIATURAS UTILIZADAS

ABC: abacavir

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNc: ADN complementario

AMP: amprenavir

ARN: ácido ribonucleico

ATZr: atazanavir/ritonavir

AZT: zidovudina

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

ddC: zalcitabina

ddl: didanosina

dNTP: desoxinucleótido trifosfato

DRVr: darunavir/ritonavir

d4T: estavudina

EFV: efavirenz

FOSr: fosamprenavir/ritonavir

FTC: emtricitabina

HMX: homosexual

HTX: heterosexual

IDV: indinavir

ITIAN: inhibidor de la transcriptasa inversa análogo de nucleósido

ITINAN: inhibidor de la transcriptasa inversa no análogo de nucleósido

IP: inhibidor de la proteasa

LOPr: lopinavir/ritonavir

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

NFV: nelfinavir

NVP: nevirapina

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PR: proteasa

RT: transcriptasa inversa o retrotranscripción

SQVr: saquinavir/ritonavir

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

TARGA: terapia antirretroviral de gran actividad

TDF: tenofovir

TPVr: tipranavir/ritonavir

T-20: enfuvirtida

UDVP: usuarios de droga por vía parenteral

UPAM:

VIH: virus de la inmunodeficiencia humana

3TC: lamivudina

## **CÓDIGOS DE NUCLEÓTIDOS:**

A: Adenina

C: Citosina

G: Guanina

T: Timina

I: Inosina

R: A, G

Y: C, T

K: G, T

M: A, C

S: C, G

W: A, T

## **CÓDIGOS DE AMINOÁCIDOS:**

A: alanina

C: cisteína

D: ácido aspártico

E: ácido glutámico

F: fenilalanina

G: glicina

H: histidina

I: isoleucina

K: lisina

L: leucina

M: metionina

N: asparragina

P: prolina

Q: Glutamina

R: arginina

S: serina

T: treonina

V: valina

W: triptófano

Y: tirosina

## **1. INTRODUCCIÓN**



## 1.1 Antecedentes históricos

Los primeros retrovirus fueron identificados a principios del siglo XX, cuando varios investigadores identificaron en animales ciertos agentes transmisibles que eran capaces de producir leucemias y tumores.

En 1970 se descubre la transcriptasa inversa (RT) en estos virus, demostrando que el ciclo de vida de éstos incluye una forma intermedia de ADN, que denominaron provirus (Baltimore, 1970; Temin y Mizutani, 1970). La descripción de esta actividad retrotranscriptasa impulsa la búsqueda de retrovirus asociados a tumores humanos, lo que conduce a la caracterización de los virus de la leucemia de células T humanas (HTLV) I y II, en 1980 y 1982 respectivamente (Schüpbach, 2003).

El descubrimiento del virus del SIDA (síndrome de la inmunodeficiencia adquirida) fue un proceso complejo que se inició en 1983 con el aislamiento de un virus linfotrópico a partir de un ganglio de un paciente con una linfadenopatía al que denominaron virus asociado a la linfadenopatía (LAV), realizado por el grupo de Luc Montagnier (Barré-Sinoussi *et al.*, 1983). En ese momento no se pudo establecer el significado del hallazgo, pero más tarde Robert Gallo y su grupo identificaron un retrovirus en pacientes de SIDA, al que denominaron HTLV-III (Gallo *et al.*, 1983). El análisis de secuencias demostró que LAV y HTLV-III eran en realidad el mismo virus y en mayo de 1986 el Comité Internacional de Taxonomía Viral aceptó el nombre definitivo de virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) para este nuevo agente (Nájera, 2001). De esta manera se reconoció el agente causal del SIDA, proceso inmunodepresor de etiología desconocida hasta entonces característico de pacientes jóvenes, con infecciones oportunistas o tumores únicamente descritos previamente en pacientes trasplantados o neoplásicos con tratamiento inmunosupresor (Nájera, 2001).

En 1986, se describió en pacientes de África Occidental un virus relacionado antigénicamente con el anterior responsable de casos de SIDA en esa región, que se denominó VIH tipo 2, para diferenciarlo del inicial denominado VIH tipo 1. (Clavel *et al.*, 1986)

## 1.2 Clasificación

El VIH es un virus ARN perteneciente a la familia *Retroviridae*, género *Lentivirus*, como se detalla en la tabla 1.1. que recoge los distintos retrovirus patógenos para el hombre. Los lentivirus inducen enfermedades con largos periodos de incubación, por lo que reciben la denominación de virus lentos. Los retrovirus se caracterizan por poseer ARN como material genético en la partícula viral y ADN

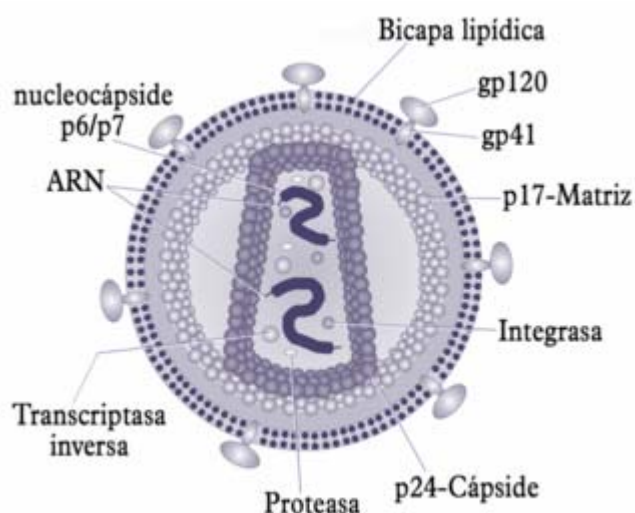
cuando se encuentran en la célula, cambio que tiene lugar por la acción de una enzima, la transcriptasa inversa, presente en la partícula viral.

**Tabla 1.1. Retrovirus patógenos humanos (ICTVdatabase, 2006)**

<b>FAMILIA RETROVIRIDAE</b>
<i>SUBFAMILIA ORTHORETROVIRINAE</i>
<i>GÉNERO DELTARETROVIRUS</i>
Virus linfotrópico de células T humana tipo 1 (HTLV-I)
Virus linfotrópico de células T humana tipo 2 (HTLV-II)
<i>GÉNERO LENTIVIRUS</i>
Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1)
Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 2 (VIH-2)
<i>SUBFAMILIA SPUMARETROVIRINAE</i>
<i>GÉNERO SPUMAVIRUS</i>
Espumavirus Humano (HFM)

### 1.3 Estructura

El VIH-1 está formado por una partícula esférica de 80 a 100 nm, constituida por una envoltura lípido-proteica derivada de la célula huésped donde se insertan las glucoproteínas en 72 proyecciones externas y antígenos de histocompatibilidad de clases I y II derivadas de las células huésped; y por una nucleocápside icosaédrica central denominada *core*, en cuyo interior se localiza el material genético y determinadas enzimas necesarias para el ciclo vital (figura 1.1).



**Figura 1.1. Estructura del VIH**

El genoma del virus es un ARN de cadena única formado por dos hebras idénticas de 9,8 Kb de polaridad positiva (Briones, 2005b). Posee tres genes estructurales principales, *gag*, *pol*, y *env*, y seis genes reguladores *nef*, *tat*, *rev*, *vpr*, *vif* y *vpu*. Además, en su forma de provirus, el genoma se encuentra flanqueado por unas secuencias repetidas (LTR) que le permiten la integración en el genoma celular, y en las que se localizan los elementos reguladores de la iniciación de la transcripción viral.

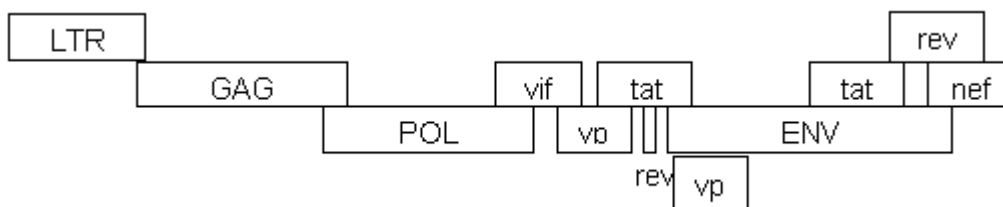


Figura 1.2. Genoma del VIH

Tabla 1.2. Proteínas estructurales del VIH-1 (Schüpbach, 2003)

Gen	Proteínas	Características y/o funciones
<i>gag</i>	p55. Precursora de:	<b>Antígenos de grupo internos</b>
	p17	Proteína de la matriz (MA), tapiza la superficie interna de la envoltura
	p24	Proteína de la cápside (CA), antígeno mayoritario
	p15. Precursora de:	<b>Proteínas de la nucleocápside (NC)</b>
	p9	Proteína unida al ácido nucleico
<i>pol</i>	P7	Proteína rica en prolina; ayuda a la encapsidación del virus
	p90. Precursora de:	<b>Enzimas</b>
	p66, p51	Transcriptasa inversa (RT) (ADN polimerasa-ARN dependiente)
	p15	RNasa H (RN), función endonucleolítica
<i>env</i>	p10	Proteasa (PR) rotura proteolítica para dar proteínas maduras
	P32	Integrasa (IN), integración del cADN viral
	gp160. Precursora de:	<b>Proteínas de la envoltura</b>
	gp120	Proteína de superficie, interacción con el receptor CD4.
	gp41	Proteína transmembrana, fusión de la envoltura del virus con la célula

Tabla 1.3. Proteínas reguladoras del VIH-1 (Schüpbach, 2003)

Gen	Proteínas	Características y/o funciones
<i>nef</i>	p27	<i>Pleiotrópica</i> , regulación negativa de CD4 y MHC-I; Interferencia en la infectividad de viriones
<i>rev</i>	p19	<i>Regulador de la expresión</i> de las proteínas virales (rotura y transporte de ARNm precursores). Transporte selectivo de ARNm en el citoplasma
<i>tat</i>	p14	<i>Transactivador</i> . Síntesis de ARNm
<i>vif</i>	p23	Proteína asociada a la <i>infecciosidad</i> del virión
<i>vpr</i>	p15	Transporte del complejo de preintegración al núcleo. Bloqueo del ciclo celular
<i>vpu</i>	p16	Aumenta la liberación de viriones de la célula infectada y reduce la acumulación de proteínas virales. Reduce la formación de sincitios y la muerte celular en células T humanas CD4.



Los genes *nef*, *rev* y *tat* son imprescindibles para la replicación viral. Los genes *vif*, *vpr* y *vpu* son genes reguladores menores que colaboran en la transcripción del genoma viral o en la infectividad y maduración de los viriones, pero que no son imprescindibles. El papel de otros genes, como *vpx* y *tev*, se encuentra menos definido.

#### **1.4 Ciclo biológico**

El virus atraviesa el epitelio dañado e infecta a las células de Langerhans y a las células dendríticas que se encuentran en el epitelio estratificado de la mucosa y submucosa vaginal, respectivamente. Estas células son presentadoras de antígeno y expresan en su superficie DC-SIGN y L-SIGN, una lectinas a las que se adhiere el virus y que son responsables de que el VIH sea transportado al tejido linfático por la migración de las células presentadoras de antígeno. Por otra parte, estas células y los linfocitos CD4 expresan CCR5, pero no CXCR4, ya que la elevada presencia de la quimiocina SDF-1, ligando natural del CXCR4, en las mucosas y el tejido linfático hace que este correceptor esté regulado de forma negativa y no se exprese, lo que explica la elevada susceptibilidad a la infección por cepas R5 en la infección aguda. La infección de estas células ya es evidente a las 24-72 horas de la entrada del virus. En las 24-48 horas siguientes las células dendríticas infectadas migrarán a los ganglios linfáticos regionales donde activarán e infectarán gran cantidad de linfocitos CD4, amplificando de forma explosiva la infección y producción viral. La carga viral se expande de forma exponencial y se alcanza el pico más elevado en plasma, secreciones genitales y otros compartimentos a las 4 semanas de la infección. Por lo tanto, en menos de una semana el virus se disemina por vía hematológica a todo el organismo (ganglios linfáticos, SNC, gónadas, sistema digestivo) de forma que cuando el paciente presenta síntomas, el virus ya está en todos los órganos y el reservorio viral, responsable de que el virus no se pueda erradicar, ya se ha establecido (Miró et al., 2004).

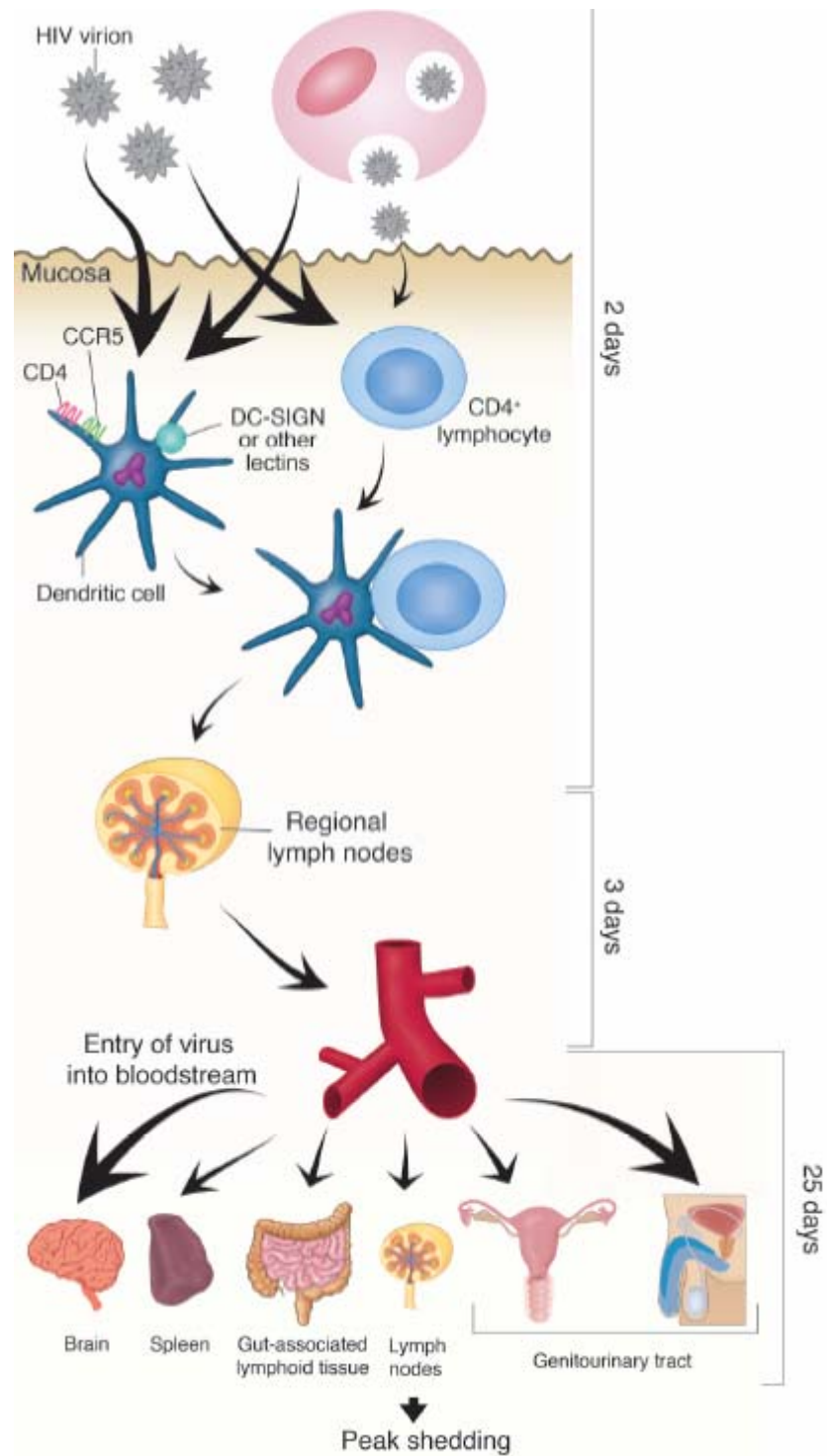


Figura 1.3. Proceso de infección por el VIH (Pilcher et al., 2004)

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

### Entrada: Interacción con los receptores, fusión e internalización

La entrada del virus en la célula es un proceso secuencial que se produce mediante la interacción con distintas moléculas situadas en la membrana celular. En primer lugar, el VIH se adhiere con alta afinidad a las lectinas DC-SIGN y L-SIGN de la superficie de las células dendríticas. Por este proceso se atrapan y concentran los viriones en la membrana plasmática, lo que facilita enormemente la propagación viral (la transmisión del VIH a los linfocitos CD4 tiene una eficacia muy superior a la capacidad infectiva de partículas virales solubles no unidas a estas lectinas) (Alcamí, 2004).

A partir de esta localización en la membrana de las células dendríticas, las partículas virales infectan a los linfocitos CD4 mediante la interacción con dos tipos de receptores. Por un lado, los receptores CD4, receptores específicos y comunes a todos los subtipos del VIH, presentes en la superficie de los linfocitos T colaboradores y en células de la estirpe mononuclear-fagocítica, lo que determina el tropismo viral por estos dos tipos celulares. Por otro lado, se observó que la presencia de la molécula de CD4 era condición necesaria pero no suficiente para permitir la entrada del VIH en la célula. Para que se produzca la fusión de membrana viral y celular, y la internalización de la nucleocápside viral es necesaria la presencia de unos correceptores, los receptores de quimiocinas CCR5 y/o CXCR4. Las quimiocinas son mediadores inmunológicos implicados en el reclutamiento de células durante la respuesta inmune. Los principales correceptores que utiliza el VIH-1 son CCR5 y CXCR4 y el uso de uno u otro correceptor define el tropismo de la cepa: cepas R5 con tropismo a macrófagos (CCR5), cepas X4 con tropismo a células T (CXCR4) y cepas R5X4 que pueden entrar en la célula utilizando cualquiera de los dos correceptores. Este tropismo está determinado por la presencia de ciertos aminoácidos en algunos dominios de la gp120, sobre todo en los dominios V3 y V2. Las cepas R5 o sincitiales son las principales implicadas en la transmisión y en las etapas tempranas de la infección, no detectándose en esos estadios cepas de tipo X4. Se ha demostrado que las células diana en las primeras etapas de la infección sólo expresan en receptor CCR5 en la membrana, mientras que el receptor CXCR4 se encuentra internalizado. En el avance de la infección, frecuentemente se desarrollan cepas con tropismo X4 o sincitiales o dual R5X4, que se relacionan con la depleción mayoritaria de linfocitos CD4, por tanto, supone un factor de mal pronóstico (Connor et al., 1997; Bermejo et al., 1998; Arrizabalaga et al., 2004; López-Aldeguer et al., 2005).

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

#### Transcripción inversa o integración viral

Una vez que se realiza el proceso de fusión entre las membranas viral y celular se liberan las dos hebras de ARN monocatenario dentro de la célula junto con las enzimas y proteínas del core. A continuación, una de las hebras de ARN viral se retrotranscribe por acción de la enzima transcriptasa inversa. Para la síntesis de una segunda cadena de ADN viral se requiere la acción de la ribonucleasa H, que degrada parcialmente el molde de ARN original, así se genera un ADN de doble cadena. Una vez sintetizado, el ADN se acopla a una serie de factores celulares y virales (como la proteína vpr y la proteína de la matriz viral p17) formando lo que se denomina el complejo de preintegración. Este complejo es transportado al núcleo y se integra en el genoma celular mediante la acción de la integrasa viral, constituyendo la forma proviral del VIH.

Es probable que la integración del ADN viral no suceda de inmediato después de la retrotranscripción y que se almacene en el citoplasma de la célula, esto sucede en los linfocitos CD4 en reposo. Para que el ARN viral se transporte al núcleo y se integre en los cromosomas la célula infectada necesita ser activada. Existe, por tanto, un 90% de ADN proviral no integrado en los linfocitos circulantes, en forma lineal y episomal circular que constituye un reservorio potencial del VIH. Si el fenómeno de activación no se produce, el ADN no integrado es degradado por las ADNasas celulares.

### Etapas tardías. Reactivación y replicación viral

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

El virus, para replicarse, primero se transcribe sintetizando ARN mensajero a partir del ADN proviral. Este ADN proviral, que se encuentra en los linfocitos CD4 de forma latente, precisa de una serie de factores celulares para iniciar la transcripción, entre los que destaca la familia de factores Rel/NF- $\kappa$ B/NF-AT. Este factor no existe en forma activa en los linfocitos CD4 en estado de reposo celular, y es inducido únicamente en el curso de los procesos de activación inmunológica, por lo que la replicación del VIH depende absolutamente de la activación de los linfocitos infectados.

La expresión genética temprana comprende la transcripción de los genes reguladores *tat*, *rev* y *nef* mientras que la tardía incluye los genes estructurales y enzimáticos codificados por *gag*, *pol* y *env*, así como los accesorios *vif*, *vpr* y *vpu*. El gen *tat* codifica una proteína que aumenta la tasa de transcripción del genoma del VIH y, en cooperación con otros factores celulares, permite la elongación completa del ARN mensajero del virus. Este es transportado al citosol y procesado en ARNs de distintos tamaños. La proteína *Rev* procesa y facilita el transporte de los ARNm del núcleo al retículo endoplasmático rugoso, donde son traducidos en proteínas por los ribosomas celulares.

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

## 1.5 Evolución de los parámetros virológicos e inmunológicos

El nivel de viremia plasmática, medido como carga viral, es el mejor marcador para predecir la progresión a SIDA, para la decisión del comienzo de la terapia antirretrovírica y para la monitorización del tratamiento. Cuanto mayor sea la carga viral en un determinado momento, mayor es el riesgo de progresión a SIDA.

El recuento de linfocitos CD4 tiene una menor capacidad para predecir el curso evolutivo de la enfermedad, se emplea como indicador del estado inmunológico en que se encuentra el paciente. Ayudará a determinar la posibilidad de desarrollo y tipo de infecciones oportunistas que pueden ocurrir en el enfermo. En todo momento, en el curso de la infección un aumento de la carga viral precede o coincide con una disminución en los niveles de linfocitos CD4.

En base a la evolución de los parámetros virológicos e inmunológicos en el curso de la infección VIH distinguiremos tres períodos: primoinfección, fase de replicación crónica y fase acelerada.

Durante la fase de primoinfección o infección aguda, que corresponde a un período de semanas que siguen al contacto con el VIH. El virus se disemina extensamente por los órganos linfoides. Existen unos altos niveles de viremia que se acompaña de forma paralela de una disminución en la cifra de linfocitos CD4 proporcional a la carga viral observada. Esto se debe a que el virus replica sin ningún control ya que aún no se ha constituido la respuesta inmunológica.

En 1985, Cooper et al publicaron la primera descripción de los síntomas atribuibles a la infección aguda por VIH. Se trataba de un cuadro compatible con una mononucleosis infecciosa (fiebre, faringitis, exantema), con serología negativa para VEB y con confirmación de infección por VIH. Desde entonces este síndrome se conoce como síndrome retroviral agudo, síndrome de seroconversión aguda, primoinfección por VIH o infección aguda por VIH. La clínica de la infección aguda varía desde cuadros banales hasta cuadros graves (Miró *et al.*, 2004).

Tras 4-6 meses desde el ingreso del virus en el organismo y en función de factores del huésped y del virus, se alcanzará una fase de equilibrio (set point virológico) que originará el inicio de la fase crónica. El período comprendido entre la infección aguda y la infección crónica se denomina infección reciente por VIH.

La fase de replicación crónica corresponde a un período asintomático que puede durar desde meses hasta más de 15 años. La viremia desciende de forma acusada hasta llegar a niveles indetectables coincidiendo con la estimulación del

sistema inmune. Persiste la replicación viral a bajo nivel en determinados reservorios del organismo dando lugar a niveles de carga viral muy bajos, ya que la respuesta inmune es incapaz de erradicar el virus del organismo. Los niveles de linfocitos CD4 permanecen relativamente estables aunque con tendencia a descender progresivamente, esta caída conduce a la aparición del SIDA cuando los niveles de linfocitos T son muy bajos, coincidiendo con un incremento de la cantidad de virus y células infectadas circulantes (O'Brien *et al.*, 1996).

Cuando se observa esta aceleración de la replicación viral, que se manifiesta con una elevación de la carga viral del paciente, empezará la fase acelerada o SIDA. A largo plazo, el virus y sus mecanismos de diversidad y evasión inmune superan la respuesta inmunológica y la capacidad de regeneración del sistema, por lo que éste es progresivamente destruido.

Pocos pacientes son diagnosticados durante la infección aguda por VIH, sin embargo, el diagnóstico de la infección en esta fase es muy importante por motivos epidemiológicos, inmunopatológicos y terapéuticos.

Desde el punto de vista epidemiológico es importante porque representa el período con mayores tasas de transmisión, debido a los elevados niveles de carga viral y la falta de uso de métodos barrera adecuados por el desconocimiento del diagnóstico. El diagnóstico en fase aguda es también útil para calcular el patrón de crecimiento de la infección en cada área geográfica y así optimizar la distribución de recursos destinados a prevención. Finalmente, permite conocer la tasa de transmisión de cepas resistentes a antirretrovirales (Miró *et al.*, 2004).

## 1.6 Variabilidad genética

La evolución de los seres vivos se basa en la capacidad de adaptación frente a los cambios ambientales, siendo los dos grandes principios que dirigen esta evolución la mutación y la selección natural.

Estos mismos principios son aplicables a la evolución viral, especialmente a los virus cuyo material genético es ARN o emplean ARN en algún punto de su ciclo replicativo, como es el caso del VIH. Son virus con una alta tasa de variabilidad e inestabilidad genética, que basan su estrategia adaptativa en una continua producción de mutantes a los que la selección conduce a su mantenimiento, expansión o extinción.

La capacidad adaptativa del VIH se fundamenta en la **alta tasa de error** de las enzimas implicadas en la replicación viral, la **elevada cinética de recambio viral** a

lo largo de toda la infección y en la **plasticidad de las proteínas virales** (estructurales y enzimáticas).

### 1.6.1 Tasa de mutación

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

La base bioquímica de la diferencia en tasas de error entre los genes virales y celulares es la presencia en las ADN polimerasas ADN-dependientes celulares de actividad 3'-5' exonucleasa (mecanismo corrector de pruebas o *proofreading*) que permite reconocer y eliminar los nucleótidos incorporados incorrectamente durante la polimerización. Los virus con genoma de tipo ARN, que utilizan para su replicación ARN polimerasas ARN-dependientes o ADN-polimerasas ARN-dependientes (retrovirus) carecen de esta actividad exonucleasa correctora de pruebas (Briones, 2005a).

Dado que el genoma del VIH tiene una longitud de unos 10.000 pares de bases, cabe esperar que haya 1 mutación en cada nueva hebra de ácido nucleico que se sintetice dando lugar a numerosas variantes genéticas distintas del virus (se ha estimado la presencia de entre  $5 \cdot 10^5$  y  $5 \cdot 10^{10}$  variantes genéticas dependiendo del estadio de la infección y de las variaciones entre individuos).

La velocidad de evolución no tiene por qué ser la misma en los distintos genes de un virus al poder estar las diferentes regiones genómicas víricas moduladas por un distinto grado de mutabilidad o de fuerzas selectivas. Así, por ejemplo, la tasa de divergencia es, al menos, doble para las proteínas de la envoltura (*env*) que para las internas, posiblemente debido a la presión selectiva de la respuesta inmune. Para el gen *env* se estimó una tasa de sustitución de nucleótidos entre  $3,2$  y  $15,8 \times 10^{-3}$ /sitio/año, para el gen *gag*, entre  $0,4$  y  $1,9 \times 10^{-3}$ /sitio/año, y para el gen *pol*, el más conservado, del orden de  $1,7 \times 10^{-3}$ .

En la variabilidad genética no sólo intervienen las mutaciones puntuales, sino también las duplicaciones, deleciones e inserciones, por recombinación homóloga (entre secuencias muy parecidas) y no homóloga (entre secuencias distintas).



### 1.6.2 Cinética de replicación

La capacidad replicativa viral se puede definir como la habilidad que tiene un virus de producir progenie infecciosa en un determinado ambiente u hospedador (Pumarola, 2005).

El VIH-1 posee una elevada tasa de replicación. Mediante el estudio de la cinética de replicación del VIH se ha demostrado que en un sujeto infectado no sometido a terapia antirretroviral se renuevan cada día del orden de  $10^9$  a  $10^{10}$  partículas virales, lo que conlleva la destrucción directa de  $10^7$  a  $10^8$  linfocitos CD4. Por tanto, tendrán un índice de recambio de 10 a 100 veces superior al fisiológico, lo que implica que en situación de equilibrio aproximadamente cada 15 días se remueva la totalidad de los linfocitos CD4 circulantes. Esta dinámica es continua, incluso en fases asintomáticas de la infección.

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

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

### 1.6.3 El concepto de cuasiespecie

Como consecuencia del proceso de variación genética las poblaciones de virus ARN estarán formadas por genomas víricos no idénticos pero genéticamente relacionados, denominados *cuasiespecies*. Las cuasiespecies se hallan sometidas a un continuo proceso de variación, competición y selección que permitirán al virus adaptarse rápidamente al huésped de acuerdo con el ambiente. Existe así una competición continua entre las variantes surgidas durante la multiplicación viral y la selección de las más eficaces desde el punto de vista replicativo.

En algunos casos, un genoma con una secuencia definida puede ser el mayoritario (secuencia *master* o secuencia maestra de la población). Será el que muestra mayor eficacia replicativa en el conjunto de mutantes y comprenderá las variantes más homogéneas y frecuentes.

Toda población de virus ARN presenta una secuencia definida estadísticamente, llamada secuencia promedio o consenso, que tiene en cada posición el nucleótido más frecuente del conjunto de moléculas de la población. Esta secuencia mayoritaria no necesariamente coincide con la secuencia promedio o consenso de la población.

En un ambiente constante puede darse un equilibrio poblacional mientras que las perturbaciones ambientales suelen disparar la rápida evolución viral.

En el organismo del hospedador se producen una serie de presiones selectivas, como es la respuesta inmune, que representa para el virus un cuello de botella que fuerza la selección de cuasiespecies con capacidad replicativa en presencia de esta presión.

De igual forma, el tratamiento antirretroviral supone una presión selectiva aplicada desde el exterior que afecta a la dinámica poblacional y selecciona variantes progresivamente resistentes a la medicación. En cada individuo infectado se producen al día del orden de  $10^{10}$  nuevos viriones, por lo que es fácil pensar que aparezcan cuasiespecies con mutaciones que confieran una menor susceptibilidad al fármaco presente en el organismo. Estas cuasiespecies permanecen a niveles bajos (**variantes minoritarias**) en la población vírica global hasta que surge la presión selectiva del tratamiento antirretroviral. Esta memoria evolutiva tiene un considerable número de implicaciones biológicas, incluida la posibilidad de reemergencia de virus ancestrales cuando se modifican pautas terapéuticas. La presión selectiva ejercida por los fármacos sustituirá a unas subpoblaciones sensibles por otras resistentes, pero sin eliminar por completo las primeras que permanecerán en algún reservorio, por lo que al cesar la presión por cambio de medicamento, pueden volver a predominar subpoblaciones sensibles.

Por tanto, el proceso de mutación y selección que conduce al desarrollo de resistencias es un buen ejemplo de evolución Darwiniana, en los cuales la evolución de las especies (cuasiespecies de VIH) es determinada principalmente por la supervivencia del mejor adaptado a un ambiente particular (tratamiento terapéutico).

Se ha demostrado que, a pesar de la exposición continua a múltiples variantes del VIH-1, los virus aislados de un mismo individuo están filogenéticamente

más próximos entre sí, es decir, la proximidad genética entre ellos es mayor que con las variantes de personas no epidemiológicamente relacionadas.

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

#### **1.6.4. Eficacia biológica o *fitness viral***

La eficacia biológica mide la capacidad que tiene una cuasiespecie de llegar a imponerse a otra en un proceso de replicación competitiva. Nos da una idea de la eficacia con la que un determinado genoma se adapta a una nueva circunstancia, a cualquier cambio ambiental que ocurra en el individuo infectado y que perturbe el equilibrio poblacional. En el caso de la presencia de antirretrovirales, prevalecerán no los virus más resistentes sino los que mejor se adapten y mantengan conjuntamente capacidad de resistencia y alto nivel de replicación.

La frecuencia de cada mutante en particular en la población vírica no sólo está determinada por la tasa de mutación en la posición considerada, sino también por su eficacia biológica (*fitness viral*) con respecto al resto de mutantes presentes en la cuasiespecie.

### **1.7 Diversidad genética**

#### **1.7.1 Clasificación del VIH**

##### **1.7.1.1. Tipos**

Se han identificado dos tipos de VIH, VIH-1 y VIH-2. El **VIH-1** es el más extendido, y es el responsable de la mayor parte de casos de infección por VIH en el mundo. El **VIH-2**, identificado en 1986, tenía en un principio una distribución limitada geográficamente al África Occidental. Actualmente hay descritos en Europa más de un millar de casos de infecciones por VIH-2 y desde que se detectaron en 1988 los primeros casos de infección por VIH-2 en España, hay registrados en nuestro país 138 casos hasta diciembre de 2005 (Toro y Soriano, 2006).

El VIH se originó en África como una zoonosis por el paso de un virus simio, el virus de la inmunodeficiencia del mono (SIV) del chimpancé común (SIVcpz→ VIH-1) o del sootey mangabey (SIVsm→ VIH-2) al ser humano (Peeters *et al.*, 2002). El mono es un animal de consumo en África y, como tal, se manipula su sangre sin las mínimas condiciones higiénicas, de ahí, la transmisión sanguínea mediante

inoculación accidental de sangre de mono a través de heridas en los manipuladores de alimentos.

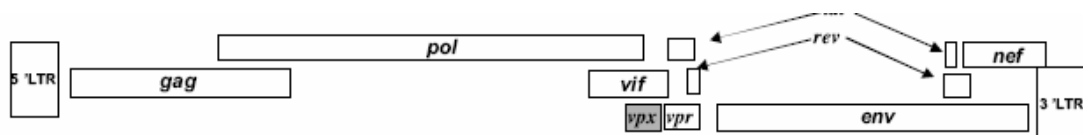
El origen zoonótico de estos virus se ha podido evidenciar por distintos factores: similitud en la organización genómica viral, relaciones filogenéticas, prevalencia en el reservorio natural, la coincidencia geográfica y las posibles rutas de transmisión.

El **VIH-2** fue el primer tipo para el que hubo suficiente evidencia para apoyar su origen zoonótico. En primer lugar, se vio que el VIH-2 compartía una estructura genómica idéntica con la de SIVsm; estaban relacionados filogenéticamente y no se podían separar en líneas filogenéticas diferentes según su especie de origen; por otra parte, los sooty mangabeys eran numerosos en muchos países de África occidental y se infectaban con SIVsm con frecuencia; existía coincidencia geográfica entre el hábitat natural del sooty mangabey y el área donde el VIH-2 es endémico; por último, el contacto humano con estos simios era frecuente.

Conocer el origen del **VIH-1** ha sido más difícil debido a que su relación con el SIVcpz no es tan evidente como la relación descrita para el VIH-2 con el SIVsm (Hahn *et al.*, 2000).

Figura 1.4. Estructura genómica de VIH-1, VIH-2 y SIV (Peeters *et al.*, 2002)

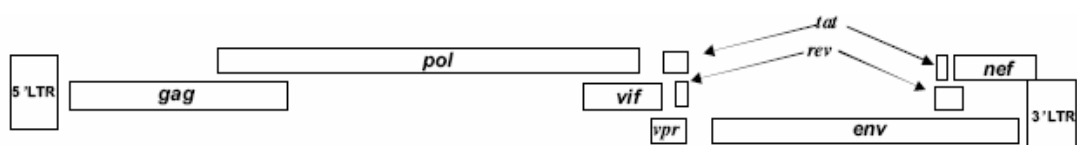
**VIH-2, SIVsm, SIVrcm, SIVmnd2**



**VIH-1, SIVcpz, SIVgsn, SIVmon, SIVmus**

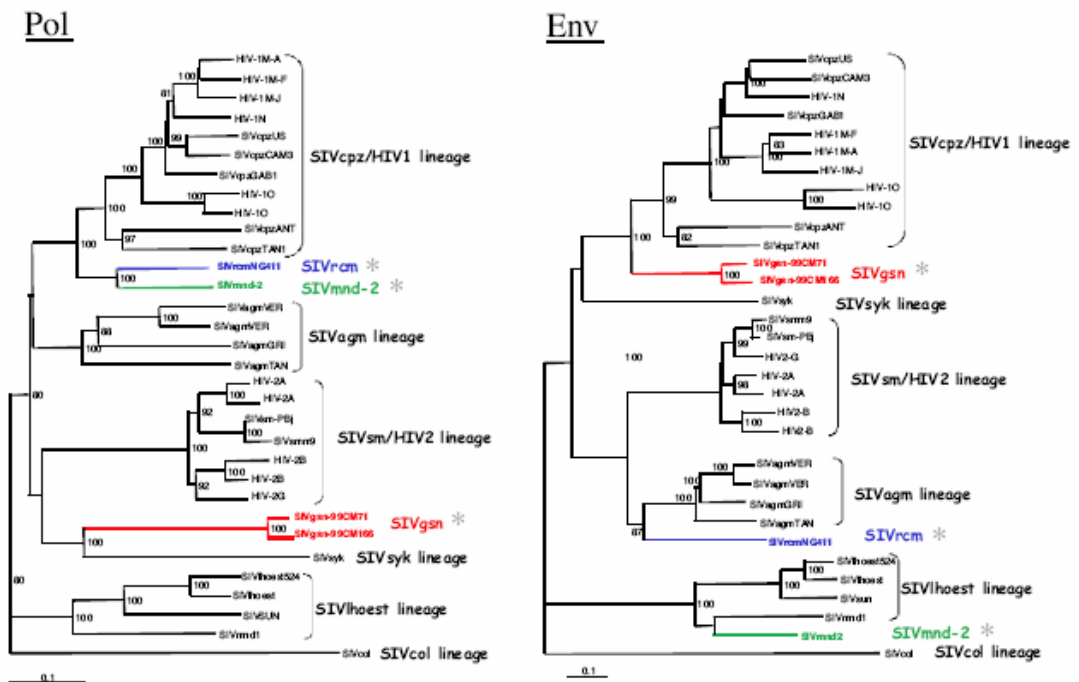


**SIVagm, SIVsyk, SIVmnd1, SIVhoest, SIVsun, SIVcol**



Basándose en comparaciones de secuencias completas de lentivirus procedentes de simios, éstas se clasificaron en 6 linajes principales, aproximadamente equidistantes, que se muestran en negro en la figura 1.5 (Peeters *et al.*, 2002).

Figura 1.5. Árboles filogenéticos resultantes del análisis de secuencias de *pol* y *env*



Ambos tipos de virus difieren en su epidemiología y en su historia natural. El VIH-2 parece ser menos patogénico y menos transmisible que el VIH-1. El VIH-2 presenta periodos de latencia clínica más largos, menores tasas de transmisión horizontal y vertical y el tiempo de supervivencia tras el diagnóstico de SIDA también es más prolongado en pacientes infectados por VIH-2 que en aquellos portadores del VIH-1.

### 1.7.1.2. Grupos y Subtipos

Como resultado de los análisis filogenéticos basados en sus secuencias génicas (principalmente en los genes *gag* y *env*), el VIH-1 se ha clasificado en tres grandes **grupos**: grupo **M** (*main* o principal), grupo **O** (*outlier* o lejano) y grupo **N** (no M, no O), cada uno con sus propias relaciones filogenéticas. La mayoría de las cepas de VIH-1 encontradas en los distintos países pertenecen al grupo M. Los grupos O y N presentan baja prevalencia, siendo mayoritariamente encontrados en África Central (Perrin *et al.*, 2003). En España, el primer caso de infección por grupo O encontrada data de 1996 (García-Lerma *et al.*, 1996) y hasta julio de 2005 se han registrado únicamente 5 casos de infecciones por grupo O y ninguna por VIH-1 del grupo N (Holguin *et al.*, 2005).

No se han descrito epidemias por VIH-1 grupo O o VIH-2 semejantes a las causadas por VIH-1 grupo M, posiblemente por la reducida capacidad replicativa y de transmisión de VIH-2 y VIH-1 grupo O. Esto parece contribuir a la baja prevalencia de

infección por éstos, así como a su limitada extensión geográfica (Arien *et al.*, 2005). El grupo M ha sido subdividido en varios **subtipos** (A-D, F-H, J y K), prácticamente todos equidistantes unos de otros. Incluso dentro del mismo subtipo se han distinguido **sub-subtipos**, A1, A2 y A3 dentro del subtipo A (Meloni *et al.*, 2004), así como F1 y F2 dentro del subtipo F. Los subtipos B y D se podrían considerar sub-subtipos de un único subtipo, sin embargo, por razones históricas es difícil cambiar esta designación (Peeters *et al.*, 2003).

Los aislados de los grupos O y N no han sido aun clasificados en subtipos. Para el VIH-2 se han descrito 8 subtipos (A-H), siendo el subtipo A y, en menor medida el B, los más frecuentes a nivel mundial (Holguin, 2005). Hasta que una cepa reúne los criterios para ser definida como un nuevo subtipo nos referimos a ella como U (*unclassified*, no clasificada).

Cuando se compara la secuencia nucleotídica del gen *env* dentro de un mismo subtipo los aislados varían del 2 al 20%. La divergencia genética oscila entre un 20 y un 30% entre distintos subtipos del grupo M, y en un 35% entre aislados del grupo M, O y N del VIH-1. Las secuencias nucleotídicas del VIH-1 sólo tienen un 50% de homología con las del VIH-2 (Robertson *et al.*, 2000).

### 1.7.1.3. Formas circulantes recombinantes (CRFs)

Se ha observado que, tras secuenciar genomas completos de aislados de VIH, algunos de ellos no pueden ser considerados subtipos puros sino recombinantes entre dos o más subtipos: virus recombinantes o mosaico. De hecho, más de la mitad de los aislados del VIH-1 estudiados hasta la fecha a nivel mundial en una región genómica lo suficientemente larga son recombinantes. Esta frecuencia probablemente se subestima al no analizarse genéticamente fragmentos largos del genoma de VIH en los aislados debido al mayor coste, tiempo y laboriosidad del proceso.

Estas formas recombinantes, llamadas CRFs (*circulating recombinant forms*), están taxonómicamente al mismo nivel que los subtipos del grupo M. Hasta el momento se han descrito 34 CRFs, cada uno designado por un número identificativo (relacionado con el orden cronológico de descubrimiento) y unas letras (colocadas alfabéticamente) que indican los subtipos que están presentes en su genoma. Si más de tres subtipos componen la forma recombinante se designará cpx (*complex*).

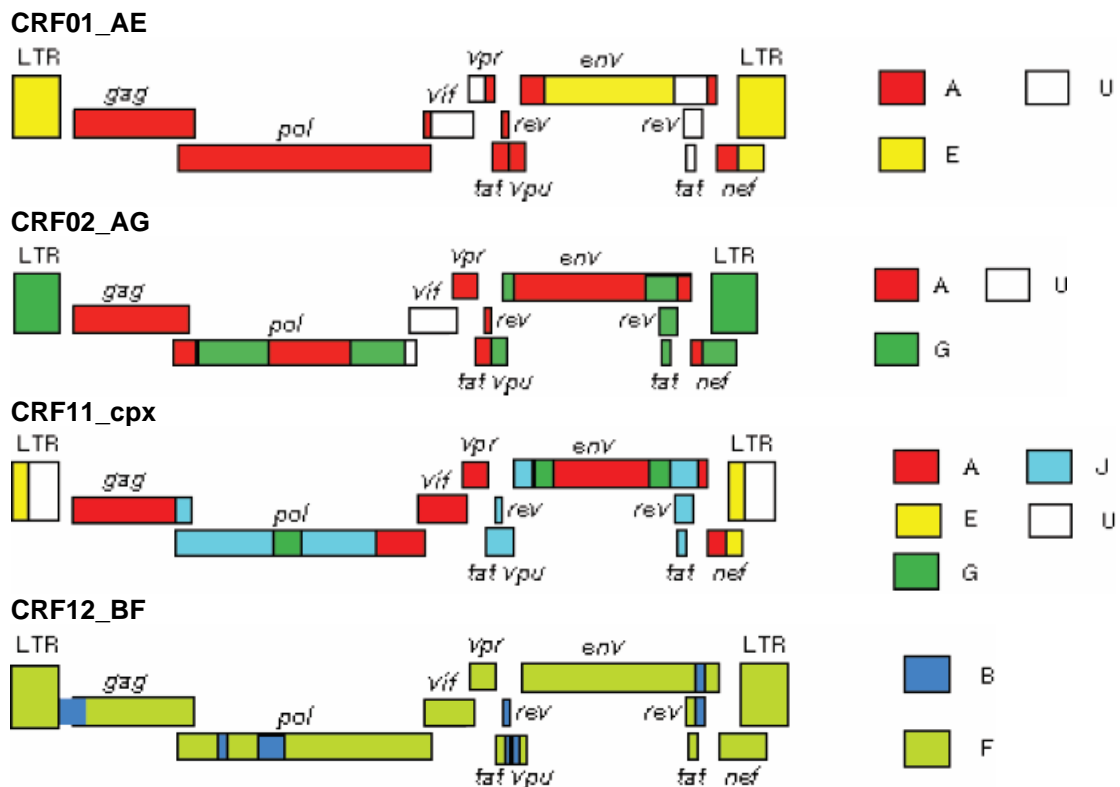


Figura 1.6. Representación esquemática composición genética de CRFs

La recombinación en el VIH sucede *in vivo* tras la infección simultánea por dos o más cepas de VIH genéticamente diferentes que cocirculan en una zona. Esta circunstancia puede suceder bien en un periodo corto tras la infección inicial (**coinfección**) o durante el curso de una infección ya establecida (**superinfección**) (Fang *et al.*, 2004; Gottlieb *et al.*, 2004).

Ocurre durante el paso de retrotranscripción y antes de la integración, cuando dos cepas diferentes del virus infectan a la misma célula (Clavel y Pomerantz, 2002). Los dos provirus parentales distintos han de integrarse en el mismo núcleo. La expresión simultánea y el empaquetamiento correcto del ARN viral generan una primera población heterocigota de partículas virales. La recombinación ocurre sólo tras la reinfección de esa primera generación de virus heterocigotos en nuevas células. Las dos hebras de ARN servirán de forma alternativa de molde para la síntesis del genoma proviral por la transcriptasa inversa generándose un virus recombinante (Quiñones-Mateu y Arts, 1999). Estos acontecimientos de recombinación se cree que se producen al azar, de esta manera, la recombinación puede producir partículas genómicas anómalas, viables o defectivas, generando mayores saltos evolutivos que los originados por mutaciones puntuales.

En la figura 1.7. se muestran los pasos requeridos para que se dé el proceso de recombinación (Valer *et al.*, 2003).

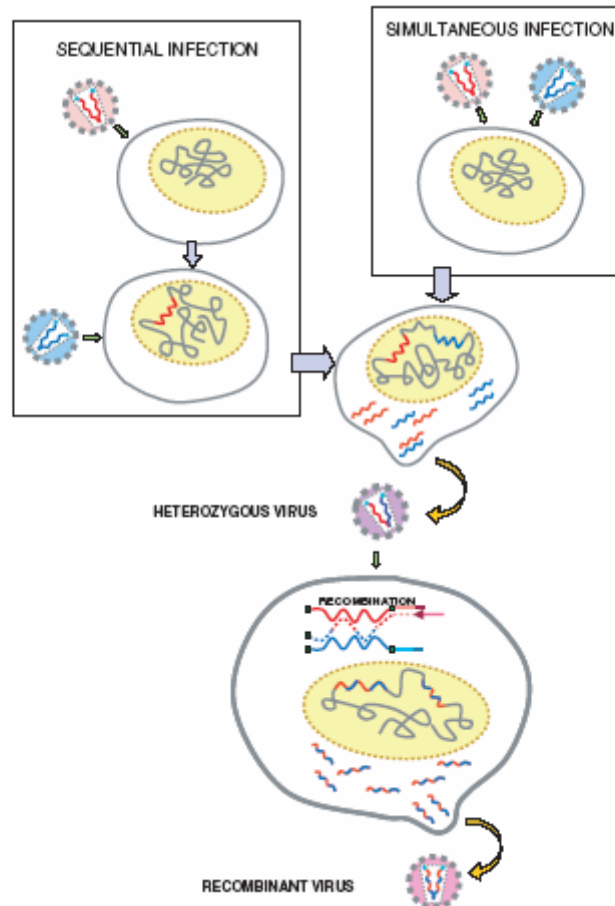


Figura 1.7. Coinfección, superinfección y recombinación en la infección por VIH

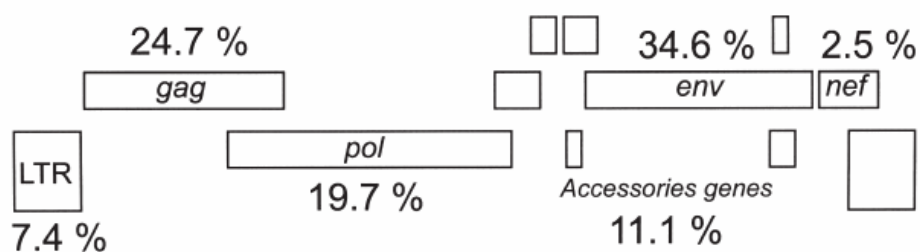


Figura 1.8. Porcentaje de puntos de recombinación por regiones genómicas del VIH-1 (Quiñones-Mateu y Arts, 1999)

No sólo existen recombinantes inter-subtipos, la recombinación entre variantes del mismo subtipo, intra-subtipo (Allen y Altfeld, 2003; Koelsch *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 2005; Requejo, 2006), también ocurre, sin embargo, la mayoría de métodos actuales no son capaces de llevar a cabo su correcta identificación



(Robertson *et al.*, 2000). También se han detectado recombinantes entre variantes de los grupos M y O del VIH-1 (Vanden Haesevelde *et al.*, 1994; Aghokeng *et al.*, 2004) y entre distintos CRFs. Se han descrito infecciones duales por VIH-1 y VIH-2, sin embargo, hasta ahora no se han encontrado recombinantes entre estos dos virus (Requejo, 2006).

Los genomas mosaico que no reúnen los requisitos necesarios para constituir un nuevo CRF se denominan **URFs** (formas recombinantes únicas o no clasificables) (Perrin *et al.*, 2003).

Para **definir un nuevo subtipo, sub-subtipo o CRF** se deben identificar cepas representativas en al menos 3 individuos sin ninguna relación epidemiológica. Preferentemente se requieren tres secuencias completas pero es suficiente tener dos secuencias completas junto con una parcialmente completa.

No se pueden asignar nuevos subtipos únicamente en base a secuencias subgenómicas, se requieren secuencias completas para esta nueva asignación. Las distintas cepas de VIH se agrupan dentro del mismo grupo o subtipo independientemente de la región de su genoma que se analice.

Al analizar las regiones *gag* y *pol* de un virus, éste se agruparía dentro del subtipo A. Sin embargo, al estudiar la región *env* del genoma, ésta se clasificaría como un subtipo independiente, subtipo E. Por tanto, supone realmente una forma recombinante de subtipos A y E, éste último no existe como subtipo puro, se mantiene esta asignación únicamente para referirse a las regiones no-A en los recombinantes A/E. Igualmente, un aislado de VIH antiguamente clasificado como subtipo I en base a su secuencia de *env*, resultó ser una forma recombinante de A, G y regiones no agrupables dentro de ningún subtipo de los ya descritos, de manera, que la cepa catalogada originalmente como subtipo I, ha sido posteriormente denominada CRF04\_cpx.

Para denominar un nuevo grupo o subtipo se continuará alfabéticamente (P, Q, R...) o (L, M, N...) respectivamente.

### 1.7.2 Distribución geográfica del VIH

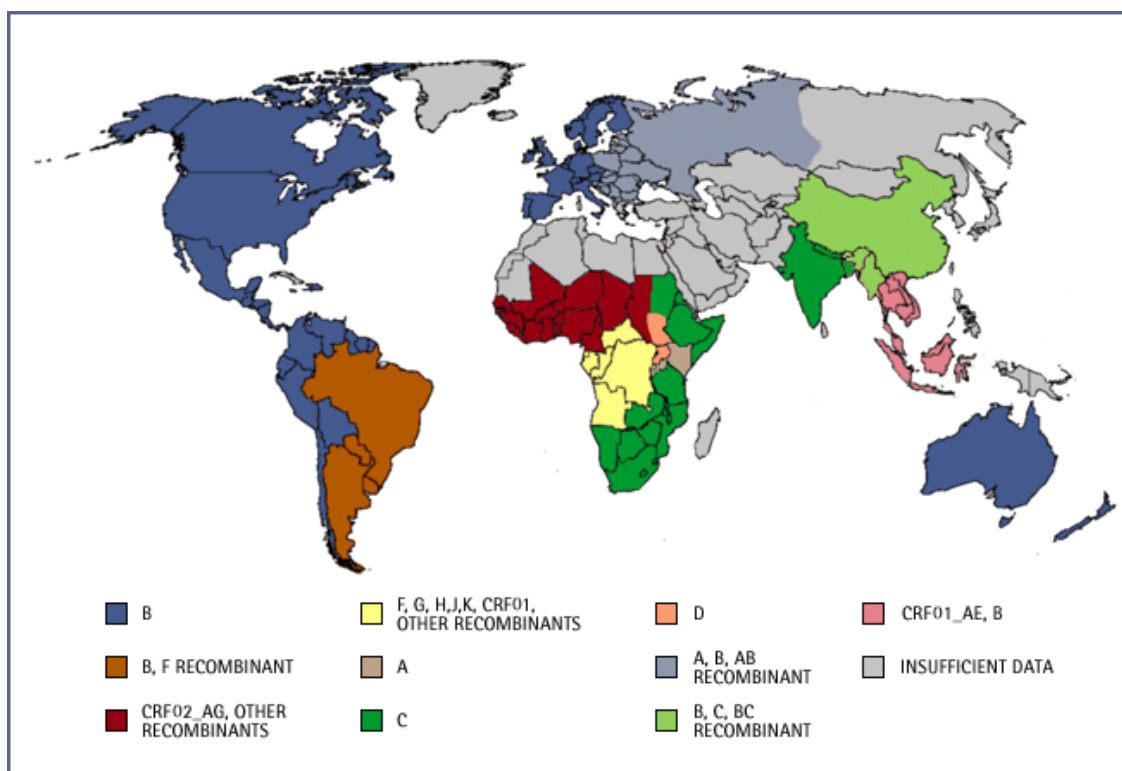


Figura 1.9. Distribución mundial de subtipos y principales CRFs (McCutchan, 2003)

Al comienzo de la epidemia ambos tipos, VIH-1 y VIH-2, eran igualmente prevalentes pero estaban geográficamente separados. El VIH-1 aparecía principalmente en la zona Este y Centro de África, mientras que el VIH-2 predominaba en África Occidental, produciendo un pico máximo a mediados de los 90, con una prevalencia del 10% en la población senegalesa (Gilbert *et al.*, 2003).

Se ha estimado que el origen del grupo M del VIH-1 se produjo en torno al año 1931 con un intervalo de confianza del 95% (1915-1941) (Korber *et al.*, 2000). No obstante, la primera evidencia de una infección por VIH-1 grupo M en el ser humano proviene del año 1959, en la República Democrática del Congo (Zhu *et al.*, 1998; Requejo, 2006). Un suero de esa fecha mostró la presencia de anticuerpos específicos, documentando así dicha infección (Nájera, 2001). Actualmente, las infecciones por VIH-1 del grupo M se han expandido mundialmente y múltiples variantes pueden cocircular en numerosos países (Geretti, 2006).

Las infecciones por grupo O son menos comunes, han sido endémicas en África Central y Occidental, así por ejemplo cepas de este grupo han sido responsables del 20% de infecciones por VIH-1 en Camerún (Ayoub *et al.*, 2001). Se han dado ya casos en Europa y Estados Unidos, la mayoría asociados con personas

que han tenido conexión con África Central y Occidental. En Europa la primera infección documentada data de comienzo de los años 60, probablemente causada por VIH-1 grupo O procedente de África Occidental (Jonassen *et al.*, 1997). Las infecciones por el grupo N se han identificado en África Central-Occidental, más concretamente en Camerún (Arien *et al.*, 2005).

A nivel mundial los subtipos A y C, junto con los CRFs AG y AE son las formas predominantes de VIH-1 grupo M. Al analizar la distribución geográfica en los distintos continentes, la mayor diversidad genética se encuentra en África, donde los subtipos A, C y el CRF02\_AG son los más frecuentes (Arien *et al.*, 2005), pero se encuentran cepas de todos los grupos, subtipos y CRFs (Holguin *et al.*, 2002). En Asia, el subtipo C y el CRF01\_AE son los predominantes. En América del Norte, Australia y Europa Occidental el subtipo B es el más común, a pesar de que en los últimos años ha aumentado la prevalencia de subtipos no-B y distintos CRFs (Fleury *et al.*, 2003; Herring *et al.*, 2003).

A pesar de que inicialmente cada subtipo ocupaba un área geográfica definida, actualmente los límites geográficos entre subtipos van desapareciendo, lo que favorece el aumento de las infecciones mixtas en países donde varios tipos de virus están presentes. Esto se debe al crecimiento exponencial que ha experimentado el fenómeno migratorio en los últimos años (Gascón, 2003).

Así, en España del total de los casos de SIDA diagnosticados desde el principio de la epidemia hasta 2004, menos del 3% eran originarios de otros países. En los últimos años el número de personas procedentes de otros países ha ascendido hasta cerca del 10% de la población residente en España. El origen de la inmigración legal en nuestro país es diverso: 32,93% son latinoamericanos, 24,9% africanos y 25,49% proceden de otros países de la Unión Europea (Castilla *et al.*, 2006).

**Tabla 1.4. Distribución geográfica del VIH (Thomson *et al.*, 2002b; Wainberg, 2004; Requejo, 2006; Los Alamos, 2007)**

Tipo	Grupo	Subtipos, CRFs y URFs	Distribución geográfica
VIH-1	Grupo M ( <i>main</i> )	9 Subtipos: A	África Occidental y Central, Europa Este
		B	Europa, Norteamérica, Australia
		C	África (Sur y Este), Asia
		D	África (Centro y Este)
		F	África (Centro), Sudamérica y Europa Este
		G	África Occidental
		H	África Central
		J	Centroamérica
		K	Congo y Camerún
		34 CRFs: CRF01_AE (A, E)	Asia
		CRF02_AG (A,G)	África Occidental y Central
		CRF03_AB (A,B)	Rusia y Ucrania
		CRF04_cpx (A,G,H,K,U)	Grecia y Chipre
		CRF05_DF (D,F)	Congo
		CRF06_cpx (A,G,J,K)	Burkina Faso, Mali
		CRF07_BC (B,C) (C/B/C)	China
		CRF08_BC (B,C) (B/C/B)	China
		CRF09_cpx (CRF02,A,U)	África Occidental
		CRF10_CD (C,D)	Tanzania
		CRF11_cpx (A,CRF01,G,J)	Rep. Democrática del Congo
		CRF12_BF (B,F)	Sudamérica (Argentina, Uruguay)
		CRF13_cpx (A,CRF01,G,J,U)	Camerún
		CRF14_BG (B,G)	España
		CRF15_01B (CRF01,B)	Tailandia
		CRF16_A2D (A2,D)	Kenia, Corea Sur, Argentina
		CRF17_BF (B,F)	Argentina
		CRF18_cpx (A1,F,G,H,K,U)	Cuba
		CRF19_cpx (A1,D,G)	Cuba
		CRF20_BG (B,G)	Cuba
		CRF21_A2D (A2,D)	Kenia
		CRF22_01A1 (CRF01,A1)	Camerún
		CRF23_BG (B,G)	Cuba
		CRF24_BG (B,G)	Cuba
		CRF25_cpx (A,G,U)	-
		CRF26_AU (A,U)	-
CRF27	-		
CRF28_BF (B,F)	Brasil		
CRF29_BF (B,F)	Brasil		
CRF30_0206 (CRF02, CRF06)	Niger		
CRF31_02A1 (CRF02,A1)	Brasil		
CRF32_06A1 (CRF06,A1)	Estonia		
CRF33_01B (CRF01,B)	Malasia		
CRF34_01B (CRF01,B)	Tailandia		
Múltiples URFs			
	Grupo O ( <i>outlier</i> )		África Central
	Grupo N ( <i>new</i> )		África Central
VIH-2		8 subtipos (A-H)	África Occidental

### 1.7.3 Técnicas para el estudio de la diversidad genética del VIH

Existen distintas metodologías para detectar la presencia de los subtipos del VIH, que se dividen en dos grupos: técnicas serológicas y técnicas genéticas:

#### **Técnicas serológicas**

Inmunoensayos enzimáticos usando péptidos sintéticos de V3 (PEIA, *peptide enzyme immunoassay*) (Murphy *et al.*, 1999).

El método más sencillo para seguir la epidemiología molecular de los subtipos es un ELISA diferencial basado en la unión de anticuerpos a péptidos derivados del dominio V3, principal sitio neutralizante de la glucoproteína gp120 de la envoltura vírica (Thomson *et al.*, 2002b). Los péptidos sintéticos representan las secuencias consenso de los subtipos A, B, C y D. Esta metodología no permite la detección de CRFs (Tatt *et al.*, 2001).

La diferenciación entre subtipos no es absoluta, por lo tanto, deben ir acompañados por análisis genéticos para un número reducido de muestras con reacción dudosa en el ELISA diferencial o para confirmar muestras representativas para los serotipos obtenidos en los análisis serológicos.

#### **Técnicas genéticas**

Ensayo de movilidad de los heterodúplex de ADN (HMA, *heteroduplex mobility assay*)

Es otra técnica sencilla y rápida para detectar y estimar la divergencia genética entre cepas del VIH (Manigart *et al.*, 2004). Está basada en la distinta movilidad que presentan en geles de poliacrilamida los heterodúplex de ADN que se forman entre secuencias relacionadas, la cual es proporcional a su grado de divergencia; cuanto más próxima es la relación entre las secuencias, más rápidamente migra el heteroduplex (Álvarez, 2002). Con este método se han podido clasificar un gran número de cepas procedentes de diferentes zonas del mundo en subtipos filogenéticos y CRFs, constituyendo una herramienta muy útil para acelerar la investigación epidemiológica (Barlow *et al.*, 2000; Manigart *et al.*, 2004).

Polimorfismo de los fragmentos de restricción (RFLP)

Esta técnica genética se basa en el polimorfismo de los sitios de restricción (RFLP, *restriction fragment length polymorphism*) (Tatt *et al.*, 2001). Se amplifican por PCR distintas regiones del genoma de VIH usando como molde ADN proviral extraído de linfocitos de sangre periférica infectados con VIH o procedentes de cultivo. A

continuación, se trata el material amplificado con enzimas de restricción específicas, cuyos sitios de corte tienen una secuencia determinada que aparecen sólo en algunos subtipos del VIH. Después del tratamiento con endonucleasas, el patrón de migración electroforética es visualizado en un gel de poliacrilamida. Las diferencias en la movilidad electroforética de los productos de la digestión permiten un reconocimiento rápido de los distintos subtipos. Si la infección es causada por virus de un subtipo solamente se detecta un único patrón de restricción, mientras que si existe una infección múltiple por distintos subtipos se observan varios patrones en un mismo individuo.

### Secuenciación

El análisis de secuencias genéticas virales completas es la técnica definitiva y más fiable para caracterizar su diversidad genética. Usando varias regiones de secuencias de los genes *gag*, *env* y *pol* obtenidas a partir de material amplificado por RT-PCR o PCR (según se utilice ARN viral o ADN proviral) se pueden construir árboles filogenéticos.

La **filogenética molecular** es un campo de estudio que utiliza datos moleculares como herramienta para establecer la conexión histórica entre organismos (Rodés, 2005). Estas relaciones evolutivas se representan gráficamente mediante árboles filogenéticos, que se utilizan en los estudios de VIH para determinar subtipos, identificar la cepa responsable de infección, monitorización de rutas de transmisión y para el seguimiento de la infección en distintas regiones geográficas.

El análisis filogenético empieza con la obtención de la secuencia del gen que se desea estudiar o la secuencia de aminoácidos correspondiente. Ésta se alineará con otras secuencias analizándose la similitud entre ellas. Para ello se alineará de manera que cada posición se compare con su homóloga en las otras secuencias. El programa *Clustal W*, por ejemplo, permite la realización automática de la alineación múltiple. Si coincide el mismo nucleótido se les llama bases apareadas, si no coinciden, se les llama desapareadas y, si hay una inserción o delección se les llama *gaps*, los cuales se representan con un guión.

Una vez obtenida la alineación de las secuencias, se lleva a cabo la construcción del árbol filogenético, que se puede realizar por tres métodos:

Matriz de distancias: La información filogenético se convierte en un número (distancia genética o evolutiva) que se calcula siguiendo algún modelo matemático.

Maximum likelihood (ML): Es un método estadístico que evalúa la probabilidad de que un determinado modelo evolutivo dé lugar a las secuencias observadas. El

programa construye todas las topologías del árbol posibles y calcula la probabilidad de cada una.

Maximum parsimony (MP): Elige la topología de árbol que requiere el menor número de cambios (mutaciones) para explicar las diferencias de nucleótidos observadas.

Cuando se observa un árbol filogenético, hay dos parámetros que hay que considerar: por un lado, la longitud de las ramas horizontales, que con relación a la escala utilizada, da el grado de divergencia de cada secuencia; por otro lado, cómo se agrupa cada secuencia da una idea de cómo se relaciona cada secuencia con las otras.

Una vez obtenido el árbol, hay que evaluar su fidelidad. Un árbol filogenético es simplemente un modelo o hipótesis. Métodos estadísticos nos permitirán determinar la credibilidad del árbol. El método del bootstrap es uno de los más utilizados y, por regla general, se considera que un valor de bootstrap superior al 70% otorga fiabilidad a la topología del árbol obtenido.

Para obtener secuencias de referencia a introducir en el análisis se puede acceder a alguna base de datos disponible en Internet (EMBL/GenBank/DDBJ/PDB).

#### **1.7.4 Implicaciones clínicas y epidemiológicas de los subtipos de VIH**

La alta tasa de variabilidad genética del VIH tiene importantes implicaciones en patogenicidad, transmisibilidad, diagnóstico, tratamiento y diseño de vacunas; con un impacto potencial en la epidemiología, terapia y prevención de la enfermedad. Por todas estas implicaciones, resulta esencial la caracterización de los subtipos genéticos del VIH-1 que circulan en cada área geográfica.

Los estudios sobre VIH se han centrado en el subtipo B, por ser éste el más prevalente en zonas económicamente más desarrolladas. Sin embargo, el número de infecciones por subtipos diferentes está aumentando.

Por tanto, se debe tener en cuenta que la presencia de subtipos no-B puede causar problemas en los resultados obtenidos con sistemas optimizados inicialmente para uso con subtipos B. De ahí la importancia de incorporar subtipos no-B en la optimización de técnicas de diagnóstico de VIH, tanto serológico (Tatt *et al.*, 2001; Aghokeng *et al.*, 2004) como molecular (Maes *et al.*, 2004).

En cuanto a las técnicas de PCR y la cuantificación de la carga viral, algunas de estas técnicas están basadas en el uso de *primers* diseñados tomando como referencia secuencias del subtipo B del VIH-1, por tanto, pueden surgir defectos en la

hibridación de la secuencia viral de subtipos no-B (Alaeus *et al.*, 1997; Jagodzinski *et al.*, 2000; Jenny-Avital y Beatrice, 2001; Swanson *et al.*, 2001). Esto origina una infravaloración de la carga viral (Damond *et al.*, 1999; Harris *et al.*, 2005) o un resultado falso negativo (Holguin *et al.*, 1999). Por tanto, resulta necesaria una evaluación y modificación periódica de esos métodos cuantitativos para obtener unos valores de carga viral reales en las personas con variantes genéticas del VIH distintas del subtipo B, otros tipos, grupos, subtipos o CRFs (Braun *et al.*, 2003).

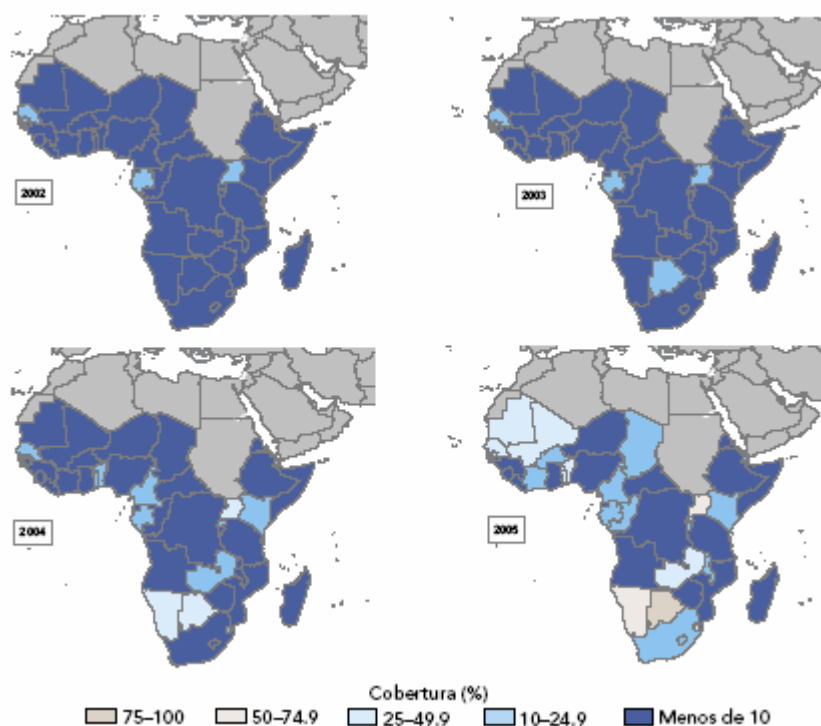
Con respecto a los tests para determinar la sensibilidad al tratamiento antirretroviral también deberían ser aplicables a todas las variantes del VIH, incluyendo todos los subtipos y CRFs. Sin embargo, actualmente aún existen problemas de detección de resistencia en subtipos no-B tanto para los ensayos genotípicos como fenotípicos (Fontaine *et al.*, 2001; Holguin *et al.*, 2003; Jagodzinski *et al.*, 2003; Maes *et al.*, 2004).

Respecto al tratamiento, se ha demostrado que los distintos tipos de VIH presentan diferencias de sensibilidad a los antirretrovirales. Así, por ejemplo, los NNRTIs son activos frente al VIH-1, mostrando muy poca actividad frente al VIH-2 o VIH-1 grupo O (Wainberg, 2003; Kantor y Katzenstein, 2004).

En el diseño de vacunas se deberían incluir epítomos conservados de los subtipos que circulan en la región donde se va a administrar, o de cepas que puedan dar neutralización cruzada, para que la protección sea más completa y eficaz.



## 1.8 Fármacos antirretrovirales



**Figura 1.10. Porcentaje de personas que siguen tratamiento antirretroviral en África subsahariana del total de las que lo necesitan, 2002-2005 (ONUSIDA 2006)**

El principal objetivo del tratamiento antirretroviral es evitar la replicación del VIH consiguiendo que la carga viral alcance niveles indetectables, siendo imposible hoy en día su total erradicación. La mejor forma de conseguir dicho objetivo es mediante el uso de terapia combinada con al menos tres drogas sin resistencias cruzadas entre sí (Lipsitch y Samore, 2002). Esto supondrá una barrera genética, farmacocinética y farmacodinamia difícil de superar para que el virus no pueda desarrollar resistencias.

La zidovudina o azidotimidina (ZDV o AZT), inhibidor de la transcriptasa inversa **análogo** de nucleósido, fue el primer fármaco antirretroviral utilizado, que se administró por primera vez en 1987 (Jordan *et al.*, 2002). Hasta 1995, la monoterapia o biterapia con análogos de nucleósidos eran los únicos tratamientos accesibles. En 1995 se aprobó el primer **inhibidor de la proteasa**, el saquinavir, seguido por un inhibidor de la RT **no análogo** de nucleósido, la nevirapina, que apareció en 1996. La aparición de estos nuevos fármacos supuso un gran cambio en la estrategia terapéutica del VIH: el **TARGA** (terapia antirretroviral de gran actividad) o ampliamente conocido en inglés como **HAART**, terapia combinada de al menos tres fármacos administrados a la vez (Cilveti-Sánchez *et al.*, 2005; Sanchez, 2006). Su uso ha reducido drásticamente la mortalidad y morbilidad asociada a la infección por VIH y ha

convertido a esta entidad en una enfermedad crónica y no necesariamente irreversible y mortal (Antela, 2006a). Sin embargo, siguen existiendo pacientes infectados por cepas de VIH multirresistentes muy difíciles de tratar para los cuales se ha planteado una nueva opción terapéutica de rescate, conocida como **mega-HAART** (Riera-Jaume *et al.*, 2006). Se trata de una terapia combinada no estandarizada de cinco o más fármacos, algunos de ellos usados previamente (Rubio *et al.*, 2002). Persigue la supresión completa de la replicación viral debido a la actividad antirretroviral que resulta del aumento en el número de fármacos consiguiendo sinergia en la actividad y aumento en los niveles farmacológicos (Miller *et al.*, 2000). Muchos clínicos han desechado su uso por su toxicidad y escasa eficacia (Miralles, 2006).

Actualmente existen 20 fármacos antirretrovirales que se agrupan en cuatro clases diferentes según su diana y mecanismo de acción, como muestra la figura 1.11.

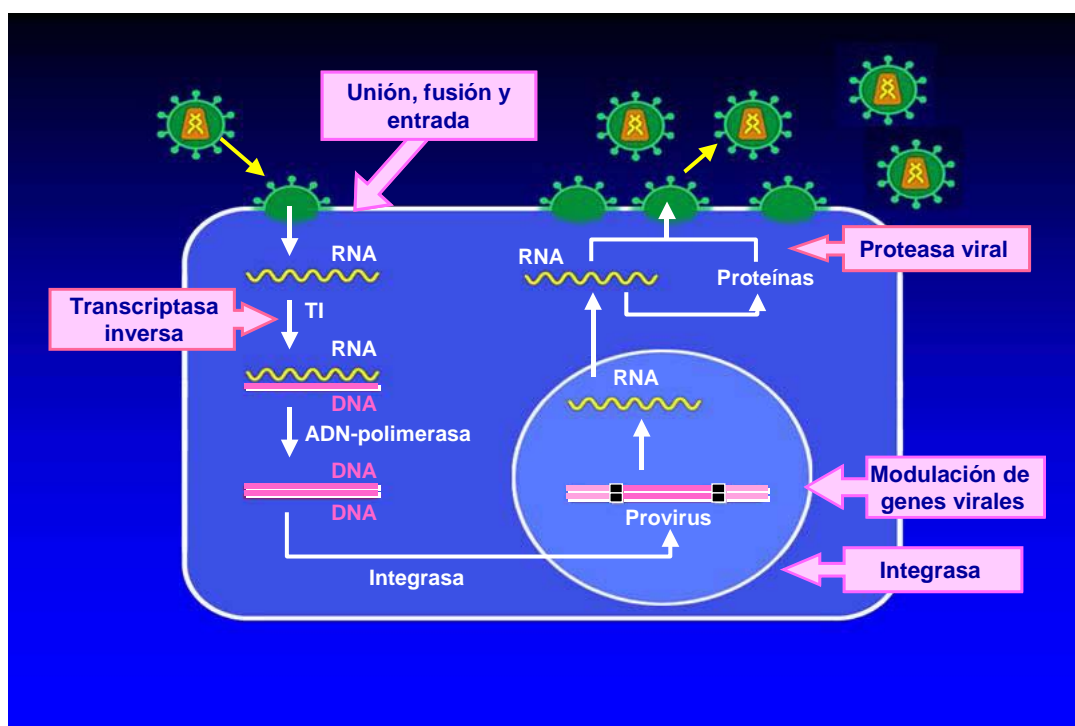


Figura 1.11. Puntos acción distintos ARV (López-Aldeguer *et al.*, 2005)

Las cuatro clases son: los inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos/nucleótidos (ITIAN o NRTI) que actúan como terminadores de la cadena en la transcripción inversa de ARN a ADN; los inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleótidos (ITINAN o NNRTI); los inhibidores de la proteasa (IP), enzima implicada en la maduración de las partículas víricas que se produce por el corte en las proteínas precursoras y, por último, los inhibidores de la entrada que bloquean la entrada de viriones en las células diana (Roca, 2003).

Tabla 1.5 Fármacos antirretrovirales cuyo uso está aprobado en España

<b>ITIAN (Análogos de nucleósidos)</b>	
Zidovudina	AZT
Didanosina	ddl
Zalcitabina	ddC
Estavudina	d4T
Abacavir	ABC
Lamivudina	3TC
Emtricitabina	FTC
<b>ITIAN (Análogos de nucleótidos)</b>	
Tenofovir	TDF
<b>ITINAN (No Análogos de nucleótidos)</b>	
Delavirdina	DLV
Efavirenz	EFV
Nevirapina	NVP
Etravirina	TMC 125
<b>IP (Inhibidores de la proteasa)</b>	
Saquinavir	SQV
Indinavir	IDV
Nelfinavir	NFV
Lopinavir/ritonavir	LPV/RTV
Amprenavir	AMP
Fosamprenavir	FPV
Atazanavir	ATZ
Tipranavir	TPV
Darunavir	TMC 114
<b>Inhibidores de la entrada</b>	
Enfuvirtida	T-20

### 1.8.1 Inhibidores de la transcriptasa inversa

La transcriptasa inversa o retrotranscriptasa (RT), es una enzima de gran importancia en el ciclo biológico del VIH. Sintetiza ADN utilizando como molde ARN (actividad ADN polimerasa ARN-dependiente) y degrada el ARN cuando éste se encuentra formando parte del complejo ARN-ADN (actividad RNasa H).

Es un heterodímero compuesto de dos subunidades denominadas p66 y p51. La subunidad p66 incluye el sitio activo de la enzima: el dominio polimerasa unido con el dominio RNasa H. Esta subunidad tiene una morfología peculiar en su región polimerasa que recuerda a una mano derecha con tres subdominios: dedos, palma y pulgar, que abrazarían a la doble cadena de ADN complementario. La subunidad p51 no tiene actividad enzimática pero sí contribuye a mejorar la estabilidad del complejo y su eficacia funcional.

Los inhibidores de la RT se clasifican en dos grandes grupos en base a sus características moleculares, que determinan mecanismos de inhibición distintos: los análogos de nucleósidos inhibidores de la RT (ITIAN) y los no análogos de nucleósidos inhibidores de la RT (ITINAN).

### 1.8.1.1. Inhibidores de la RT análogos de nucleósidos

Los ITIAN son estructuralmente semejantes a los nucleósidos naturales. Todos ellos requieren ser trifosforilados en el citoplasma celular por una fosfoquinasa antes de ser biológicamente activos. Una vez fosforilados, compiten con los dNTPs en su incorporación a la cadena de ADN sintetizada por la RT. Al carecer de un grupo hidroxilo en la posición 3' del azúcar, interrumpen el proceso de síntesis al no poder añadirse nuevos nucleótidos a la cadena de ADN sintetizada, son terminadores de cadena.

**Azidotimidina o Zidovudina (AZT, ZDV):** Fue sintetizada en 1964 como agente antineoplásico; su actividad antirretroviral no fue reconocida hasta 1985 y dos años después fue aprobada por la FDA para el tratamiento de pacientes con SIDA. Es un análogo estructural de la timidina que inhibe tanto el VIH-1 como VIH-2, aunque es menos activa frente al VIH-2 (Ribera *et al.*, 2004).

**Didanosina (ddI):** Es un análogo de una base púrica, la inosina. Fue el segundo fármaco que la FDA aprobó para el tratamiento de la infección VIH en 1991. Es un antirretroviral de alta barrera genética, es decir, la aparición de resistencias es más lenta e infrecuente que en otros fármacos de la misma familia (Ortega, 2005).

**Zalcitabina (ddC):** Análogo de la citosina comercializado desde 1992. Su uso actualmente es mucho menos frecuente que el de otros ITIAN.

**Estavudina (d4T):** Análogo de la timidina aprobado para el tratamiento antirretroviral en 1995 (Martín-Carbonero *et al.*, 2004).

**Abacavir (ABC):** Es un análogo de la guanosina, de estructura carbocíclica, diseñado específicamente para incrementar la potencia anti-VIH, la biodisponibilidad oral y la penetración en el SNC de los análogos de nucleósidos previos. La resistencia a este fármaco se desarrolla de forma lenta, requiriendo la acumulación de varias mutaciones (Antela *et al.*, 2004).

**Lamivudina (3TC):** Es un derivado sintético de la citosina que fue aprobado por la FDA para su uso en combinación en el tratamiento de la infección por VIH a finales de 1995. Es un fármaco que presenta una rápida aparición de un alto nivel de resistencias (Guardiola *et al.*, 2004).

**Emtricitabina (FTC):** Es un fármaco estructuralmente similar a lamivudina, aunque presenta una actividad *in vitro* frente al VIH-1 5-10 veces mayor que ésta. Inhibe de forma potente la replicación del VIH-1 y tiene también actividad frente al VIH-2, VHB, SIV y virus de la inmunodeficiencia felina. Los regímenes que contienen FTC se

asocian a una menor incidencia de resistencia que aquellos que contienen 3TC (Rivero *et al.*, 2004).

### 1.8.1.2. Inhibidores de la RT análogos de nucleótidos

La principal diferencia entre nucleósidos y nucleótidos es que estos últimos están parcialmente fosforilados y, por tanto, necesitan menos transformaciones en el organismo para actuar.

**Adefovir (ADV):** no se utiliza ya que su elevada toxicidad renal y potencia antirretroviral moderada llevaron a la FDA a interrumpir su desarrollo clínico.

**Tenofovir (TDF):** es un nucleótido análogo de la timidina activo frente a VIH-1, VIH-2, SIV y VHB. Se administra por vía oral como profármaco, tenofovir disoproxilo fumarato (Wolf *et al.*, 2003) que, una vez absorbido se convierte rápidamente en tenofovir, que es el que ejerce la acción antiviral. Se metaboliza intracelularmente mediante una doble fosforilación y es activo en células en división como en reposo, por lo que actúa en todas las fases del ciclo celular (Valencia-Ortega *et al.*, 2004).

Se considera un fármaco muy útil por su demostrada actividad frente a mutantes del VIH resistentes a los análogos de nucleósidos

### 1.8.1.3. Inhibidores de la RT no análogos de nucleósidos

Se trata de una serie de compuestos hidrofóbicos que no necesitan ser modificados por enzimas celulares para ejercer su acción, a diferencia de los anteriores, que requieren ser fosforilados en el citoplasma de las células diana para ser activos. No se incorporan a la cadena de ADN en formación, sino que actúan por unión no competitiva a un sitio hidrofóbico situado en un lugar cercano al centro catalítico de la enzima, en la subunidad p66. Este lugar adopta una morfología cóncava, en forma de bolsillo o bucle, estableciéndose una interacción hidrofóbica entre el fármaco y la enzima a través de dos zonas enfrentadas codificadas entre los codones 100-108 y 179-190. Impiden la polimerización del ADN debido a un cambio conformacional en su estructura, que no permite la colocación correcta del complejo molde-iniciador y su orientación con respecto al centro catalítico. Estos cambios provocan una restricción de movilidad del subdominio *thumb* (pulgar) que dificulta la translocación durante la polimerización.

No son activos frente a cepas del VIH-1 del grupo O ni frente al VIH-2. Su eficacia frente a diferentes subtipos no-B del VIH-1 está preservada. Así, por ejemplo,

algunas cepas de subtipo F se han descrito como menos sensibles a NNRTIs (Fonjungo *et al.*, 2002).

**Nevirapina (NVP):** Primer ITINAN comercializado en España. Es un fármaco de baja barrera genética lo que conlleva la rápida aparición de mutaciones de resistencia que provocan una pérdida completa de eficacia del mismo (Barreiro y Soriano, 2004).

**Efavirenz (EFV):** No tiene acción frente a las transcriptasas inversas animales o las del VIH-2 (Ferrer *et al.*, 2004).

**Etravirina (TMC-125):** es un ITINAN de segunda generación, eficaz tanto contra virus naïve como contra virus con prácticamente cualquiera de las mutaciones clásicas que confieren resistencia a los fármacos de este grupo, como K103N y Y181C. Es el primer no análogo con alta barrera genética y actividad en cepas con resistencia a los no análogos existentes (Roca, 2003).

### 1.8.2 Inhibidores de la proteasa

En el año 1986 se sugirió por primera vez que la enzima proteasa del VIH podría constituir un objetivo del tratamiento antirretroviral. Su importancia en la infectividad del VIH se observó en un estudio *in vitro* que mostraba que una única mutación eliminaba la actividad proteasa del VIH y bloqueaba la infectividad del virus (Rubio *et al.*, 2004).

En 1989 se caracterizó su estructura tridimensional: es un homodímero constituido por dos subunidades de 99 aminoácidos codificadas en el extremo 5' del gen *pol*. Consta de una **dominio central, hendidura o cleft substrate** que es la responsable de la unión al sustrato, de las poliproteínas del virus, *gag* (p55) y *gag-pol* (p160), las cuales son cortadas para producir las proteínas estructurales (p17, p24, p7, p6) y las enzimas esenciales (RT, integrasa, PR) necesarias para producir virus maduros. La parte superior de esta hendidura central está recubierta o tapada por una región de la proteína en forma de hélice, **tapadera o flap**. Esta parte es móvil, lo que permite con su desplazamiento la entrada de sustratos (poliproteínas) y la salida de las proteínas formadas.

Los inhibidores de la proteasa del VIH se han podido identificar gracias a las modernas técnicas de modelaje molecular, cristalografía y al conocimiento previo de fármacos antihipertensivos inhibidores de la renina, proteasa aspártica que comparte propiedades estructurales con la proteasa del VIH. Existen tres grandes clases de inhibidores de la proteasa de VIH: inactivadores enzimáticos, no-competitivos que destruyen el sitio catalítico pero no son muy selectivos y no se han desarrollado; los inhibidores de la dimerización, que impiden la unión de las dos mitades de la proteasa,

han demostrado actividad in vitro pero no han sido evaluados en la clínica; por último, los inhibidores que se utilizan en la actualidad son los que actúan como sustratos (Sued *et al.*, 2005).

En el desarrollo de los IPs se han encontrado ventajas, tales como su selectividad y potencia, e inconvenientes, como su baja biodisponibilidad por vía oral por la hidrofobicidad e insolubilidad que presentan.

En 1988 apareció la primera generación, que eran derivados peptídicos (por tanto, fácilmente destruibles en el tracto gastrointestinal), activos in vitro pero que no llegaron a pasar los estudios preclínicos. En 1992 se iniciaron los primeros ensayos clínicos en humanos con **saquinavir**, el primer inhibidor de la proteasa aprobado por la FDA en USA en 1995. En 1996, este organismo aprobó el uso clínico de **ritonavir**, inhibidor del complejo enzimático P450 que permite mantener unos niveles estables en sangre de los IPs, y el **indinavir**. Al año siguiente se introdujo el **nelfinavir**, primer fármaco de este tipo permitido para utilización pediátrica. En 1999 **amprenavir** y **lopinavir**, que al año siguiente ya aparecía en forma combinada lopinavir/ritonavir. Posteriormente, en 2003, se aprobaron **atazanavir** y **fosamprenavir** (Sued *et al.*, 2005). Por último, en junio de 2005 la FDA autorizó por primera vez el **tipranavir**.

**Ritonavir (RTV):** La potenciación de los IP, excepto el nelfinavir, con dosis bajas de este fármaco, que actúa inhibiendo la metabolización de los IP por el citocromo p450, proporciona unos valores mayores y más estables de los IP, disminuyendo el riesgo de resistencias e incrementando drásticamente su eficacia (Miralles, 2006).

**Amprenavir (APV):** Inhibidor de la proteasa de segunda generación (Dalmau, 2004).

**Tipranavir:** Inhibidor de la proteasa no peptídico, hecho que le confiere capacidad de inhibir la proteasa del VIH en presencia de múltiples mutaciones asociadas a los IP. Es decir, presenta una alta barrera genética, la mayor de todos los antirretrovirales disponibles actualmente, que es esencial en el rescate de pacientes que han fracasado con más de una combinación previa de antirretrovirales (Fortuny, 2006). El origen de esta elevada barrera genética se debe a las propiedades intrínsecas de la molécula que, por esta naturaleza no peptídica se une con una mayor flexibilidad al sitio activo de la proteasa pero también a la potenciación farmacocinética con ritonavir. Inhibe el procesamiento de las poliproteínas *gag* y *gag-pol*, impidiendo la formación de viriones maduros.

Posee actividad demostrada frente a un amplio grupo de VIH-1 del grupo M y de aislados de subtipos no-B (Dalmau-Juanola, 2006).

**Darunavir (TMC-114):** potenciado con ritonavir, ha comenzado su programa de acceso expandido.

### 1.8.3 Inhibidores de la entrada

La entrada del VIH dentro de la célula huésped es un proceso complejo que tiene lugar mediante interacciones secuenciales de las proteínas virales gp120 de la envuelta y gp41 transmembrana con el receptor celular CD4 y los correceptores CCR5 y/o CXCR4. Consecuentemente, existen distintos tipos de inhibidores de la entrada, fármacos que actúan sobre cualquiera de los pasos de entrada en la célula: **inhibidores de la unión, antagonistas de los correceptores e inhibidores de la fusión**. Sus dianas pueden ser cualquiera de las dos glucoproteínas (gp120 y gp41) así como sus correspondientes receptores o correceptores celulares: inhibidores del receptor CD4, inhibidores de los receptores de quimiocinas o inhibidores de la fusión del virus con la membrana celular (López-Aldeguer *et al.*, 2005).

La aparición de todos ellos supuso una grata noticia para todos los pacientes con opciones limitadas de tratamiento antirretroviral, al tratarse de fármacos de nuevas familias, con una estructura, un mecanismo y un lugar de acción totalmente diferentes de los antirretrovirales empleados hasta el momento (González, 2004). Por tanto, la resistencia al resto de antirretrovirales utilizados actualmente en la práctica clínica no compromete su actividad, permitiendo mejorar la eficacia de las combinaciones de rescate en pacientes que hayan desarrollado resistencia a fármacos de alguna de estas familias.

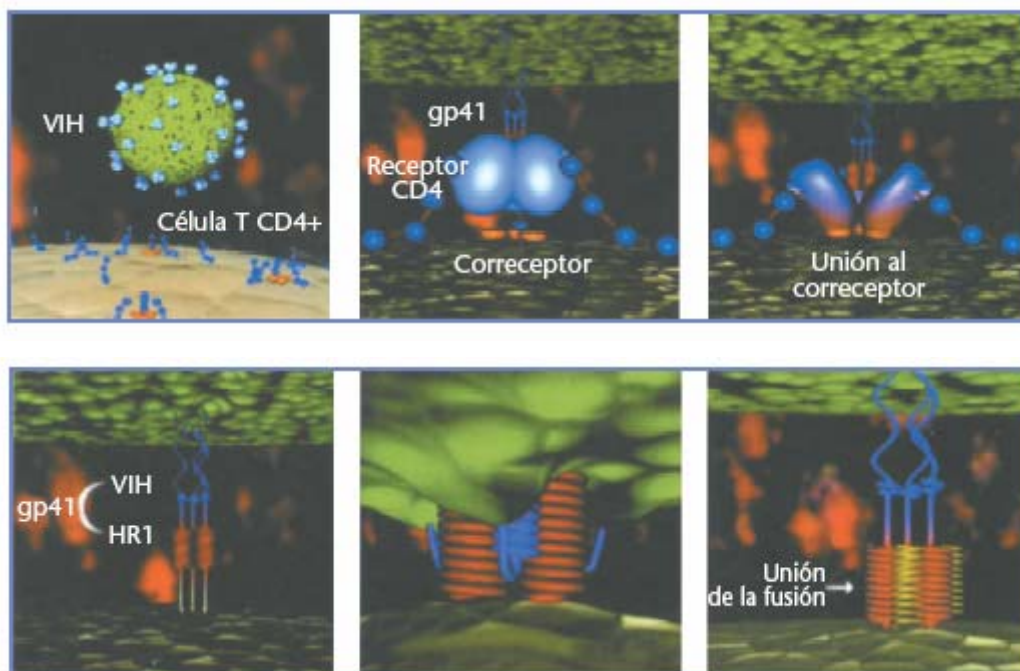


Figura 1.12. Proceso de fusión del VIH al CD4



Las sustancias que actualmente se sabe que tienen capacidad para bloquear la fusión son péptidos sintéticos que mimetizan la región HR2 de la gp41. Entre estas sustancias destacan la enfuvirtida y el T-1249.

La **enfuvirtida**, inicialmente denominado DP-178, más tarde renombrado **T20**, fue descubierta en 1993, siendo el primer fármaco de uso clínico representante de los inhibidores de la entrada (Labarga, 2004). Es un péptido de 36 aminoácidos derivado de la secuencia HR2 de la gp41 obtenida de una cepa de VIH-1 en el laboratorio, siendo así su acción específica para VIH-1, no teniendo actividad frente a VIH-2 (Arrizabalaga *et al.*, 2004). Actúa como sustrato competitivo en el proceso en el que la porción HR1 se une a las correspondientes regiones de la porción HR2, impidiendo el cambio de conformación de la gp41 requerida para la fusión. Es activo frente a cepas con co-receptores CXCR4 y CCR5 (X4 y R5).

El **T-1249** es un inhibidor de la fusión de segunda generación. Se trata de un péptido de 39 aminoácidos diseñado a partir de diferentes regiones del HR2 del VIH-1, VIH-2 y SIV. Al igual que enfuvirtida muestra una elevada capacidad de reducir la replicación viral en cepas VIH multirresistentes a los fármacos actuales, incluso resistentes a T-20, y de los subtipos virales A-G. Comparte el mecanismo de acción de enfuvirtida, sin embargo, a pesar de los resultados prometedores que mostraba este fármaco tanto en estudios *in vitro* como *in vivo*, en la actualidad el proceso de estudio clínico de este fármaco se ha paralizado (Bonjoch y Clotet, 2004; Davison *et al.*, 2006) por problemas de formulación.

Por último, existen dos nuevos inhibidores de la fusión, **TRI-999** y **TRI-1144**, aún en investigación. Son dos fármacos peptídicos diseñados a partir de una región del HR2 más N-terminal que enfuvirtida. El TRI-999 consiste en una secuencia *wild-type* de HR2 que lleva unida a una lisina un ácido graso. El TRI-1144 contiene residuos que estabilizan hélices a lo largo de una región similar de HR2 (Davison *et al.*, 2006). Ambos han sido diseñados para tener una vida media más larga.

#### 1.8.4 Nuevos fármacos

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

**Brecanavir**, cuya molécula posee una estructura que es una modificación del amprenavir, se encuentra en fase IIb de desarrollo.

**Inhibidores de la integrasa**, enzima clave en la integración del ADN proviral. En la célula humana no existe una enzima que realice esta función, por lo que los fármacos que la bloquean no deberían afectar otros procesos metabólicos (López-Aldeguer *et al.*, 2005).

En los últimos años, la contribución de la quimioterapia a la infección por VIH ha sido muy significativa en términos de supervivencia y mejora de la calidad de vida. El TARGA ha logrado controlar la enfermedad al reducir la carga viral hasta concentraciones indetectables. Sin embargo, un tratamiento curativo para la infección sigue siendo un objetivo incierto, ya que no se consigue la eliminación completa del virus, que se mantiene latente y con capacidad de reactivación en un pequeño **reservorio celular**. Este reservorio viral no se ve alterado por estas estrategias terapéuticas a causa de su incapacidad para actuar sobre el ADN proviral integrado o en latencia preintegracional. La presencia del reservorio viral es, por tanto, el principal obstáculo en la erradicación del virus. Una estrategia erradicadora dirigida al reservorio celular es la activación inmunitaria, que emplea la activación de citocinas, como IL-2 y TNF, o de anticuerpos monoclonales específicos frente a ciertos antígenos de superficie celular de linfocitos, tales como CD3, para activar o inducir células quiescentes infectadas en el ciclo celular activo y más adelante conducir las a diferenciación terminal o apoptosis a través de la expresión de proteínas virales. Otras formas de erradicación del reservorio celular en estudio son el uso de terapia citorreductora (sola o seguida de trasplante de médula ósea), erradicación del ADN proviral preintegrado o inducciones de inmunidad celular y terapia génica (Delgado y Regueiro, 2005).

También se están investigando nuevas formulaciones que se adapten por ejemplo, a las condiciones climáticas de los países pobres (Ravinetto y Villa, 2006).

La investigación y el desarrollo de nuevas moléculas y formulaciones antirretrovirales está centrada en su aplicación en pacientes adultos, quedando en un segundo plano la búsqueda de nuevos productos para SIDA pediátrico.

### **1.8.5 Combinaciones de antirretrovirales**

El elevado número de comprimidos en varias dosis diarias dificulta el óptimo cumplimiento del tratamiento antirretroviral, indispensable para alcanzar una buena eficacia terapéutica a largo plazo. Cada vez es, por tanto, más imperiosa la necesidad de disponer de tratamientos que conjuguen una máxima comodidad de administración (menor número de comprimidos y, eventualmente, de tomas) y una mínima toxicidad,

manteniendo una elevada potencia antirretroviral. Las combinaciones de fármacos en dosis fijas constituyen hoy día uno de los avances más significativos en el objetivo de simplificar al máximo el tratamiento antirretroviral para facilitar el cumplimiento óptimo y asegurar su eficacia a largo plazo de forma mantenida.

En la actualidad se dispone de cuatro combinaciones en dosis fijas o coformulaciones de fármacos antirretrovirales. Se trata de combinaciones de análogos, que por su eficacia, comodidad y buena tolerancia, pueden ser de primera elección en pacientes que inicien tratamiento antirretroviral: AZT+3TC (Combivir®), ABC+3TC (Kivexa®), AZT+3TC+ABC (Trizivir®) y TDF+FTC (Truvada®). Los análogos deben combinarse con antirretrovirales de otras familias para constituir un régimen triple que asegure el éxito virológico a largo plazo. Como excepción, la asociación de tres análogos Trizivir® debe reservarse para pacientes en los cuales no es posible usar no análogos ni inhibidores de la proteasa y, a ser posible, en pacientes con viremia basal no elevada dado que es menos eficaz en presencia de altas tasas de replicación viral (Barreiro y De Mendoza, 2006). Existe también una nueva combinación de análogos y no análogos, TDF+FTC+EFV (Atripla®) (Gallant *et al.*, 2006), aprobada por la FDA en julio de 2006 y pendiente de autorización de comercialización en Europa por la Agencia Europea del Medicamento.

Las coformulaciones de fármacos antirretrovirales presentan varias limitaciones, como son: no es posible realizar ajustes de dosis de cada fármaco individual, no se deben usar en el caso de sospecha o existencia de resistencia a alguno de los componentes de la combinación y que determinados efectos adversos pueden ser comunes a los distintos componentes, lo que puede confundir a la hora de interpretar cuál es el fármaco causal (Antela, 2006b).

#### **1.8.6 Monitorización terapéutica de antirretrovirales**

Actualmente la monitorización terapéutica no forma parte de la práctica clínica habitual en el tratamiento de la infección por VIH, sin embargo, ésta puede ser una herramienta útil para optimizar el tratamiento antirretroviral en determinadas circunstancias.

Se han descrito numerosas técnicas de HPLC que permiten determinar con gran precisión la concentración plasmática o sérica de los IPs y los ITINANs disponibles en la actualidad. Para los ITIANs no ha podido establecerse una correlación clara entre su concentración plasmática y la respuesta terapéutica. Son profármacos que deben activarse en el interior de la célula por acción de las cinasas,

transformándose en derivados trifosfatados activos. Por tanto, no existe una buena correlación entre las concentraciones en sangre de la mayoría de estos compuestos y su actividad antirretroviral y/o su potencial toxicidad. Por consiguiente, estos fármacos no son actualmente candidatos para la monitorización terapéutica. La determinación de la concentración intracelular de ITIAN-trifosfato podría ser más útil para predecir la respuesta terapéutica pero únicamente puede determinarse por técnicas muy complejas, como espectrometría de masas. De hecho, en la actualidad, en algunos países de Europa occidental y en Canadá la monitorización de IPs e ITINANs ya ha entrado a formar parte de la práctica clínica. Sin embargo, la monitorización de las concentraciones de ITIANs no está recomendada en la práctica clínica (Hammer *et al.*, 2006).

Con las limitaciones de coste y dificultad que supone su implementación, la monitorización terapéutica es difícilmente aplicable a todos los pacientes. Algunos grupos de pacientes que tengan un riesgo especial de presentar concentraciones subinhibitorias o excesivamente elevadas pueden obtener un beneficio considerable. Así, la monitorización de antirretrovirales es útil cuando puedan producirse interacciones farmacocinéticas, ante la aparición de efectos adversos, en caso de fracaso virológico, casos de hepatopatía crónica, pacientes con peso muy elevado, mujeres embarazadas o niños (Ribera *et al.*, 2005).

Un problema que surge en los fracasos virológicos por aparición de resistencias es que la concentración del fármaco que es efectiva frente a virus sensibles, no lo es frente a virus con sensibilidad disminuida. Para solucionar esto, ha surgido el concepto de **cociente inhibitorio**, que es un parámetro que relaciona la concentración del fármaco con la sensibilidad del virus, es decir, integra datos de farmacocinética y de resistencia del virus. Es un cociente en el cual el numerador corresponde a la exposición del fármaco y el denominador a la resistencia del virus. Así, cuanto mayor sea la concentración del fármaco y menor la resistencia del virus, más elevado será el cociente inhibitorio. Como medida de exposición al fármaco podría utilizarse cualquiera de los parámetros farmacocinéticos (AUC,  $C_{m\acute{a}x}$  o  $C_{m\acute{i}n}$ ), pero prácticamente siempre se ha utilizado la  $C_{m\acute{i}n}$ . Como medida de la resistencia del virus suele utilizarse la  $CE_{50}$  ( $CI_{50}$ , la concentración necesaria para inhibir el 50% de la replicación viral, corregida para la unión a proteínas plasmáticas). El cociente inhibitorio indica, por lo tanto, el número de veces que la  $C_{m\acute{i}n}$  del fármaco está por encima de la  $CI_{50}$  y en teoría sería un buen parámetro para valorar si un fármaco será efectivo frente a un virus con una determinada susceptibilidad.

Uno de los principales problemas para utilizar el cociente inhibitorio como parámetro de referencia para la monitorización terapéutica radica en la necesidad de realizar la fenotipificación del virus, lo cual no es aplicable en la práctica clínica. Para solucionar este problema se ha desarrollado el denominado **cociente inhibitorio virtual**, que utiliza el fenotipo virtual en vez de fenotipo real. Recientemente se ha definido el **cociente inhibitorio genotípico** que utiliza el genotipo como medida de resistencia del virus y se define como el cociente entre la  $C_{min}$  y el número de mutaciones que confieren disminución de la susceptibilidad al fármaco. La gran variedad de formas de calcular el cociente inhibitorio y los requerimientos de algunas de ellas, hacen necesaria una estandarización consensuada antes de poder aplicarlo a la práctica clínica habitual.

### 1.9 Fracaso virológico

De forma genérica se define fracaso virológico como un control inadecuado de la replicación viral. Se cuantifica mediante las copias de ARN. Se define si nunca se alcanza la indetectabilidad, es decir, se considera que la respuesta virológica es incompleta cuando tras 24 semanas de TARGA no se ha conseguido una carga viral menor de 400 copias/mL o cuando ésta no es inferior a 50 copias/mL después de 48 semanas. Otra definición es que la carga viral plasmática se haga nuevamente detectable de forma repetida después de conseguido el control, es decir, después de haber estado suprimida.

La aparición aislada de cargas virales detectables bajas (menores de 1000 copias/mL), denominadas *clips*, no siempre es reflejo de fracaso virológico real y aunque la vigilancia debe estrecharse no se recomienda modificar el TARGA (Miralles, 2006).

El fracaso virológico se puede deber a diversos factores relacionados con el paciente, los fármacos o el virus:

- Inadecuado cumplimiento
- Farmacocinética subóptima de la droga en los diferentes compartimentos del organismo
- Potencia farmacológica limitada
- Interacción con otros medicamentos
- Efectos farmacológicos adversos
- Replicación vírica en compartimentos santuario

- Resistencia vírica

Por tanto, la aparición de resistencias es una causa importante de fracaso terapéutico, pero no la única. Así pues, la ausencia de resistencias no predice necesariamente una buena respuesta clínica.

## **1.10 Resistencia a los fármacos antirretrovirales**

### **1.10.1 Dinámica de generación de resistencias**

El desarrollo de resistencias, consecuencia de la dinámica de replicación del VIH, induce cambios en el comportamiento viral que afectan a su capacidad replicativa, virulencia y respuesta al tratamiento antirretroviral, constituyendo una de las principales causas del fracaso terapéutico.

En la dinámica de cuasiespecies se seleccionan aquellas variantes que posean una ventaja adaptativa frente al resto. Esta adaptabilidad o *fitness viral* nos da una idea de la eficacia con la que un determinado genoma se adapta a una nueva circunstancia, como puede ser la presencia de antirretrovirales.

De manera natural existirán variantes del virus con mutaciones que confieren resistencia, de forma que, en cuanto se administre un fármaco éstas serán seleccionadas y con el tiempo predominarán en el conjunto de la población. Se estima que genomas víricos con resistencia a un solo fármaco preexisten en un 0,1-1% de la población vírica (indetectable para la mayoría de métodos) en cada sujeto infectado, siendo la resistencia a dos o más fármacos mucho menos frecuente. Ésta es una de las razones que apoya el empleo de terapia triple (TARGA, terapia antirretroviral de gran actividad). Empleando terapias máximamente supresivas desde la primera vez que se inicia el tratamiento, evitamos o enlentecemos la aparición de variantes resistentes como consecuencia de la baja actividad replicativa del virus y, por tanto, de la baja mutabilidad vírica. Sin embargo, cuando en el paciente existen niveles subterapéuticos, no se consigue la inhibición de la replicación viral, generándose nuevas *cuasiespecies*, existiendo la posibilidad de acumular en un único genoma aquellas mutaciones que confieran conjuntamente capacidad de resistencia y alto nivel de replicación.

La cinética de generación de resistencias varía entre fármacos de distintas familias e incluso entre compuestos de la misma familia. El fármaco debe superar una serie de barreras que comprometen su eficacia: de tipo farmacocinético (absorción, metabolismo y eliminación), farmacodinámico (metabolismo de un profármaco) y

genéticas (número de mutaciones requeridas para desarrollar resistencia a un fármaco determinado).

Un fármaco poseerá una baja barrera genética cuando la generación de una única variante mutante confiere un alto nivel de resistencia. Los fármacos con alta barrera genética requieren la acumulación de más mutaciones para adquirir un elevado nivel de resistencia.

Si analizamos la **barrera genética** en los distintos grupos de fármacos disponibles encontramos:

-Inhibidores de la RT análogos de nucleósidos (ITIAN). La barrera genética es muy variable dependiendo del fármaco en concreto. Así, el 3TC tiene una barrera genética baja, ya que una única mutación da lugar a un virus con resistencia de alto nivel al inhibidor. En cambio, ddI presenta una barrera genética bastante mayor, ya que se requieren al menos 3 ó 4 mutaciones para obtener virus con niveles de resistencia elevados.

-Inhibidores de la RT no análogos de nucleósidos (ITINAN). Tienen una baja barrera genética, un solo cambio de nucleótido confiere alta resistencia genotípica a estos inhibidores, y en muchos casos se produce resistencia cruzada entre todos los componentes de la familia.

-Inhibidores de la proteasa (IP). Su barrera genética es muy buena, ya que se requieren al menos 2 mutaciones primarias y 3-4 mutaciones secundarias para obtener variantes con alta resistencia a los fármacos (Alcamí, 2001). La proteasa del VIH tiene una gran plasticidad, lo que le permite mutar en numerosas posiciones sin perder completamente su actividad enzimática.

Por tanto, la extraordinaria sinergia de las combinaciones de antirretrovirales de distintas familias se debe a que las barreras débiles de uno de los componentes son compensadas por las de los otros, unido al hecho de actuar sobre distintas dianas y a través de distintos mecanismos bioquímicos.

### 1.10.2 Mecanismos de resistencia

Una de las principales causas de resistencia a los fármacos antirretrovirales es la aparición de mutaciones. Se tiende a clasificar las mutaciones según su efecto en la sensibilidad viral a los fármacos:

Las **mutaciones primarias** aparecen generalmente en las etapas iniciales del desarrollo de resistencia, alteran la unión de la droga a su diana, resultando en un incremento de la cantidad de droga necesaria para inhibir el enzima. Son relativamente específicas de cada antivírico y aparecen pronto tras la presión selectiva ejercida por el mismo, en un intento por evadir su acción. Las **resistencias primarias** reflejan aquellas mutaciones individuales que confieren resistencia a un fármaco en sujetos no tratados previamente con antirretrovirales. Debe resaltarse que la presencia de mutaciones de resistencia como consecuencia de la dinámica de las *cuasiespecies* de VIH-1 es un fenómeno independiente del problema de resistencias primarias atribuibles al contagio por virus de pacientes tratados en los que se ha producido una selección de virus resistentes.

Actualmente, las **mutaciones secundarias** sólo se describen para los IPs. Son mutaciones que se acumulan en el genoma viral cuando ya han aparecido una o más mutaciones primarias. Cuando aparecen junto a las primarias, tienen como función mejorar la capacidad replicativa del virus o *fitness viral*, sin apenas afectar en la magnitud de la resistencia. **Resistencia secundaria** se encontrará en virus con mutaciones asociadas a resistencias detectadas en pacientes con experiencia al tratamiento antirretroviral.

Otro concepto importante es el de **polimorfismos** que son variaciones naturales de la secuencia que implican cambios en el aminoácido pero sin afectar a la resistencia a los antirretrovíricos.

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



### 1.10.2.1. Resistencia a inhibidores de la RT análogos de nucleósidos

La mayoría de las mutaciones de resistencia en la RT se encuentran en el dominio polimerasa de la subunidad p66, particularmente en los dedos y en la palma.

Existen varios mecanismos moleculares que explican la resistencia a inhibidores de la transcriptasa inversa, unos que aumentan la escisión (por disminución de afinidad de la enzima por los fármacos o la retirada del fármaco) y otros que aumentan el ensamblaje (aumento de moléculas de RT por virión) (tabla 1.6).

**Tabla 1.6. Mecanismos de resistencia a ITIANs**

	↑ afinidad	↑ escisión	↑ ensamblaje
<i>Mecanismo</i>	Inhibición competitiva	Pirofosforólisis	↑ RT por virión
<i>Especificidad</i>	Un fármaco	Amplio espectro	Amplio espectro
<i>Fitness</i>	↓	=	↑
<i>Mutaciones</i>	M184V, 74V	NAMs	p6 gag
<i>Fármacos</i>	3TC, FTC, ddl	AZT>d4T>ABC>ddl>3TC	Todos ITIANs

- Cambios en la afinidad de la RT por inhibidores análogos de nucleósidos y dNTPs. La transcriptasa inversa salvaje, *wild-type*, sin mutaciones, incorpora preferentemente el análogo de nucleósido frente al natural. Estas mutaciones permiten a la enzima discriminar entre el nucleósido natural y el análogo farmacológico al disminuir la afinidad por este último, favoreciendo así al sustrato natural y permitiendo seguir la síntesis de la cadena de ADN. Un mecanismo molecular por el cual se produce esta disminución de la afinidad de la enzima por el fármaco podría ser la interferencia estérica (Miller *et al.*, 2004) como se muestra en la figura 1.13 (Clavel y Hance, 2004). Las mutaciones afectan a residuos implicados directamente en la interacción de enzima y fármaco.

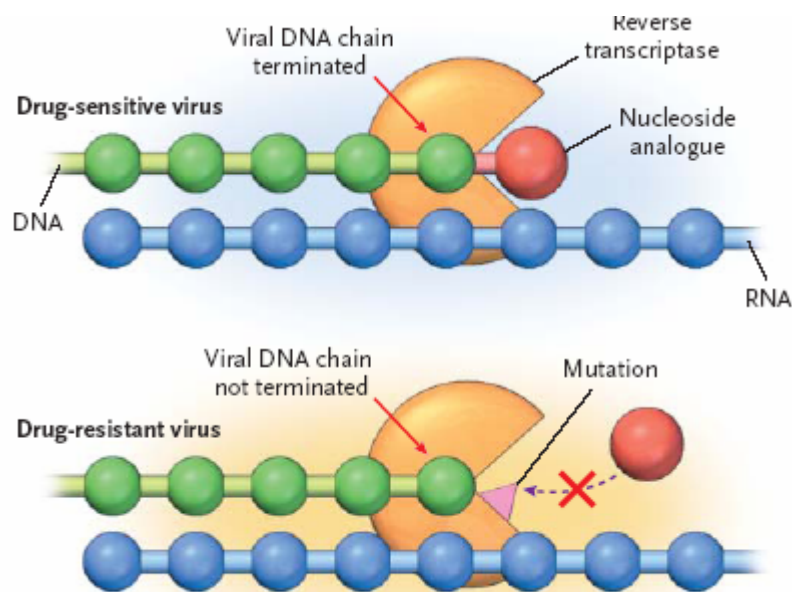


Figura 1.13. Mecanismo de resistencia de la RT a ITIANs por interferencia estérica

Algunas de las mutaciones que se han relacionado con este mecanismo son la M184V (Boyer *et al.*, 2002), el complejo Q151M, K65R y la L74V.

**M184V/I:** Confiere un alto nivel de resistencia a lamivudina (3TC) y emtricitabina (FTC) y menor grado de resistencia a otros análogos. La mutación M184V cambia la geometría de la región conservada YMDD localizada entre las posiciones 183 y 186 del dominio catalítico de la RT. La metionina (M) se localiza en esta zona muy conservada y su reemplazo por una valina (V) o isoleucina (I) interfiere con el apropiado posicionamiento del fármaco.

La mutación M184I, que precede a M184V y desaparece posteriormente debido a un sobrecrecimiento de la variante M184V también confiere alto nivel de resistencia a 3TC. La razón por la que la mutación M184I aparece antes que M184V es que la sustitución G→A que se produce, es el tipo de mutación que más frecuentemente ocurre durante la replicación de VIH-1 (Diallo *et al.*, 2003).

La mutación M184V puede contribuir también a atenuar la resistencia originada por las TAMs, es decir, tiene un cierto papel preventivo de la selección de TAMs. Produce un efecto de re-sensibilización a algunos antirretrovirales a pesar de la presencia de TAMs. Por tanto, se plantea la posibilidad de mantener la lamivudina o emtricitabina en regímenes que puedan seleccionar TAMs por si pudiera proporcionar algún beneficio terapéutico por retener la mutación M184V (Ross *et al.*, 2004).

Esta mutación incrementa la fidelidad de copia de la RT, lo que conlleva una reducción en la frecuencia de incorporación de ciertos cambios puntuales. Otro efecto beneficioso que tiene es la reducción de la capacidad replicativa del VIH.

**Complejo Q151M:** Su presencia confiere un alto grado de resistencia a la mayoría de los ITIANs. La mutación Q151M es la primera mutación del complejo que suele aparecer; se localiza muy cerca del sitio de unión del nucleósido a la RT, en una zona altamente conservada. Tras la selección de la mutación Q151M se produce la acumulación gradual de mutaciones secundarias que aumentan el grado de resistencia conferido por la mutación Q151M (Ruíz, 2005). Este complejo es poco frecuente en los pacientes infectados por VIH-1 (Quiros-Roldan *et al.*, 2001; Re *et al.*, 2003; Zaccarelli *et al.*, 2004), y curiosamente, es más frecuente en VIH-2 (Clavel y Hance, 2004).

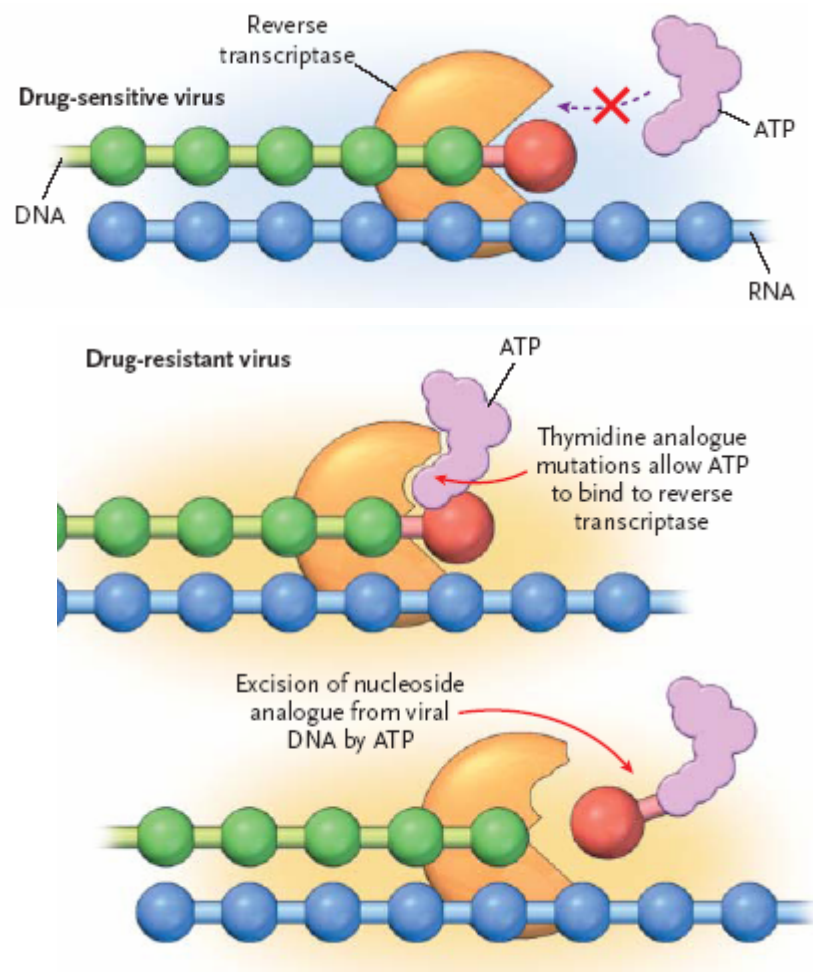
**K65R:** Es una mutación que aparece poco, a pesar de que ha visto aumentada su frecuencia e importancia con el incremento del uso de tenofovir, fármaco que favorece la aparición de esta mutación. Puede disminuir la eficacia de otros fármacos como abacavir y didanosina (Casado, 2006). Se localiza en una región conservada de la RT. Durante la incorporación de los nucleótidos, parte del subdominio *finger* de la RT rota hacia el subdominio *palm* y a su vez hacia el sitio activo del enzima. Como resultado de este movimiento, la Lys (K) entra en contacto con el nuevo nucleótido y forma un puente entre el grupo amino de la Lys y el átomo de oxígeno del fosfato del nucleótido entrante. El cambio de Lys (K) a Arg (R) afecta muy probablemente a la interacción entre la enzima, la movilidad de los trifosfatos de los nucleótidos y los inhibidores, alterando la especificidad de unión del nucleótido y/o la eficiencia de la RT en la formación del requerido puente fosfodiéster (Ruíz, 2005).

**L74V:** es una mutación altamente selectiva, sólo compromete la eficacia de ddI, abacavir y tenofovir. Reduce significativamente la capacidad replicativa de la población viral mutada, lo que atenuaría el rebrote de la viremia ante un fracaso virológico con selección de dicha mutación.

- Pirofosforólisis o retirada hidrolítica dependiente de ATP. Éste es el mecanismo principal de resistencia. Consiste en la retirada hidrolítica del fármaco que se había incorporado a la cadena, fenómeno que se produce en presencia de concentraciones fisiológicas de ATP.

La unión del ITIAN a la cadena de ADN es potencialmente reversible por este mecanismo de escisión. El ATP y el pirofosfato, abundantes en linfocitos normales, no participan en la polimerización del ADN, sin embargo, la estructura mutada de la

RT facilita su entrada a un lugar junto al análogo incorporado. En dicha posición, el ATP o pirofosfato pueden atacar el enlace fosfodiéster que une el análogo a la cadena de ADN, resultando en la retirada del análogo. Cuando el análogo de nucleósido trifosfato es incorporado a la cadena de ADN, en lugar de liberarse el pirofosfato, la presencia de múltiples mutaciones de resistencia en la RT evita la traslocación, permitiendo la escisión del análogo de tal forma que el proceso de extensión puede continuar con la adición de un nuevo nucleósido trifosfato celular (Arnedo y Pumarola, 2005). La figura 1.14 muestra este mecanismo de resistencia (Clavel y Hance, 2004).



**Figura 1.14. Mecanismo de resistencia de RT a ITIANs por escisión hidrolítica dependiente de ATP**

Este mecanismo se asocia con un grupo de mutaciones denominadas inicialmente **TAMs** (mutaciones asociadas a análogos de timidina) y conocidas posteriormente como **NAMs o NEMs** (mutaciones asociadas a análogos de nucleósidos).

Existen dos rutas o dos grupos de combinaciones de TAMs que van apareciendo y acumulándose en el genoma del virus con mayores niveles de resistencia (Marcelin

*et al.*, 2004c): la ruta **NAM1** incluye las mutaciones **41L, 210W y 215Y**; la ruta **NAM2** incluye las mutaciones **67N, 70R, 215F y 219E/Q**.

La 215Y aparece normalmente asociada con la 210W pero no con la 70R, mientras que la 215F se asocia con la 70R pero no con la 210W. La mutación K70R generalmente aparece pronto y a medida que se va siguiendo un tratamiento prolongado, se van acumulando otras NAMs (frecuentemente la 215F), revirtiendo esta mutación (R → K), que puede de nuevo reaparecer más tarde en genomas polimutados.

En ausencia de la K70R, es la 215Y la que se selecciona, seguida de la 210W. La mutación L210W contribuye a estabilizar la cadena aromática de fenilalanina (F) o tirosina (Y) en el codón 215 mutado. Igualmente la mutación M41L estabiliza la variante T215YF al reorganizar la zona de unión del dNTP confiriendo mayor capacidad replicativa (Yahi *et al.*, 2000). De ahí que las mutaciones M41L y T215YF aparecen asociadas frecuentemente. La alta incidencia de genomas que presentan ambas mutaciones la M41L y L210W sugieren que estas mutaciones pueden actuar sinérgicamente para compensar la capacidad replicativa reducida de la variante T215YF. Así va evolucionando paso a paso la aparición de resistencia a través de pérdidas de *fitness* y estrategias reparadoras subsecuentes.

Los principales aminoácidos que aparecen en las variantes resistentes en la posición 215 son la tirosina (Y) y la fenilalanina (F), ambos aminoácidos aromáticos. Ambas sustituciones, T→Y y T→F requieren cambio de dos nucleótidos (**ACC** a **TAC** o **TTC**) y, por tanto, a lo largo del curso del tratamiento se pueden detectar genotipos intermedios con cambios de un único nucleótido. Estas formas intermedias no confieren por sí solas resistencia a los análogos pero representan un paso hacia la emergencia de la T215Y/F (Yahi *et al.*, 2005). De hecho, en la práctica clínica es muy importante la detección de estas formas transitorias, así como las mezclas genotípicas puesto que en el momento de su detección el virus aún muestra un fenotipo sensible y sin embargo, estas variantes tienen mayor probabilidad que las cepas *wild-type* de cambiar a 215YF bajo presión farmacológica.

La mutación 215Y es más frecuente que la 215F, dado que el ATP prefiere la T215Y/L210W a K70R/T215F. El ATP está compuesto por tres unidades: adenina (de carácter hidrofóbico), fosfato (que interacciona principalmente con residuos hidrofílicos) y ribosa (intermedia). A la hora de crear un bolsillo de unión para el ATP el principal problema es proporcionarle a la adenina una superficie hidrofóbica complementaria. Tanto tirosina como fenilalanina son adecuadas debido a sus cadenas aromáticas, sin embargo, la tendencia de ambas a interactuar con la

adenina es distinta, la interacción con la tirosina es más eficaz. La superficie de unión del ATP conseguida con T215Y/L210W es particularmente buena porque además la cadena aromática del triptófano (210W) da fuerza a la interacción de la tirosina con el anillo de adenina del ATP (Yahi *et al.*, 2005).

La mutación 67N parece tener la misma probabilidad de seleccionarse si la 70R o la 215Y han sido seleccionadas previamente, indicando que esta mutación no parece ser tan específica de la ruta NAM2.

Según algunos estudios el complejo Q151M y la mutación M184V están asociados con ambas rutas por igual (Marcelin *et al.*, 2004c).

Las mutaciones 44D/A, 118I, inserción 69 y L74V parecen estar más asociadas con la ruta TAM1.

Las mutaciones **44D/A y 118I**, han sido clasificadas como NAMs (Soriano y de Mendoza, 2002a), y en un estudio reciente, se ha visto que ambas son más comunes en virus de pacientes tratados con 3TC y AZT y se asocian con alto nivel de resistencia a AZT (Kuritzkes y cols., en impresión). Se cree son compensatorias de las TAMs, que mejoran la capacidad replicativa de aislados de pacientes tratados con zidovudina.

Un ejemplo de la aparición de resistencia a múltiples análogos de nucleósidos lo constituyen las RT portadoras de **inserciones** de dos aminoácidos entre los codones **69** y 70, que suelen aparecer en individuos sometidos a tratamientos antirretrovirales intensos.

Actualmente se desconocen los factores que conducen a la selección de la ruta NAM1 o NAM2. Puede que incluyan el *background* genético del VIH-1, la presión del sistema inmune, los antirretrovirales utilizados, la secuencia de fármacos seguida e incluso parámetros farmacocinéticos.

A la hora de condicionar resistencia, es importante cuántas y qué NAMs se observan. Por un lado, la ruta seleccionada puede influir en la respuesta virológica al tratamiento (de hecho, la ruta NAM1 se asocia con mayor resistencia a ITIANs que la ruta NAM2). También un mayor número significa mayor grado de resistencia: la actividad fosforolítica ATP-dependiente aumenta conforme aumenta el número de NAMs.

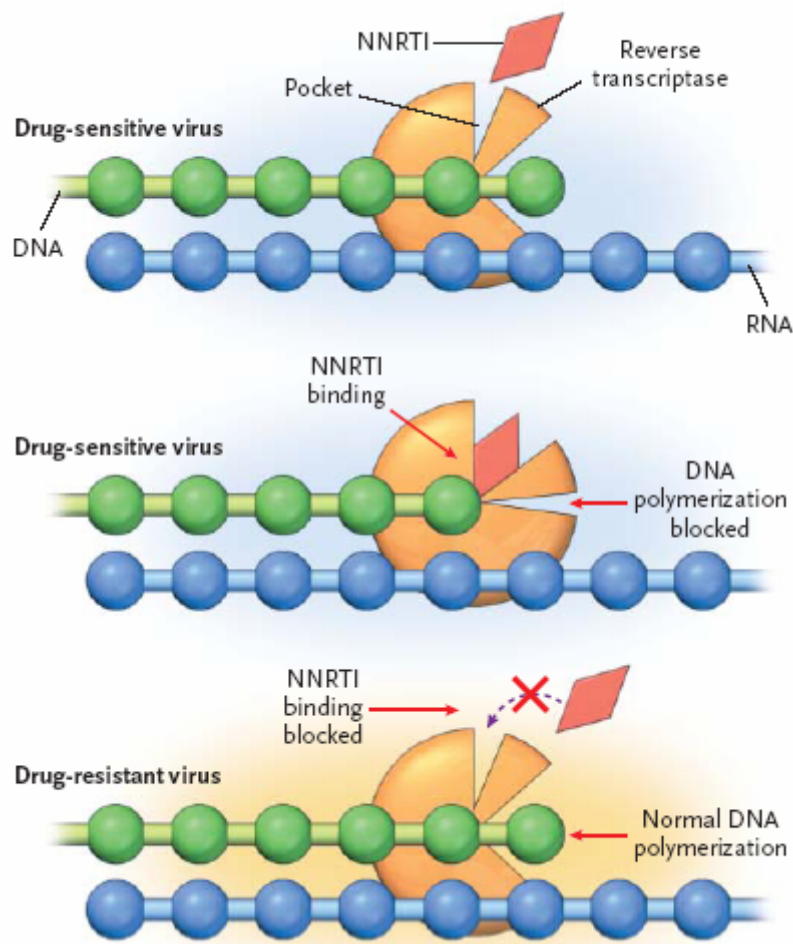
- Aumento de número de moléculas de RT por virión. La proteína p6 del VIH está relacionada con el empaquetamiento de las enzimas virales (entre ellas la RT), la determinación del tamaño de partícula viral y la liberación del mismo. Las mutaciones en esta proteína han sido estudiadas sobre todo en relación a la resistencia a los inhibidores de la proteasa, comportándose esencialmente como

compensatorias, mejorando la capacidad catalítica de la proteasa deficiente que contiene múltiples mutaciones.

Recientemente se han descrito cambios en esta proteína seleccionados bajo tratamiento con ITIAN, que parecen condicionar un aumento de la dosis de virión, escapando parte de ellas del efecto bloqueante de los ITIAN (de Mendoza *et al.*, 2002).

### 1.10.2.2. Resistencia a inhibidores de la RT no análogos de nucleósidos

Pérdida de interacciones entre la RT e inhibidores no análogos de nucleósidos. El mecanismo de resistencia para algunos fármacos de este grupo se debe en la mayoría de los casos a la pérdida de interacciones hidrofóbicas que estabilizan la unión de la RT con el inhibidor. Los ITINANs son inhibidores no competitivos que utilizan puntos de unión diferentes al sustrato pero todos ellos el mismo lugar de unión, de ahí la amplia resistencia cruzada entre los diferentes fármacos de este grupo. La figura 1.15 muestra este mecanismo de resistencia (Clavel y Hance, 2004).



**Figura 1.15. Mecanismo de resistencia de la RT a ITINANs mediante inhibición competitiva**

Los cambios que afectan a la sensibilidad a ITINANs se encuentran fundamentalmente en tres regiones:

- **Codones 98-108**, destacando las mutaciones **A98G**, **K101E** y **V108I**, cuya presencia implica un bajo nivel de resistencia; la mutación **L100I** que produce un nivel de resistencia intermedio a efavirenz y bajo a nevirapina y, la más importante clínicamente, la **K103N** que confiere alto nivel de resistencia, de manera que su mera presencia es causa de fracaso virológico a cualquiera de los no análogos.
- **Codones 179-190**, a destacar las mutaciones **Y181C/I**, **Y188H/L** y **G190A/S**.
- **Codones 225-236**, siendo las mutaciones más significativas **P225H**, **M230L** y **P236L**.

El VIH-2 y VIH-1 grupo O son intrínsecamente resistentes a ITINANs (Wainberg, 2003). La mayoría pacientes infectados por subtipos no-B procedentes de países en vías de desarrollo presentan menor porcentaje de mutaciones de resistencia para **ITINANs** que a ITIANs e IPs. Este hecho puede reflejar el menor uso de ITINANs en estos países, en los que han sido introducidos más recientemente (Kantor y Katzenstein, 2004).

### 1.10.2.3. Resistencia a inhibidores de la proteasa

A pesar del pequeño tamaño de la proteasa, por lo menos 42 mutaciones que afectan a 27 codones se han asociado con resistencia a los IP (Arnedo y Pumarola, 2005). La resistencia asociada a mutaciones en el gen de la proteasa puede venir determinada, por un lado, por sustituciones en aminoácidos en el dominio central o en sus cercanías, que determinarán una interferencia con el transporte del inhibidor de la proteasa, lo cual conlleva una reducción de la sensibilidad al fármaco en cuestión. Por otro lado, las sustituciones de aminoácidos fuera del citado centro, más que afectar directamente a la sensibilidad, en determinadas circunstancias, afectarían a la cinética de aquellas proteasas que tuvieran sustituciones en el centro activo.

La terminología usada para clasificar las mutaciones asociadas a la resistencia a los inhibidores de la proteasa se ha realizado en función de la posición que ocupen en su estructura tridimensional (mutaciones del dominio central, de la tapadera o hélice y de las regiones residuales) y en función de la categorización de las mismas en primarias o secundarias, recientemente redefinidas como mayores y menores. La figura 1.16 muestra las mutaciones en la proteasa (Clavel y Hance, 2004).



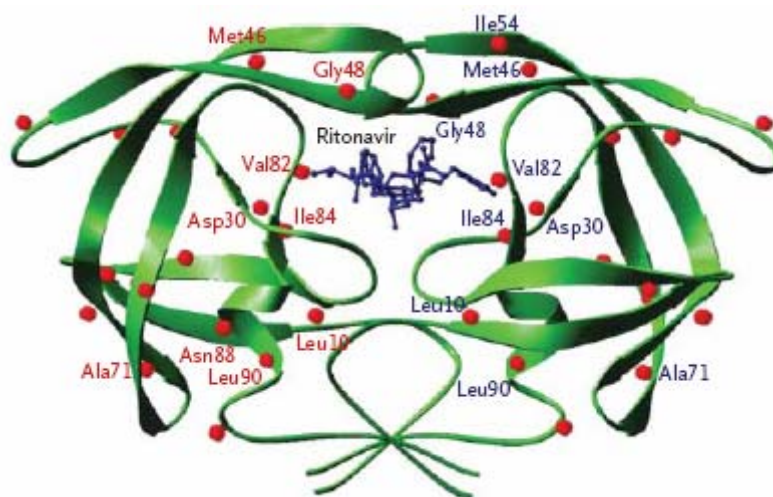


Figura.1.16. Mutaciones en la proteasa frente a antirretrovirales

Las mutaciones **mayores o primarias** (posiciones **30, 48, 50, 82, 84, 90**) se caracterizan por: no se observan en los virus de los pacientes que no han recibido tratamiento, por sí solas son capaces de afectar a la sensibilidad del virus, aumentando la resistencia fenotípica y se observan habitualmente cuando el paciente fracasa con un tratamiento que lleve un IP determinado.

Las mutaciones **menores o secundarias** (posiciones **10, 20, 24, 36, 46, 47, 54, 63, 64, 71, 77, 88 y 93**): algunas de ellas, pueden observarse en pacientes que no hayan tomado previamente inhibidores de proteasa; por sí solas no producen aumento de la resistencia fenotípica, pero pueden incrementar la producida por las mutaciones mayores; no son características del fracaso con un IP en particular, pudiendo aparecer tras el fracaso de cualquiera de ellos; pueden, en ocasiones, aumentar la capacidad replicativa de aquellos virus portadores de mutaciones mayores (Nijhuis *et al.*, 1999).

Las mutaciones en el **dominio central** son: **D30N, V32I, G48V, I50V/L, V82A/T/F/S** y **I84V**. La mutación D30N es el principal cambio que aparece en individuos en tratamiento con nelfinavir, la mutación G48V se produce principalmente en pacientes en tratamiento con SQV y la I50V se relaciona más con el tratamiento con APV.

Las mutaciones en la **tapadera o hélice** comprenden los residuos que van del 33 al 62. Tienen especial importancia los residuos 46 al 54 debido a su movilidad y que sus mutaciones comportan mayor grado de resistencia, destacando la **M46I/L/V, I47V** e **I54V/T/L/M**.

Existen también mutaciones **en otros residuos**, como son: G73S, N88S y L90M.

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

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

Por último, mutaciones fuera del propio gen de la proteasa (***gag cleavage site***): existen nueve zonas en las que las poliproteínas son cortadas por la proteasa, destacando 7 de ellas en el *gag* y entre todas, la proteína p6. El extremo carboxi-terminal de la proteína **p6** regula la función de la proteasa, las mutaciones en esta región pueden aumentar la actividad de la enzima, compensando la disminución en el fitness viral en individuos con mutaciones primarias en la proteasa (Peters *et al.*, 2001). Las mutaciones en **p1/p7** puede que actúen también como mutaciones compensatorias que aumentan la capacidad replicativa (de Mendoza *et al.*, 2002).

#### 1.10.2.4. Resistencia a inhibidores de la entrada

La resistencia a los inhibidores de la entrada puede deberse a la inhibición de distintos pasos, como muestra la tabla 1.7.

**Tabla 1.7. Resistencia a los inhibidores de la entrada**

Paso inhibido	Proteína implicada
Unión virus a la célula	gp120
Interacción co-receptor	gp120
Fusión celular	gp41

La proteína **gp120** presenta una gran plasticidad y sólo un número limitado de aminoácidos situados en diferentes regiones de la gp120 son estrictamente requeridos para la unión efectiva a los CD4, es decir, sólo los cambios en dichas posiciones comprometen realmente la unión del VIH a la célula. La región de la gp120 que se une al co-receptor se localiza cerca de la base de V3, que es el principal determinante del tropismo celular del VIH. Por tanto, cualquier cambio en esta región que interfiera con

la unión del virus a los co-receptores CCR5 y/o CXCR4 puede resultar en un cambio en el tropismo del virus (Soriano y de Mendoza, 2002b).

Estudios *in vitro* e *in vivo* muestran que mutaciones en el dominio HR1 de **gp41** generan resistencias a T-20 mediante la alteración del sitio de unión. La mayoría de mutaciones de resistencia a T-20 descritas se localizan preferentemente entre las posiciones 36-45 del dominio HR1 de la subunidad gp41 de la glicoproteína de la envoltura (de Mendoza y Soriano, 2004) y son: G36D/S, I37V, V38A/M/E, Q39R, Q40H, N42T y N43D (Johnson *et al.*, 2006).

Estos cambios producen una disminución de la capacidad replicativa del virus así, por ejemplo, variantes resistentes seleccionadas durante monoterapia con enfuvirtida pueden desaparecer tras la supresión del tratamiento, revertiendo al virus salvaje (Melby *et al.*, 2002). No obstante, es muy posible que se seleccionen mutaciones de resistencia o compensatorias en otras regiones de gp41 (por ejemplo, en HR2) y/o gp120; estas mutaciones o polimorfismos aumentan el grado de resistencia a T-20 e incluso mejoran la capacidad replicativa del virus (Ruíz, 2005).

Es posible que la generación de resistencias cruzadas entre esta familia de compuestos sea menor que en el resto de fármacos antirretrovirales, así por ejemplo, virus resistentes al T-20 mantienen la sensibilidad a otros inhibidores de la fusión, como, por ejemplo, el T-1249 (segundo inhibidor de la fusión en desarrollo también derivado del segmento HR2 de la gp41) (Lorenzo y González, 2004). No obstante, ya se han visto mutaciones que afectan a T-20 y T-1249. Para el tratamiento de los aislados resistentes a estos dos fármacos existen dos nuevos inhibidores de la fusión, TRI-999 y TRI-114.

Puesto que enfuvirtida actualmente se ha autorizado para su uso en terapia de rescate, según las recomendaciones nacionales e internacionales, es necesario realizar estudio de resistencias.

#### **1.10.2.5. Resistencias celulares**

Otro posible mecanismo de resistencia a los fármacos antirretrovirales lo constituyen las resistencias celulares, como pueden ser la inhibición de las reacciones enzimáticas necesarias para activar celularmente algunas drogas o la incapacidad del fármaco para entrar en las células.

- Mecanismos de fosforilación intracelular. Los ITIAN al ser profármacos pueden sufrir una alteración en la afinidad de las enzimas que los metabolizan, generándose una resistencia a nivel bioquímico. Esta resistencia de tipo celular opera por un

mecanismo según el cual disminuye la disponibilidad en enzimas celulares cuando aumenta la cantidad de sustratos. Esta circunstancia explica que el AZT y d4T no se pueden administrar juntos porque comparten como profármacos la misma vía de fosforilación y pueden competir por el enzima.

- Bombas de fármacos. Se trata de proteínas transportadoras de membrana que actúan como bombas, como son la glicoproteína-P (gpP) o proteínas asociadas a multirresistencia (MRP), que expulsan al medio extracelular diferentes tipos de fármacos. Se ha descrito que tanto los ITIAN como los IPs pueden ser sustratos de estas bombas.

En el caso de los ITIANs se ha descrito que la gpP y algún miembro de la familia de las MRP (MRP-4) pueden alterar su acumulación intracelular.

Muchos de los IP son sustratos de alguno de estos transportadores, el mecanismo es más complejo y se da a tres niveles: a) la existencia de estos mecanismos a nivel de células no diana del VIH pero necesarias para la farmacocinética de los IP (como células epiteliales) puede limitar la absorción y distribución de los IP en el organismo, especialmente a nivel del SNC; b) a nivel de linfocitos CD4 y c) también los IP pueden aumentar la expresión de gpP, lo cual disminuiría a su vez la sensibilidad a los IP.

#### 1.10.2.6. Resistencia cruzada y multirresistencia

Algunas mutaciones confieren resistencia a varios fármacos distintos al que las ha inducido, son las resistencias cruzadas. Debido a éstas, la eficacia de los tratamientos subsiguientes es a menudo limitada. Cuanto más tiempo haya estado con un fármaco en fracaso virológico, esto es, con persistencia de replicación vírica, más probabilidades habrá de que se produzcan resistencias cruzadas de grupo. Por tanto, es importante cambiar de tratamiento lo más rápidamente posible ante un fracaso terapéutico.

La mutación **Q151M/L**, que suele ir acompañada de mutaciones en los codones 62, 75, 77 y 116, de ahí la denominación de *complejo 151*, confiere multirresistencia a todos los análogos de nucleósidos, excepto a tenofovir. Es una mutación poco frecuente.

La **inserción 69** es otro caso de multirresistencia que consiste en una inserción de dos aminoácidos (serinas) entre los codones 68 y 70 de la RT, que junto con una mutación en el codón 69 (T69S), condiciona una modificación estructural de la

RT que la hace multirresistente a todos los análogos de los nucleósidos (Marcelin *et al.*, 2004c). Este cambio es aún menos prevalente que el complejo Q151M.

Las **NAMs** también inducen resistencia cruzada a todos los inhibidores de la RT, excepto a la lamivudina (Whitcomb *et al.*, 2003).

La mutación **K103N** de la RT condiciona reducción de la sensibilidad para todos los inhibidores de la RT no análogos de nucleósidos. Modifica el sitio de unión de los ITINANs a la enzima, de ahí la alta tasa de resistencia cruzada entre los miembros de esta familia de antirretrovirales.

En el desarrollo de resistencias cruzadas para los inhibidores de la proteasa, hace falta que se acumulen más de dos mutaciones claves (D30N; G48V; I50V; V82A/F/T/S; I84V; L90M) en esta región del genoma del virus.

Considerando la presencia de resistencias cruzadas, se lleva a cabo la secuenciación de fármacos en un orden específico, con objeto de preservar una respuesta óptima al nuevo tratamiento (Lafeuillade y Tardy, 2003).

### **1.10.3 Métodos de laboratorio para la detección de resistencias**

La caracterización de los mecanismos de adquisición de resistencias ha ocurrido de forma paralela al desarrollo de métodos para la detección de éstas en el laboratorio. Las pruebas de detección de resistencia se introdujeron comercialmente en 1997 y desde entonces, se ha incrementado significativamente el número de fármacos antirretrovirales en uso clínico, se ha avanzado en la comprensión de los mecanismos de resistencia y se ha demostrado la utilidad clínica de las pruebas de detección de resistencia.

Los métodos disponibles en la actualidad para la detección de resistencias incluyen los tests genotípicos y fenotípicos (García y Aguilera, 2005; Carlos *et al.*, 2006). Ambos se realizan generalmente a partir de muestras de plasma o suero, puesto que en él se encuentran las poblaciones de virus que contienen los cambios más recientes relacionados con el tratamiento antirretroviral.

Diversos estudios han demostrado también la utilidad de muestras de suero impregnado en papel de filtro para la realización del genotipado de VIH. Esto permite que el estudio de resistencias sea posible también en países pobres, los cuales presentan dificultades logísticas para su realización como son el mantenimiento de la cadena de frío o el transporte seguro de muestras (Plantier *et al.*, 2005).

Algunos ensayos genotípicos admiten también el uso de otras muestras como son: líquido cefalorraquídeo, tejido linfoide o células mononucleadas de sangre periférica.

### 1.10.3.1. Técnicas genotípicas

Se trata de ensayos que examinan la secuencia genética viral para identificar mutaciones relacionadas con resistencia.

#### Secuenciación de ADN

Es el método genotípico de referencia. Proporciona información completa de la secuencia de la región del genoma viral amplificada previamente por PCR.

Hay distintas técnicas para la secuenciación de ADN que se diferencian en el principio técnico empleado, pero todas ellas tienen en común la generación de secuencias de distinta longitud que difieren en una sola base y que pueden ser separadas electroforéticamente. La clave para poder determinar la secuencia de la región estudiada consiste en realizar una reacción química o enzimática para cada uno de los nucleótidos (A, C, G, T) y cargar las moléculas resultantes de cada reacción en calles adyacentes de un gel. Aplicando una corriente eléctrica, las bandas de ADN generadas se separan por tamaños, de menor a mayor. Como todas las posibles bandas generadas están presentes en uno de los 4 carriles, la secuencia de la región estudiada puede ser leída como una escalera de longitud creciente.

```

5' ACTGTCAAAGTCATGCTACATGCGTACGATCGATAGCTACATGACCATGCTAATGACTA 3'
3' ACTGGTACGATTACTG Cy5.0
3' ATGTACTGGTACGATTACTG Cy5.0
3' ATCGATGACTGGTACGATTACTG Cy5.0
3' AGCTATCGATGACTGGTACGATTACTG Cy5.0
3' ATGCTAGCTATCGATGACTGGTACGATTACTG Cy5.0
3' ACGATGCTAGCTATCGATGACTGGTACGATTACTG Cy5.0
3' ACGTACGATGCTAGCTATCGATGACTGGTACGATTACTG Cy5.0
3' ATGTACGTACGATGCTAGCTATCGATGACTGGTACGATTACTG Cy5.0
3' ACGATGTACGTACGATGCTAGCTATCGATGACTGGTACGATTACTG Cy5.0
3' AGTACGATGTACGTACGATGCTAGCTATCGATGACTGGTACGATTACTG Cy5.0
3' AGTTTCAGTACGATGTACGTACGATGCTAGCTATCGATGACTGGTACGATTACTG Cy5.0
3' ACAGTTTCAGTACGATGTACGTACGATGCTAGCTATCGATGACTGGTACGATTACTG Cy5.0

```

**A)** El *método químico* fue desarrollado por Maxam y Gilbert en la década de los 70. En este método, el ADN, previamente marcado en uno de sus extremos con isótopos radiactivos o fluorescencia, se corta específicamente mediante cuatro reacciones químicas separadas, una para cada uno de los 4 tipos de nucleótidos. La clave de este método está en asegurar la degradación química parcial de las

posiciones susceptibles de corte, de manera que el corte en una molécula de ADN se produzca sólo en pocas posiciones.

**B)** El *método enzimático*, también llamado de síntesis abortiva o de los dideoxynucleótidos fue puesto a punto por Sanger, Nicklen y Coulson casi simultáneamente al método anterior, y en la actualidad es el más utilizado. En él se emplea una ADN-polimerasa para sintetizar cadenas complementarias de una de las hebras del ADN problema en cuatro reacciones enzimáticas diferentes. En cada una de ellas junto con el oligonucleótido usado como cebador de la reacción de polimerización y la mezcla de los cuatro nucleótidos (dATP + dCTP + dGTP + dTTP), se encuentran presentes cantidades no saturantes del 2'-3'dideoxynucleótido (ddNTP) correspondiente (ddATP, ddCTP, ddGTP o ddTTP), que al no tener radical hidroxilo en la posición 3' no permite la adición de otro nucleótido, parando la extensión de la cadena de ADN a partir del cebador. El marcaje del fragmento generado puede realizarse partiendo de cebadores previamente marcados en su extremo 5' o bien empleando ddNTP marcados que, además de detener la síntesis de la cadena, introducirán la señal que permita detectarla.

Las cantidades relativas de dNTPs y ddNTPs han de calcularse para que puedan obtenerse todos los posibles fragmentos que terminan en un nucleótido determinado. De lo contrario, si el ddNTP existiera en concentraciones saturantes, el resultado sería la obtención de cadenas muy cortas, debido a la terminación de la polimerización la primera vez que se requiera incorporar dicho nucleótido, sin permitir a ninguna cadena de ADN naciente elongarse más en sentido 3' a partir de ese punto y, por tanto, impidiendo la secuenciación del fragmento (Rodés, 2005).

Aunque la exactitud de la reacción de secuencia es muy elevada (>99%), siempre existe el riesgo de que se produzca algún error puntual, debido a cortes inespecíficos originados durante el tratamiento químico o bien a incorporaciones incorrectas de dideoxynucleótidos por la ADN polimerasa. Por ello, siempre es recomendable realizar la secuenciación independiente de ambas hebras de la molécula problema y posteriormente elaborar la secuencia consenso.

### **Secuenciación automática**

El método de Sanger se ha automatizado y, otro avance, el más significativo en las técnicas de secuenciación se ha producido con el empleo de polimerasas termoestables. Con ellas, las reacciones de polimerización se llevan a cabo a alta temperatura (60-70° C), pudiéndose así romper estructuras secundarias que puedan encontrarse en el ADN monocatenario y permitir la elongación durante la

secuenciación. Además, el empleo de ADN polimerasas termoestables permite diseñar programas con ciclos de temperatura análogos a los de la PCR, lo que permite aumentar la cantidad de fragmentos de secuenciación generados y la sensibilidad de la misma.

Otro de los avances fundamentales ha sido el desarrollo de moléculas químicas que muestran fluorescencia inducida por láser y al unirse a los ddNTPs terminadores de la reacción permiten la detección del fragmento mediante la emisión de fluorescencia a una cierta longitud de onda. Actualmente se han diseñado cuatro de estas moléculas con emisión de fluorescencia a longitudes de onda diferentes, y así unidas a cada uno de los cuatro ddNTPs, permiten realizar las cuatro reacciones de secuencia en un mismo tubo y pueden cargarse en el mismo pocillo del gel, ya que las bandas de cada nucleótido podrán reconocerse por su color de fluorescencia. Éste método se denomina secuenciación **unidireccional**. Del mismo modo pueden marcarse los cebadores o primers y hablamos entonces de secuenciación **bidireccional**.

En la actualidad hay equipos de secuenciación asistidos por ordenador, que automatizan los pasos de electroforesis, detección y análisis de las bandas de secuenciación (patrones de picos llamados *electroforetogramas*), y el ensamblaje de los fragmentos secuenciados.

Las ventajas que presenta la secuenciación automática frente a la manual son las siguientes:

- Mayor sensibilidad de detección.
- La longitud del fragmento secuenciado es mayor (700-800 pares de bases).
- Menor cantidad de paradas inespecíficas de la ADN polimerasa por las estructuras secundarias en el ADN molde.
- Análisis de los resultados más rápido.
- Menor tiempo de procesamiento de las muestras.

Todo ello ha contribuido a generalizar el uso de esta técnica en concreto para la detección de mutaciones de resistencia a fármacos, en este caso frente a antirretrovirales.

Existen varios ensayos de secuenciación comerciales disponibles, incluyendo TRUGENE HIV-1 genotyping test (Visible Genetics), ViroSeq HIV genotyping system (PE Applied Biosystems), GeneSeq (Virologic), HIV-1 GenotypR PLUS (Specialty Laboratories), Virco GEN II (Virco), HIV-1 Mutation Analysis (Focus Technologies), HIV



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

**Otros ensayos genotípicos:**

**LiPA** (*line probe assay*) (Versant HIV-1)

El LiPA es un método de detección de mutaciones puntuales. Está basado en el principio de la hibridación de productos amplificados mediante PCR con sondas específicas distribuidas a lo largo de una tira de nitrocelulosa.

Tras la extracción, el ARN de la muestra, se amplifica por RT-PCR empleando cebadores marcados con biotina y se añade sobre las sondas, distribuidas a lo largo de la tira de nitrocelulosa formando bandas que representan tanto los codones de resistencia como los codones sin mutaciones. A continuación se añade estreptavidina y fosfatasa alcalina, que se unirá al complejo ADN y sonda. La incubación con un compuesto cromógeno da paso a un precipitado de color pardo-violeta. Es decir, si se produce la coloración en la banda correspondiente a un determinado codón, ha tenido lugar la reacción inmunoenzimática, se ha producido la hibridación (García y Aguilera, 2005).

Con este método se detectan mutaciones relacionadas con resistencia a fármacos inhibidores de la RT y de la proteasa (Ziermann *et al.*, 2004). Para el estudio de resistencias a análogos de nucleósidos se analizan los codones 41, 69, 70, 74, 75, 103, 106, 151, 181, 184 y 215 del gen de la transcriptasa inversa. En la detección de resistencias a los inhibidores de la proteasa se estudian los codones 30, 46, 48, 50, 54, 82, 84 y 90 del gen de la proteasa (García y Aguilera, 2005). Algunos estudios avalan, retrospectivamente, su utilización para guiar el cambio de tratamiento (Álvarez *et al.*, 2004).

La ventaja de este método es que presenta gran sensibilidad para la detección de poblaciones virales minoritarias (4-8%). La principal desventaja de esta técnica es que detecta un número limitado de mutaciones y que la presencia de polimorfismos, deleciones e inserciones presentes en la zona amplificada pueden afectar de forma significativa al resultado final.

**Microarrays o chips de hibridación de sondas múltiples.**

Pueden cubrir únicamente las posiciones implicadas en resistencia o bien la totalidad de los genes bajo estudio (ej. la prueba Affimetrix®) (Valer, 2005).

*Affimetrix®*

Está basado en la hibridación de pequeños fragmentos de ARN obtenidos por RT-PCR utilizando oligonucleótidos inmovilizados sobre una microplaca o chip, que permiten la identificación del nucleótido presente en cada posición. Los productos de PCR están marcados con moléculas fluorescentes y una vez realizada la hibridación, las señales se analizan mediante barrido con láser. Las posiciones de cada una de las sondas son conocidas, de tal forma que las señales se integran mediante un programa de ordenador que deduce la secuencia.

### **PCR selectiva**

Se basa en el diseño de primers que durante la PCR hibridan específicamente en el extremo 3'-OH de las variantes virales *wild-type* o mutante de los codones específicos analizados. Tiene algunas limitaciones, por ejemplo no puede analizar al mismo tiempo varios codones con posibilidad de mutar e inducir resistencias múltiples a uno o varios fármacos, y no permite cuantificar el porcentaje de variantes mutantes que puedan existir en una muestra.

### **Hibridación diferencial o Point mutation assay**

Consiste en la extensión de un iniciador que se encuentra unido a un soporte sólido. Un dideoxinucleótido marcado con biotina se une en el extremo 3'-OH de la cadena de ADN que se está sintetizando, en frente del nucleótido que confiere o no resistencia a un cierto fármaco. Mediante la cantidad de fluorescencia o radiación emitida por los virus *wild-type* o mutantes se obtiene la información de forma semicuantitativa.

### **Determinación de secuencias de genoma individuales de una población viral**

El material ya amplificado por PCR se somete a clonaje molecular en una bacteria (*E. coli*). Normalmente se analizan de 15 a 20 clones para evaluar la población viral que tiene un paciente infectado.

#### **1.10.3.2. Técnicas fenotípicas**

Miden la concentración de fármaco necesaria para inhibir la replicación viral en cultivo celular. Definen si una cepa de VIH es sensible o resistente a un determinado fármaco antirretroviral, en función de su capacidad de replicación ante distintas concentraciones del fármaco *in vitro*. El resultado que se obtiene se conoce como IC<sub>50</sub> o IC<sub>90</sub>, que es la concentración de fármaco necesaria para reducir la replicación viral, en cultivo celular, en el 50 ó 90%, respectivamente. Permite compararla con la concentración requerida para inhibir una cepa de referencia de laboratorio o cepas aisladas en el mismo paciente, antes de exponerlo a tratamiento antirretroviral. Esta comparación se expresa como diferencia de veces (*fold changes* o

*folds*) entre ambos. Por ejemplo, un aislado que presenta una reducción de la sensibilidad de cuatro veces para un determinado fármaco, presenta una IC<sub>50</sub> para este fármaco cuatro veces superior respecto a la que presenta el virus salvaje.

Existen dos tipos de pruebas de resistencias fenotípicas: las clásicas y las basadas en modelos de virus recombinantes (García *et al.*, 2005).

#### **Método de sensibilidad en las CMSP**

Los ensayos fenotípicos clásicos se realizaban mediante infección de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de donantes sanos con virus aislados de individuos seropositivos.

La sensibilidad a un fármaco se determina añadiendo una concentración estándar de virus obtenidos a partir de células del paciente seropositivo a células de donante seronegativo en presencia de concentraciones crecientes de fármaco o combinación de fármacos. La cantidad de virus en presencia de las distintas concentraciones de fármaco se cuantifica mediante la producción de antígeno p24 o actividad de la RT y finalmente el método calcula la IC<sub>50</sub> del virus.

Este test es muy útil en pacientes que han estado sometidos a terapia antirretroviral y aún presentan virus resistentes que aunque hayan desaparecido de plasma, permanecen integrados en las CMSP. Como ventaja frente a la tecnología de virus recombinantes que veremos a continuación, hay que destacar que se estima la sensibilidad del virus completo, pudiéndose reflejar el efecto de partes del genoma que se pueden subestimar al estudiar sólo el gen *pol*. La desventaja más importante es que la obtención de la población viral del paciente es laboriosa. Además, los periodos prolongados de cultivo pueden favorecer la selección de subpoblaciones de variantes víricas mejor adaptadas al cultivo, que no tienen por qué ser representativas del conjunto de cuasiespecies que circulan en un individuo en un momento determinado (Arnedo y Pumarola, 2005), viéndose afectado el perfil de sensibilidad.

#### **Técnica de los virus recombinantes**

Entre las técnicas que utilizan virus recombinantes el primer ensayo fenotípico fue descrito por Kellam y Larder en 1994 (RVA, *recombinant virus assay*). Se trata de un ensayo rápido que valora la capacidad replicativa viral a diferentes concentraciones de inhibidores de la RT, sin necesidad de recurrir al aislamiento viral previo (Kellam y Larder, 1994).

En la actualidad existen tres sistemas disponibles en el mercado que permiten la determinación de resistencias a fármacos inhibidores de la proteasa y de la transcriptasa inversa (en el momento actual no disponen de prototipos que les permitan analizar la resistencia a inhibidores de la entrada).

**Antivirogram® (Virco)**

En este ensayo las partículas virales se producen mediante recombinación homóloga al cotransfectar en células el producto amplificado del plasma del paciente correspondiente a la PR y a la RT insertado en un plásmido deleccionado en dicha región. La recombinación origina la producción de un virus quimérico que presenta capacidad infecciosa y replicativa. La sensibilidad de este virus quimérico frente a un determinado fármaco se valora cuantificando la muerte celular que induce mediante el **ensayo de MTT**. El sustrato MTT, de coloración amarilla, es metabolizado por las mitocondrias de las células vivas en formazán, resultando un producto de color azul. La generación de formazán es directamente proporcional al número de células que sobreviven a la infección del virus en presencia de diferentes concentraciones del fármaco que se ensaya. Esta reacción colorimétrica se valora por espectrofotometría.

**PhenoSense® (ViroLogic)**

Este ensayo emplea el producto amplificado del plasma del paciente infectado correspondiente a una parte del gen *gag*, la secuencia codificante de la proteasa y de los primeros 313 aminoácidos de la transcriptasa inversa. Este fragmento es posteriormente clonado en un plásmido deleccionado en dicha región que contiene un gen que codifica para la **luciferasa**, integrado en la región en que se deleccionó el gen *env*. La técnica se realiza primero co-transfectando células huésped con el vector y tras la transfección, las partículas virales obtenidas se utilizan para infectar nuevas células diana.

La capacidad de los virus para completar un ciclo de replicación se cuantifica midiendo la actividad luciferasa en las células diana. Los fármacos que inhiben la replicación reducen la actividad luciferasa de forma dosis dependiente, produciendo una medida cuantitativa de la susceptibilidad a los fármacos.

**Phenoscript® (Viralliance)**

La diferencia principal de este sistema frente a los anteriores es la generación de virus recombinantes con la PR o la RT del paciente por separado. El plásmido utilizado se encuentra deleccionado en la región *gag-PR* o en la RT, y en la envuelta. El ensayo consiste, primeramente en la cotransfección en las células del provirus descrito y el producto amplificado (*gag-PR* o RT) a partir del plasma del paciente. Los pseudotipos virales obtenidos de la transfección se utilizan para infectar células que llevan un gen indicador inducible (LTR-LacZ) el cual permite mediante un ensayo colorimétrico valorar la infección del virus, ya que el gen *tat* del VIH induce la expresión de  **$\beta$ -galactosidasa**. La actividad de los inhibidores de la proteasa y de la transcriptasa

inversa se mide añadiendo diferentes concentraciones de los primeros a las células transfectadas y los segundos a las células diana. Si los virus recombinantes son resistentes a los fármacos, las células diana se infectan, el LTR del VIH es transactivado, induciendo la expresión de  $\beta$ -gal y cambian de color al añadir el sustrato. Si, por el contrario, el virus es sensible a los fármacos, las células no se infectan y no se produce cambio de color.

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

<b>Métodos genotípicos: ventajas</b>	<b>Métodos fenotípicos: ventajas</b>
Rapidez	Reflejo de todas mutaciones, incluso no descritas
Dificultad técnica media	Medida directa de la sensibilidad del VIH a los ARV
Menor coste económico	Útiles para cualquier fármaco
Mutación puede preceder a resistencia fenotípica	Información acerca de las resistencias cruzadas
	Resultados fáciles de interpretar
	Potencial medida de <i>fitness</i> viral y tropismo
<b>Métodos genotípicos: desventajas</b>	<b>Métodos fenotípicos: desventajas</b>
Algunos no detectan variantes minoritarias	No detectan variantes minoritarias (<10-20%)
Puede no existir correlación con análisis fenotípico	Lento, laborioso y de elevado coste
Desconocimiento efecto de resistencias cruzadas	Falta de estandarización
Respuesta variable de los pacientes a un fármaco	Puntos de corte clínicos no descritos o validados
Marcador indirecto de la sensibilidad a los ARV	Medidas de contención biológica
No válidos para nuevos fármacos hasta validación clínica y diseño de algoritmos de interpretación	Posible selección de variantes mejor adaptadas al cultivo celular
Requieren interpretación por un experto	

## 1.10.4 Interpretación de las mutaciones de resistencia

### 1.10.4.1. Interpretación de las pruebas genotípicas

Independientemente de la metodología utilizada para realizar la detección de mutaciones en la transcriptasa inversa, proteasa o envoltura, el punto crítico es la interpretación de los resultados. El elevado número de mutaciones diferentes, sus interacciones y las resistencias cruzadas entre los fármacos, así como la complejidad con la que se expresan los resultados genotípicos, pueden representar un problema incluso para los clínicos más expertos (Badri *et al.*, 2003).

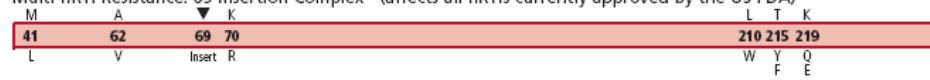
Al interpretar el genotipo se pretende predecir el fenotipo o, lo que hoy en día se considera prioritario, predecir la respuesta virológica.

El método más directo de interpretación del genotipo de resistencia es la **interpretación de experto**, que consiste en preguntar a un experto sobre la interpretación de las diferentes mutaciones y su impacto en el fenotipo y la respuesta virológica. Los dos problemas fundamentales para su aplicabilidad son la falta de disponibilidad en tiempo real y la falta de consistencia entre distintos expertos (Pérez-Elías, 2005) .

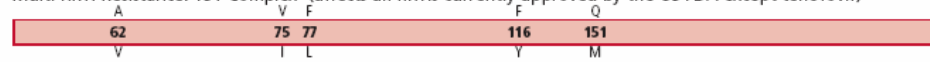
El sistema más básico para la interpretación de los estudios genotípicos son los **listados simples de mutaciones** relacionadas con resistencia a cada antirretroviral concreto (MacArthur, 2004; Saracino *et al.*, 2006). Entre estas listas cabe destacar las de la Sociedad Internacional de SIDA (**IAS**), (Gallant, 2005; Johnson *et al.*, 2005a; Johnson *et al.*, 2006), sociedad constituida por un panel de expertos cuyo objetivo es la identificación de mutaciones de resistencia de VIH. Publican regularmente unos esquemas (figuras 1.17.-1.20) con las mutaciones específicas de cada grupo de fármacos y de cada fármaco específico, destinadas a ayudar en la toma de decisiones terapéuticas. No obstante, indican que la evaluación de los resultados del estudio genotípico siempre se lleve a cabo considerando que 1) la presencia o ausencia de una mutación determinada sea coherente con la historia terapéutica del paciente; 2) en ausencia de presión terapéutica puede haber cepas resistentes presentes en niveles por debajo del límite de detección de la técnica utilizada (en este caso puede resultar útil el análisis de muestras congeladas que se hubiesen recogido bajo presión farmacológica); y 3) en un primer fracaso virológico aparecer resistencia únicamente a uno o dos de los fármacos, consecuencia de falta de adherencia, problemas farmacocinéticas o incluso error analítico (Johnson *et al.*, 2005b).

**Nucleoside and Nucleotide Reverse Transcriptase Inhibitors (nRTIs)<sup>1</sup>**

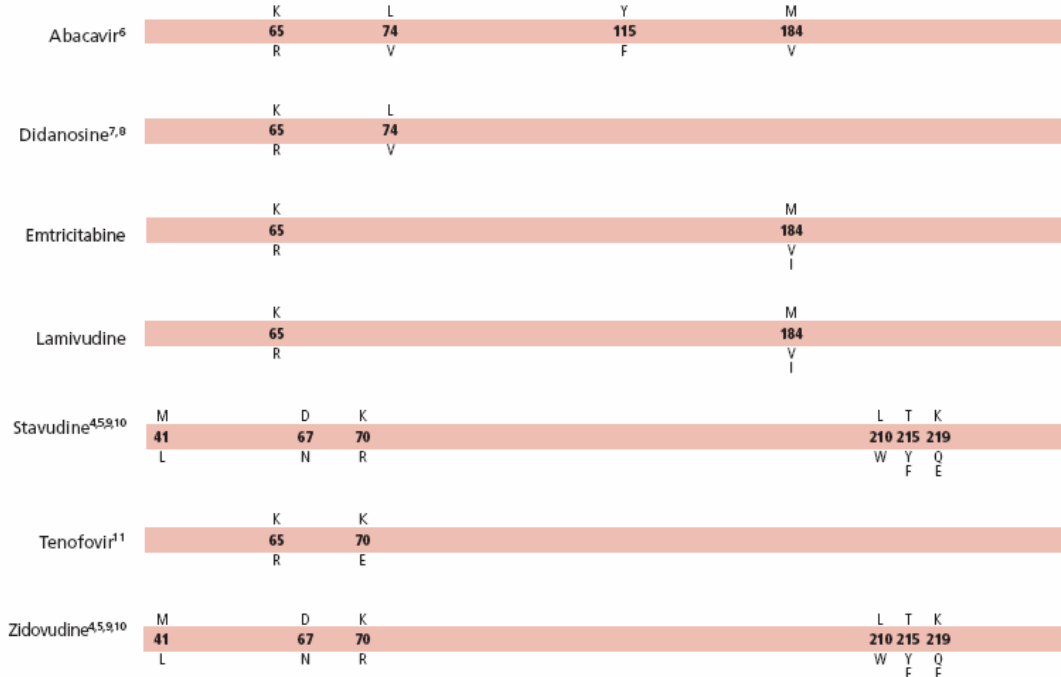
Multi-nRTI Resistance: 69 Insertion Complex<sup>2</sup> (affects all nRTIs currently approved by the US FDA)



Multi-nRTI Resistance: 151 Complex<sup>3</sup> (affects all nRTIs currently approved by the US FDA except tenofovir)

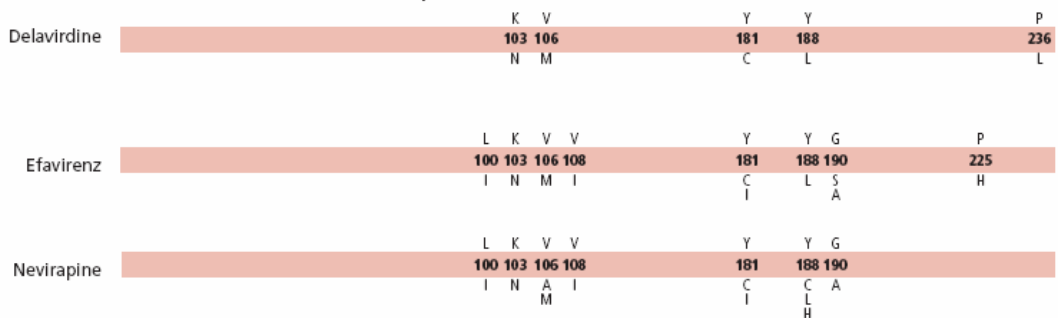


Multi-nRTI Resistance: Thymidine Analogue-associated Mutations<sup>4,5</sup> (TAMs; affect all nRTIs currently approved by the US FDA)



**Figura.1.17. Mutaciones de resistencia a ITIANs (Johnson *et al.*, 2006)**

**Nonnucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors (NNRTIs)<sup>1,12</sup>**



**Figura.1.18. Mutaciones de resistencia a ITINANs (Johnson *et al.*, 2006)**

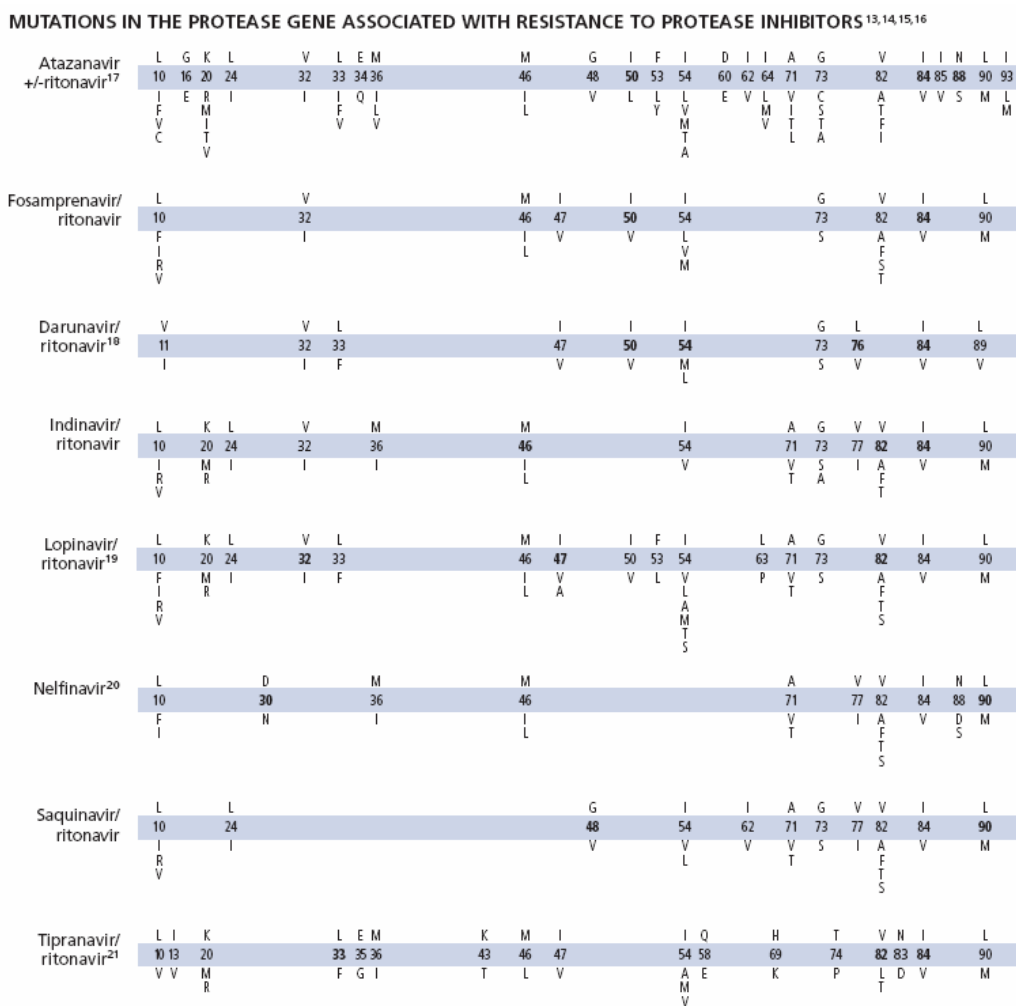


Figura.1.19. Mutaciones de resistencia a IPs (Johnson *et al.*, 2006)

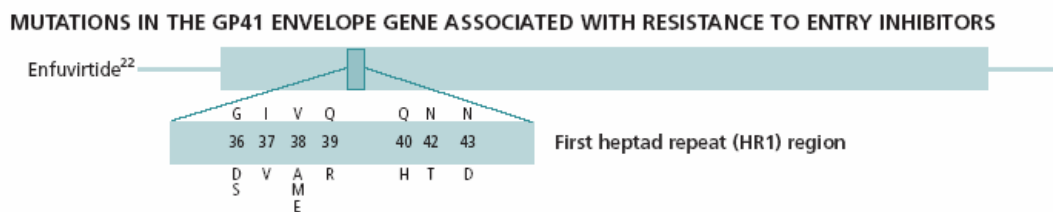


Figura.1.20. Mutaciones de resistencia a inhibidores de la fusión (Johnson *et al.*, 2006)

Un paso más en la interpretación de las mutaciones son los **sistemas basados en reglas** (MacArthur, 2004) que pueden ejecutarse manualmente o, más comúnmente, mediante programas informáticos (Van Laethem *et al.*, 2002). Estos últimos sistemas tienen como ventaja su rapidez, el no estar sujetos a la equivocación en presencia de múltiples mutaciones, siendo siempre los resultados consistentes, uniformes y objetivos. Deben ser actualizados regularmente, ajustándose a la gran velocidad con la que se dispone de nuevas evidencias.



La mejor forma de interpretar las mutaciones de resistencia a los antirretrovirales es mediante **algoritmos de interpretación basados en la respuesta clínica**. Actualmente, numerosos estudios de interpretación de resistencia genotípica a antirretrovirales utilizan como medida de respuesta terapéutica o *endpoint* los niveles plasmáticos de ARN de VIH (O'Brien *et al.*, 1996; Flandre *et al.*, 2004). Analizan el efecto de las mutaciones sobre la respuesta, que se puede definir como la reducción de los niveles de ARN desde el momento basal (Calvez *et al.*, 2002; Brun-Vezinet *et al.*, 2003; Blanco *et al.*, 2005) o el porcentaje de pacientes que alcanzan unos niveles de ARN por debajo del límite de cuantificación de la técnica empleada o el tiempo en presentar fracaso virológico (Joly *et al.*, 2002). Actualmente no existen este tipo de algoritmos para todos los fármacos y los que existen, no están suficientemente validados.

El principal problema que se está planteando en la actualidad y que genera gran preocupación entre los clínicos, que basan sus decisiones terapéuticas tan sólo en la interpretación que se les aporta conjuntamente con las mutaciones, son las **discordancias** que aparecen entre los diferentes sistemas de interpretación. Además, cada vez están proliferando más sistemas de interpretación, por lo que es más fácil que surjan discordancias. (De Luca *et al.*, 2003; Garcia *et al.*, 2003; Kijak *et al.*, 2003; Sturmer *et al.*, 2003; Torti *et al.*, 2003). Se han encontrado discrepancias principalmente para los inhibidores de la retrotranscriptasa como son la estavudina, didanosina y abacavir (Cabrera *et al.*, 2004; Zazzi *et al.*, 2004). Entre los IP, el lopinavir es uno de los inhibidores en el que se ha observado un mayor grado de discrepancia entre los diferentes sistemas de interpretación. En general para los no nucleósidos no suelen existir discordancias.

Otro sistema de interpretación de la resistencia genotípica es la utilización de **fuzzy rules**, que es un método matemático que ayuda a expresar el nivel de resistencia definido para cada fármaco por distintas reglas o algoritmos prediciendo la actividad de un régimen determinado (De Luca *et al.*, 2004).

Una nueva iniciativa para la interpretación de datos genotípicos son las **neural networks** que se basan en grandes bases de datos en la que se combinan genotipos basales, el tratamiento antirretroviral pautado y respuesta virológica de un mismo paciente (Wang y Larder, 2003). Estas bases de datos se logran con el establecimiento de cohortes de resistencias a nivel nacional y la coordinación de éstas con cohortes europeas (Beerenwinkel *et al.*, 2005).

A continuación se muestran distintos sistemas de interpretación de resistencia genotípica (De Luca y Perno, 2003; Valer, 2005; Liu y Shafer, 2006).

**Tabla 1.9. Sistemas de interpretación genotípica**

Nombre	Web
IAS-USA Resistance Guidelines	<a href="http://www.iasusa.org">www.iasusa.org</a>
ANRS	<a href="http://www.hivfrenchresistance.org">www.hivfrenchresistance.org</a>
HIVdb (Stanford)	<a href="http://hivdb.stanford.edu">http://hivdb.stanford.edu</a>
Retrogram (Virology Networks)	<a href="http://www.retrogram.com">www.retrogram.com</a>
Trugene HIV-1 (Bayer Diagnostic)	<a href="http://www.Trugene.com">www.Trugene.com</a>
Algoritmo GeneSeq HIV (Virologic)	<a href="http://www.virologic.com">www.virologic.com</a>
ViroSeq (Abbott)	<a href="http://www.abbottdiagnostics.com">www.abbottdiagnostics.com</a>
Rega Institute System	<a href="http://www.kuleuven.be/rega/cev/links/rega_algorithm/index.htm">www.kuleuven.be/rega/cev/links/rega_algorithm/index.htm</a>

#### 1.10.4.2. Interpretación de las pruebas fenotípicas

Los resultados de las pruebas fenotípicas se expresan en forma de sensible, intermedio y resistente, que son términos más familiares para los clínicos. Hasta hace muy poco, las pruebas de resistencia fenotípica han utilizado **puntos de corte técnicos**, basados en la variabilidad intraensayo de las respectivas técnicas, utilizando una cepa de laboratorio como referencia. Para desarrollar puntos de corte más significativos, Virco determinó la  $CI_{50}$  mediante un antivirograma a 1000 pacientes que no habían recibido tratamiento y varios miles más que no tenían resistencia demostrada. Se calculó la media de las  $CI_{50}$  y se establecieron los nuevos puntos de corte, ahora denominados **biológicos**, como 2 desviaciones estándar por encima de la media. Se obtuvieron así puntos de corte diferentes para cada fármaco. Pero el avance más importante ha sido el establecimiento de puntos de corte **clínicos**, que se definen como valor de la  $CI_{50}$  por encima del cual la probabilidad de respuesta virológica disminuye. Estos puntos de corte se establecen en base a la correlación de la  $CI_{50}$  a un antirretroviral con la respuesta clínica medida en términos de descenso de la carga viral en un determinado periodo de tiempo. El punto de corte se expresa como actividad plena, parcial o no actividad (Pérez-Elías, 2005). Es el punto de corte ideal, pero la realidad es que no siempre existe una relación binaria resistencia-falta de respuesta, sino que esto más bien es un fenómeno continuo, por lo que se hace necesario definir intervalos que definan varias posibilidades de respuesta. Actualmente

se han establecido puntos de corte clínicos para abacavir, tenofovir, lopinavir/ritonavir, indinavir/ritonavir y tipranavir. Todavía no se han derivado puntos de corte para todos los fármacos, especialmente para nuevos IPs potenciados y para antiguos IPs que han cambiado su formulación y dosificación, como el saquinavir.

#### 1.10.4.3. Correlación genotipo-fenotipo

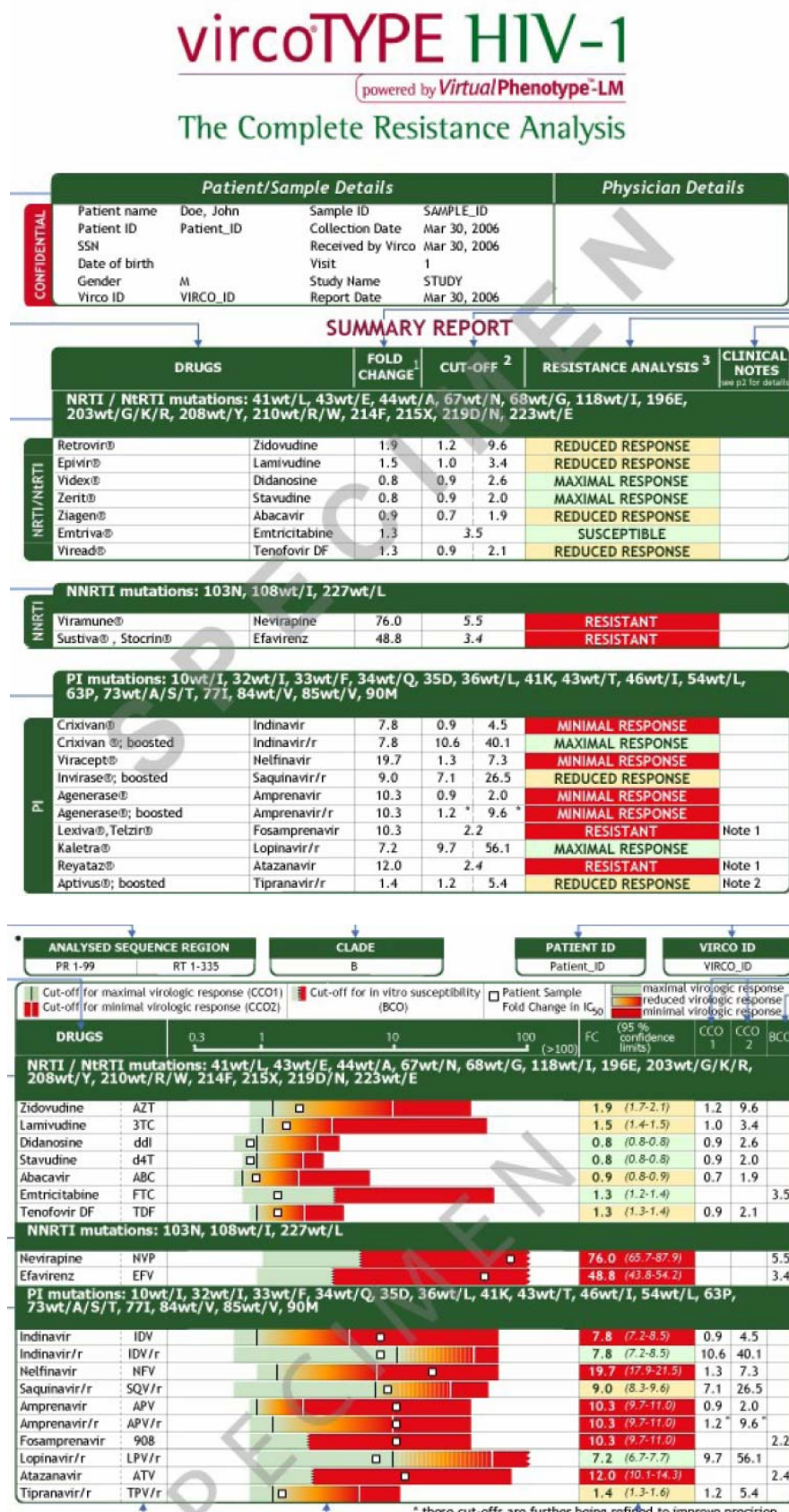
Otro sistema para la interpretación de los estudios genotípicos es la **correlación automática genotipo-fenotipo**. Esta aproximación intenta evitar la interpretación personal, y que sea una base de datos relacional (en la que están unidos los genotipos y fenotipos correspondientes a una misma cepa) la que prediga el fenotipo, mediante un análisis automatizado.

El **fenotipo virtual** (registrado y comercializado como VircoType®, anteriormente Virtualphenotype®) es un sistema cuantitativo para predecir el fenotipo a partir del genotipo. Se realiza un genotipo y la secuencia resultante se envía vía Internet a la base de datos de Virco, donde están unidos más de 30000 pares de genotipos/fenotipos; se identifican las secuencias coincidentes, se extraen y se calcula la  $CI_{50}$  media de todos los coincidentes.

El fenotipo virtual resolvería la complejidad de realización del fenotipo y, por otra parte, resolvería el problema de interpretación del genotipo, dándonos la información como si se tratara de un fenotipo. Sin embargo, hoy por hoy el establecimiento de puntos de corte con significado clínico es uno de los retos del fenotipo virtual, que están intentando resolver mediante el análisis de las respuestas virológicas en pacientes con mutaciones. La última actualización, de 2005, incorpora puntos de corte clínicos, define la resistencia a un fármaco de un modo continuo en vez de hacer una interpretación dual e incorpora información sobre la resistencia a inhibidores de la proteasa potenciados con ritonavir.

Una limitación que tiene este sistema es que se requiere un periodo de tiempo mientras se van describiendo las mutaciones que afectan al fenotipo de fármacos experimentales o recién comercializados, así como para que se genere un número suficiente de pares genotipo/fenotipo de cepas que han desarrollado resistencias.

Figura.1.21. Informe de interpretación de resistencias de Fenotipo Virtual



En el informe obtenido indican:

- las mutaciones de resistencia en el gen de la proteasa y de la transcriptasa inversa del virus analizado, agrupadas por tipo de fármaco (ITIAN, ITINAN, IP).
- El número de virus de la base de datos de Virco que tiene un patrón de mutaciones similar al del virus de muestra y, sobre los que se basa la predicción.
- El *fold change*, es decir, la variación estimada en la  $CI_{50}$ .
- La región de la secuencia analizada, los aminoácidos de los genes de PR y RT que fueron cubiertos por el análisis.
- La clasificación del virus, el subtipo o CRF, que lo determinan comparando la secuencia de la región *pol* del virus de muestra con secuencias de referencia específicas de la base de datos de Los Alamos National Laboratory.
- Los valores de corte clínicos (CCO=*Clinical Cut-Offs*), que se derivan de observaciones clínicas en pacientes tratados. Si no hay CCO disponible dan un valor de corte biológico (BCO=*Biological Cut-Off*). Aportan una representación gráfica del espectro de resistencia. Mediante barras coloreadas representan el rango dinámico de valores de resistencia del fármaco (van desde el FC de un virus *wild type* hasta el percentil 97,5 de los valores FC estimados).
- Una definición de respuesta: mínima respuesta, respuesta reducida, máxima respuesta.

Otra base de datos relacional es **Geno2pheno**, que recientemente ha incorporado al sistema un software que aplica predicciones de resistencia fenotípica a datos clínicos y evalúa las combinaciones farmacológicas en base a los cambios en la carga viral que se predicen (Beerenwinkel *et al.*, 2005).

### 1.10.5 Utilidad en la práctica clínica

Las pruebas de detección de resistencias han alcanzado un desarrollo tecnológico suficiente como para ser realizadas rutinariamente en la práctica clínica, aportando un gran beneficio clínico (Haupts *et al.*, 2003).

Varios grupos de expertos a nivel internacional, el Grupo Europeo de Resistencias (Euroguidelines), la Sociedad Internacional de SIDA (IAS) (Gallant, 2005), el Panel de Tratamiento y Práctica Clínica del Departamento de Salud Americano (DHHS, 2006), y nacional, GESIDA (Iribarren *et al.*, 2004), han elaborado unas normas para la utilización más eficiente de las pruebas de resistencia:

**A) Pacientes naïve:**

1.- Infección aguda o reciente: se recomienda su empleo cuando se decide iniciar tratamiento. Permite detectar la posible transmisión de cepas resistentes y así modificar el régimen antes de que éste fracase, evitando de este modo la terapia subóptima y una consecuente acumulación de resistencias. Generalmente se recomienda realizar un test genotípico debido a la mayor rapidez en la obtención de los resultados.

2.- Infección crónica: se recomienda su empleo antes de iniciar tratamiento. Se desconoce exactamente la velocidad con la que las mutaciones asociadas a resistencia reversionen a virus *wild type*, pero las mutaciones presentes en el momento de la transmisión del VIH son más estables que aquellas seleccionadas bajo presión farmacológica y, a menudo, es posible detectar mutaciones de resistencia en virus que se transmitieron varios años atrás.

**\* Transmisión de resistencias**

El estudio de resistencias supone una herramienta fundamental para la vigilancia epidemiológica de resistencias primarias en la población. Existe un porcentaje de pacientes VIH que pueden estar infectados por virus ya resistentes incluso antes de comenzar algún tratamiento antirretroviral. La transmisión de cepas de VIH resistentes varía dependiendo de las características de los pacientes, así como de la zona geográfica: en EEUU un 16-22% (Weinstock *et al.*, 2004; Viani *et al.*, 2006) y en Europa un 9-10% (de Mendoza *et al.*, 2005; Oette *et al.*, 2006) de los nuevos diagnósticos presentan resistencia a alguna de las tres clases principales de antirretrovirales, a pesar de que las cifras aquí parecen estar estabilizándose.

La detección de resistencias en pacientes naïve es coste-eficaz cuando la prevalencia de resistencia en esta población es superior al 5% (Novak *et al.*, 2005), o según recientemente se ha publicado, por encima del 1% (Sax *et al.*, 2005).

**B) Pacientes con tratamiento antirretroviral:**

El estudio de resistencias es útil para dirigir decisiones terapéuticas en pacientes con fracaso virológico, mientras están recibiendo tratamiento. Sirve para optimizar el régimen con el mayor número de fármacos activos, con actividad parcial o con actividad temporal (por reversión de una resistencia previa), intentando no malgastar fármacos que pudieran ser esenciales en un posible régimen posterior.

Se pueden diferenciar dos situaciones dentro de los pacientes en fracaso virológico: Primer fracaso: se suelen detectar resistencias a una sola familia de fármacos y las posibilidades de crear un régimen totalmente supresivo son altas.

Múltiples fracasos: el panorama es diferente y las opciones terapéuticas muy restringidas.

Por lo tanto, es crucial diseñar estrategias que eviten o retrasen la selección de mutaciones que causen resistencias cruzadas y que limitarían la eficacia de los regímenes terapéuticos posteriores. Además, determinadas interacciones entre mutaciones pueden parcialmente restaurar la susceptibilidad a fármacos pudiendo éstos utilizarse aun a pesar de la presencia de genotipo resistente (Cabrera y Clotet, 2006).

La utilidad clínica de las pruebas de resistencia ha sido estudiada en diversos trabajos para ver el impacto, en cuanto a evolución viro-inmunológica, de la realización del test de resistencia en el cambio de tratamiento antirretroviral en pacientes con fracaso a un régimen previo en comparación con el cambio de terapia guiado por criterios clínicos (*standard of care*). Los distintos trabajos presentaban diferencias metodológicas, como el diseño, la experiencia terapéutica de los pacientes, el método de detección de resistencias, la existencia o no de consejo experto, la duración del seguimiento y la forma de medida de la respuesta terapéutica.

Diversos estudios han demostrado el beneficio virológico de la realización de un test de resistencias frente a no realizarlo, a la hora de guiar el nuevo régimen terapéutico (Viradapt, Gart, Havana y Argenta). Otros, sin embargo, no han podido demostrar una mejora en la repuesta virológica (Kaiser, VIRA3001, Narval, CCTG575 y CERT) (Vandamme *et al.*, 2004).

### **C) Embarazo:**

Las recomendaciones del IAS y las guías europeas indican explícitamente la utilización de pruebas de resistencias en las mujeres embarazadas con carga viral detectable para optimizar el régimen de tratamiento e impedir la transmisión perinatal (Pérez-Elías, 2005). La DHHS recomienda el estudio de resistencias genotípicas para todas las embarazadas antes de iniciar una terapia, así como para aquellas que tienen carga viral detectable y vayan a quedarse embarazadas (DHHS, 2006). La guía nacional las recomienda para todas las mujeres embarazadas (Iribarren *et al.*, 2004).

### **D) Pacientes pediátricos:**

El grupo europeo recomienda realizar el test de resistencias en niños con carga viral detectable antes del inicio o cambio de tratamiento. Consideran que la elección del

tratamiento más adecuado es incluso más importante que en adultos puesto que existen menos opciones terapéuticas.

### E) Profilaxis postexposición:

Se realiza en la muestra del paciente fuente aunque no se debe demorar el inicio del tratamiento por esperar a los resultados.

En la tabla 1.11 se muestra un resumen de las posibles situaciones en las que se plantea la realización de un test de resistencias.

**Tabla 1.10. Recomendación de estudio de resistencias en la práctica clínica por distintos grupos (Iribarren *et al.*, 2004; DHHS, 2006; Hammer *et al.*, 2006)**

Situación	GESIDA	DHHS	IAS
Fallo primer régimen	Recomendado	Recomendado	Recomendado
Fallo siguientes regímenes	Recomendado	Recomendado	Recomendado
Infección aguda	Recomendado	Recomendado	Recomendado
Infección crónica no tratados	----	Recomendado	Considerar
Embarazo	Recomendado	Recomendado	Recomendado
Profilaxis postexposición	Considerar caso fuente	----	----

Otra ventaja del uso de los tests de resistencia es su integración en el proceso de desarrollo de nuevos fármacos antirretrovirales. La caracterización de la actividad del nuevo fármaco frente a distintas cepas y distintos patrones de resistencia es un paso más del proceso y la aprobación definitiva se otorga si el fármaco muestra eficacia frente a virus de pacientes con opciones terapéuticas limitadas debido a resistencia (Richman, 2004).

En cualquier caso, la consideración de resistencias en la práctica clínica debe tener en cuenta los siguientes aspectos: 1) se precisan estudios de coste-efectividad; 2) se requiere una mayor formación en el campo de las resistencias y una mayor colaboración entre clínicos y básicos; 3) los resultados han de mostrarse de forma inteligible; 4) deben existir laboratorios de referencia sometidos a controles de calidad; 5) se precisan estudios periódicos de vigilancia epidemiológica de prevalencia de resistencias primarias en la población.

#### 1.10.6 Resistencia en subtipos no-B

Las reglas de interpretación de la resistencia a inhibidores de la proteasa, están definidas en base al subtipo B. Todas las mutaciones que incluyen han sido definidas tras haberse analizado su efecto sobre la respuesta *in vitro* o *in vivo* en cepas de este subtipo. En su denominación, la letra que precede al número de mutación, es indicativa del aminoácido encontrado en la secuencia consenso *wild-type* de subtipo B. La secuencia consenso de un subtipo se obtiene del alineamiento y



comparación de secuencias de pacientes no tratados para predecir los aminoácidos específicos más frecuentes en cada posición (Kantor y Katzenstein, 2003).

En los últimos años, con el aumento de pacientes infectados por otros subtipos, se ha podido observar que determinados cambios en el gen de la proteasa recogidos en estas reglas como mutaciones de resistencia, son en realidad polimorfismos naturales específicos de subtipos no-B (Shafer, 2003).

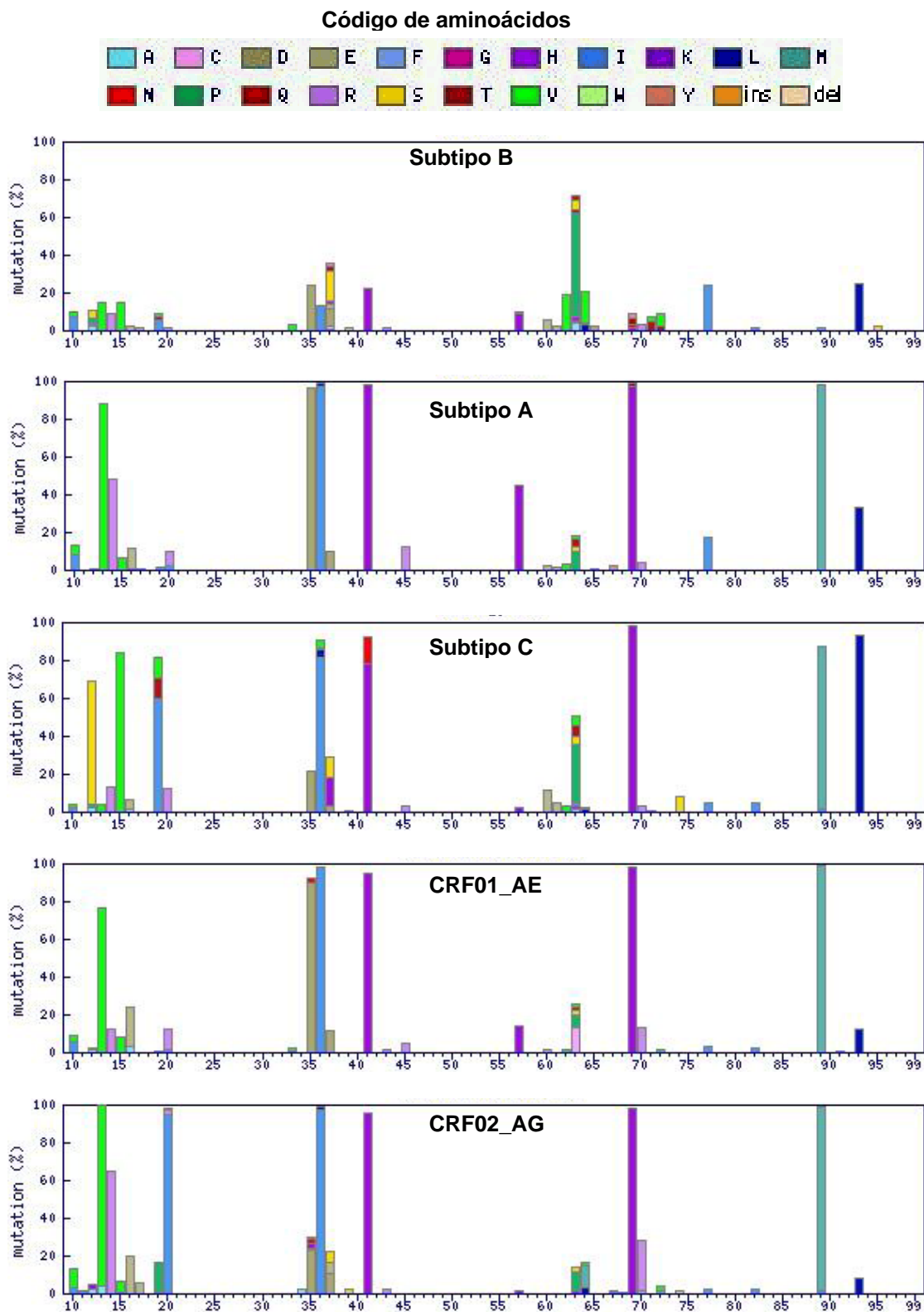
Los polimorfismos son mutaciones con respecto a la secuencia consenso del subtipo evaluado, que aparecen en más de un 1% de las secuencias de pacientes naïve. Los polimorfismos específicos de subtipo son mutaciones que aparecen de manera significativa con una mayor prevalencia en pacientes no tratados infectados por los distintos subtipos no-B que en aquellos infectados por subtipo B. De no ser así, se habla de mutaciones específicas de subtipo asociadas al tratamiento (Kantor *et al.*, 2005). La distinta prevalencia de estos polimorfismos y mutaciones puede llevar a diferencias en la resistencia y, por tanto, en la respuesta al tratamiento.

Los subtipos difieren uno de otro en un 10-12% de sus nucleótidos y 5-6% de los aminoácidos que forman parte de la proteasa y de la transcriptasa inversa. Estas diferencias pueden influir por tanto en las mutaciones que desarrollen bajo presión farmacológica (Kantor *et al.*, 2005)

Los aminoácidos más variables suelen encontrarse distantes del centro activo y no directamente implicados en procesos catalíticos o interacciones funcionales con otras moléculas. De esta forma, los polimorfismos genéticos suelen aparecer en esas zonas menos críticas para la actividad enzimática, mientras que los residuos altamente conservados en las enzimas están en su mayoría directamente implicados en la función biológica de la misma.

Se han realizado numerosos estudios con el fin de poder comprobar si realmente se trata de cambios genéticos característicos de estos subtipos. Éstos comparan la presencia de estos cambios en subtipos B y no-B, considerando tanto pacientes pretratados como pacientes que no hayan tenido ninguna experiencia con tratamiento pudiendo. Estos trabajos han comunicado una alta prevalencia de determinados polimorfismos en pacientes naïve de los diferentes subtipos, demostrando, por tanto, que tales cambios podrían considerarse polimorfismos naturales (Holguin *et al.*, 2004; Kantor y Katzenstein, 2004; Mascolini, 2005). A modo de ejemplo se representa en la figura 1.22, la prevalencia de estos polimorfismos detectados en pacientes naïve infectados por distintos subtipos no-B, frente al subtipo B (Shafer *et al.*, 2007).

Figura 1.22. Prevalencia de polimorfismos en el gen de la proteasa detectados en pacientes naïve en los subtipos B, A, C, CRF01\_AE y CRF02\_AG



Se han hallado numerosas discordancias al aplicar los sistemas de interpretación genotípica de resistencia disponibles en la actualidad en pacientes infectados por subtipos no-B (Snoeck *et al.*, 2006; Vergne *et al.*, 2006). Éstas podrían atribuirse a la presencia de combinaciones de mutaciones específicas de subtipo. Dado que actualmente las decisiones terapéuticas se fundamentan en los resultados de los sistemas de interpretación desarrollados para subtipo B, se requieren **sistemas de interpretación** genotípica específicos para los subtipos no-B que permitan predecir el **impacto** del subtipo infectante **sobre la respuesta clínica** (Liu y Shafer, 2006).

## **2. OBJETIVOS**



## 2. OBJETIVOS

En el marco de los antecedentes expuestos en el capítulo de Introducción, se ha planteado el trabajo experimental de la presente Tesis, proponiendo los siguientes objetivos.

El análisis de las mutaciones presentes en nuestra población y su efecto sobre la respuesta virológica nos permitirá desarrollar algoritmos de interpretación genotípica que corroboren los *scores* previamente definidos por otros grupos de estudio, así como conocer mutaciones que puedan no estar incluidas en dichos *scores* pero que estén relacionadas con la pérdida de eficacia de algún antirretroviral en nuestra población.

Con la realización de este trabajo pretendemos también contribuir en el conocimiento de la epidemiología de la infección VIH en Andalucía Oriental, donde en los últimos años ha tenido lugar un aumento de casos de infecciones por subtipos no-B de VIH. El estudio de los polimorfismos presentes de forma natural en el gen de la proteasa en estos subtipos puede determinar en gran medida la actividad de los fármacos inhibidores de la proteasa, por ello su estudio en nuestro medio es necesario para la optimización de los regímenes terapéuticos utilizados en estos pacientes.

1. Desarrollo de **algoritmos de interpretación** de mutaciones de resistencia a tenofovir, didanosina, estavudina, lopinavir/ritonavir y fosamprenvir/ritonavir.
2. Vigilancia epidemiológica de la introducción de **subtipos no-B** en Andalucía Oriental. Estimación interanual de la prevalencia de subtipos no-B de VIH-1, caracterización de los pacientes infectados por subtipos no-B en nuestra población y estudio de polimorfismos en el gen de la proteasa.



### **3. PACIENTES Y MÉTODOS**





### 3.1. Definición de algoritmos de interpretación

#### 3.1.1. Pacientes

Se recogieron de forma retrospectiva datos de pacientes infectados por VIH, multitratados, en fracaso terapéutico y a los cuales se les hubiese realizado un estudio de resistencias tras el cual hubiesen iniciado un nuevo régimen terapéutico. Dicho nuevo régimen debía incluir el fármaco para el cual se quería desarrollar un algoritmo de interpretación de mutaciones de resistencia. Se incluyeron únicamente aquellos pacientes a los que se les podía evaluar la respuesta virológica y que, por tanto, debían presentar datos de carga viral basal, estudiada en el momento de realización del estudio genotípico de resistencias, así como a los tres o seis meses tras el inicio del tratamiento.

Se desarrollaron algoritmos de interpretación para didanosina (ddI), estavudina (d4T) o tenofovir (TDF) como fármacos inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos/nucleótidos y como inhibidores de la proteasa se estudiaron lopinavir/ritonavir (LPVr) y fosamprenavir/ritonavir (FPVr). No se consideraron zidovudina (AZT), zalcitabina (ddC), abacavir (ABC), indinavir (IDV), nelfinavir (NFV), saquinavir (SQV) ni atazanavir (ATZ) por no contar con series de pacientes suficientemente grandes para poder llevar a cabo el estudio. Tampoco se desarrolló un algoritmo de interpretación para lamivudina (3TC), nevirapina (NVP) ni efavirenz (EFV) por tratarse de fármacos para los cuales ya están bien definidas las mutaciones que condicionan resistencia a los mismos y porque además el fracaso a éstos no requiere acumulación de mutaciones.

Para la realización del estudio, excepto para fosamprenavir/ritonavir, se utilizó una base de datos que incluía datos de pacientes VIH recogidos desde marzo de 2002 hasta octubre de 2003 en distintos hospitales de Andalucía: Hospital de Torrecárdenas y Hospital de Poniente, de Almería; Hospital Clínico Virgen de la Victoria, Hospital Carlos Haya y Hospital de Marbella, de Málaga; Hospital Virgen del Rocío, Hospital Virgen de Valme y Hospital Virgen de la Macarena, de Sevilla; Hospital Puerta del Mar, Hospital de Jerez y Hospital de La Línea, de Cádiz; Hospital Juan Ramón Jiménez, de Huelva; y Hospital Virgen de las Nieves y Hospital Clínico San Cecilio, de Granada, siendo este último el hospital desde el cual se coordinó toda la recogida de datos y donde realizamos el trabajo de investigación. Del total de hospitales, los laboratorios en los que se realizaron los estudios de resistencias genotípicas solicitados por los distintos centros fueron el Hospital Virgen de Valme, Hospital Virgen de la Macarena, Hospital Virgen de la Victoria y Hospital Clínico San Cecilio.

Se recogieron datos de un total de 258 pacientes. Todos ellos presentaban datos de niveles plasmáticos de ARN en el momento basal y a los tres y/o seis meses tras el estudio genotípico de resistencia. Se excluyeron del estudio 15 pacientes que presentaban una carga viral basal <400 copias/mL, considerando que el límite de detección de niveles de ARN según la técnica de cuantificación utilizada por cada hospital era 50, 200 ó 400 copias/mL. Por tanto, para la realización de este estudio partimos de una base de datos de 243 pacientes infectados por VIH, todos ellos con una carga viral basal en el momento de la realización del test genotípico >400 copias/mL.

En el régimen terapéutico posterior al estudio de resistencias, al cual estuvieron sujetos en todos los casos de forma ininterrumpida, del total de los 243 pacientes, 158 tenían incluido tenofovir (153 con dato de carga viral a los tres meses y 123 con el dato a los seis meses); 138 didanosina (137 con dato de carga viral a los tres meses y 104 a los seis meses); 76 estavudina (75 con dato de carga viral a los tres meses y 54 a los seis meses); y 129 lopinavir/ritonavir (123 con dato de carga viral a los tres meses y 98 a los seis meses).

La base de datos utilizada para el desarrollo del algoritmo de interpretación de fosamprenavir/ritonavir contenía datos de pacientes en tratamiento con este fármaco recogidos desde mayo de 2004 a diciembre de 2005 en distintos hospitales nacionales: Palma de Mallorca, Barcelona, Gerona, Tarragona, Alicante, Valencia, Murcia, Almería, Cádiz, Córdoba, Granada, Jaén, Málaga, Sevilla, Cáceres, Coruña, Pontevedra, Asturias, Cantabria, Álava, Vizcaya, La Rioja, Huesca, Zaragoza, Valladolid, Madrid, Tenerife y Las Palmas de Gran Canaria.

Se recogieron datos de 384 pacientes que tenían fosamprenavir incluido en su tratamiento posterior al estudio de resistencias, dentro de un programa de acceso expandido de este fármaco. Depuramos esta base de datos inicial eliminando los casos en los que la carga viral basal era inferior a 200 copias/mL, así como aquellos en los que no constaba el seguimiento de carga viral. También se eliminaron aquellos casos en que el tiempo transcurrido entre la realización del genotipo y el comienzo del tratamiento con fosamprenavir superó los 2 años. Así, el estudio se pudo realizar finalmente con 203 pacientes.

Se recogieron diversos datos de interés de los pacientes: demográficos (edad; sexo; para fosamprenavir se pudo recoger además el grupo de riesgo de transmisión de la infección), analíticos (niveles basales de ARN de VIH, a los tres y seis meses; recuento de CD4 basales, a los tres y seis meses), terapéuticos

(tratamientos previo y posterior al estudio de resistencias; adherencia; número de fracasos; líneas de tratamiento previas) y genotípicos (mutaciones de resistencia a ITIANs, ITINANs e IPs así como datos de la interpretación de dichas mutaciones).

Las características de los pacientes de la base de datos general se muestran en la tabla 3.1.

<b>Tabla 3.1. Características de los pacientes de la base de datos general</b>	
Sexo (varones)	79,4%
Edad	40 (13-69)
Media CD4 basales (n <sup>o</sup> céls/mm <sup>3</sup> )	322,00 (19-1511)
Media CD4 3 meses (n <sup>o</sup> céls/mm <sup>3</sup> )	324,50 (12-1237)
Media CD4 6 meses (n <sup>o</sup> céls/mm <sup>3</sup> )	322,00 (4-1406)
Media Carga Viral basal (log <sub>10</sub> copias/mL)	4,01 (2,65-6,14)
Media Carga Viral 3 meses (log <sub>10</sub> copias/mL)	2,58 (1,30-5,69)
Media Carga Viral 6 meses (log <sub>10</sub> copias/mL)	2,62 (1,30-5,88)
Adherencia: >80%	58,7
<80%	16,9
Dato perdido	24,4
N <sup>o</sup> Fracasos (%): 1 fracaso	18,3
2 fracasos	35,3
multifracaso	46
N <sup>o</sup> líneas tratamiento (%): 2 líneas	4,5
3 líneas	4,9
4 líneas	3,7
5 líneas	2,9
>5 líneas	17
Dato perdido	66,7

Las características de los pacientes del estudio de fosamprenavir se muestran en la tabla 3.2.

<b>Tabla 3.2. Características de los pacientes estudio fosamprenavir</b>	
Sexo (varones)	78%
Edad	42 (18-77)
Grupo riesgo (%): UDVP	44,0
Homosexual	25,4
Heterosexual	25,0
UDVP+Heterosexual	1,3
Transfusión sanguínea	1,3
Transmisión vertical	0,4
Desconocido	2,6
Media CD4 basales (n <sup>o</sup> céls/mm <sup>3</sup> )	268 (1-957)
Media CD4 3 meses (n <sup>o</sup> céls/mm <sup>3</sup> )	315 (4-2000)
Media Carga Viral basal (log <sub>10</sub> copias/mL)	4,21 (2,32-5,00)
Media Carga Viral 3 meses (log <sub>10</sub> copias/mL)	2,42 (1,60-5,00)
Adherencia: ≥95%	77
76-94%	10
≤75%	13

Con respecto a los **tratamientos previos** al estudio genotípico de resistencias, únicamente obtuvimos información del tratamiento específico inmediatamente anterior a dicho estudio. No pudimos obtener datos concretos de cada uno de los regímenes anteriores y, por consiguiente, no fue posible conocer exactamente la experiencia terapéutica de cada paciente.

Al analizar el tipo de régimen terapéutico más frecuentemente empleado en el **rescate**, del que el fármaco en estudio formaba parte, observamos en las tablas 3.3 y 3.4 que la combinación de 2 ITIANs + 1 IP fue la más común. Así, tanto el tenofovir, como la didanosina o la estavudina aparecían acompañados en la mayoría de los casos por otro análogo y un inhibidor de la proteasa. De la misma forma, los inhibidores de la proteasa LPVr y FPVr aparecían fundamentalmente acompañados por 2 análogos. Otra pauta terapéutica también empleada con frecuencia fue la compuesta por 2 ITIANs+1 ITINAN.

**Tabla 3.3. Tipo de régimen en que están incluidos los ITIAN en estudio**

	TDF	DDI	D4T
+1ITIAN+1IP	53,8%	60,8%	67,1%
+1 ITIAN + 1ITINAN	13,9%	15,9%	6,5%
+1 ITIAN +1ITINAN +1IP	2,5%	2,8%	3,9%
+2 ITIAN s	10,7%	7,9%	10,5%
+2 ITIAN s+1IP	10,1%	11,6%	11,8%
+1 ITINAN +1 IP	6,9%	0,7%	---
+1IP	0,6%	---	---
+2 IP	1,2%	---	---

**Tabla 3.4. Tipo de régimen en que están incluidos los IPs en estudio**

	LPVr	FPVr
+1 ITIAN +1IP	2,3%	5,2%
+2 ITIAN s +1IP	---	2,1%
+1 ITIAN	1,5%	0,4%
+1 ITIAN +1ITINAN	6,9%	4,3%
+2 ITIAN s	76,7%	37,9%
+2 ITIAN s+1ITINAN	1,5%	10,7%
+3 ITIAN s	10,8%	25%
+3 ITIANs+1ITINAN	---	7,5%
+4 ITIAN s	---	6,5%

Al observar los fármacos concretos que más frecuentemente acompañaban al fármaco en estudio, como análogos cabe destacar el uso de TDF, seguido de DDI y d4T; como no análogos efavirenz se empleó con una frecuencia mayor a la nevirapina. Por último, el IP más empleado fue LPVr. Estos resultados se muestran en la tabla 3.5.

Tabla 3.5. Fármacos acompañantes de los fármacos estudiados

	TDF	DDI	D4T	LPVr	FPVr
AZT	5,7%	5,1%	2,6%	8,5%	14,2%
3TC	14,6%	18,8%	14,5%	23,3%	44%
DDC	1,3%	1,4%	0,0%	1,6%	0,9%
D4T	24,1%	25,4%	-----	31,0%	42,7%
DDI	53,8%	-----	46,1%	58,9%	52,2%
ABC	15,2%	9,4%	11,8%	13,2%	25%
TDF	-----	61,6%	50,0%	64,3%	69,4%
NVP	5,1%	3,6%	2,6%	2,3%	11,6%
EFV	17,7%	14,5%	3,9%	6,2%	13,4%
IDVr	2,0%	1,1%	1,1%	0,0%	0,4%
NFV	4,4%	4,3%	9,2%	0,0%	4,3%
SQVr	6,3%	5,6%	5,3%	0,8%	6,5%
LPVr	52,5%	55,1%	52,6%	-----	19,8%
APVr	5,2%	6,2%	3,9%	1,6%	-----
ATZr	2,5%	0,7%	2,6%	0,8%	7,3%
T20	3,2%	2,2%	0,0%	1,6%	17,2%

Al observar la situación genotípica de partida de los pacientes al iniciar el trabajo de desarrollo de algoritmos de interpretación, se aprecia una alta prevalencia de mutaciones de resistencia a ITIANs, ITINANs e IPs, como se muestra en la tabla 3.6.

Tabla 3.6. Prevalencia de mutaciones basales (%; media y rango)

	Mutaciones RT		Mutaciones ITIANs		NAMs		Mutaciones ITINANs		Mutaciones PR		UPAMs	
	%	Media (Rango)	%	Media (Rango)	%	Media (Rango)	%	Media (Rango)	%	Media (Rango)	%	Media (Rango)
TDF	100%	5 (1-11)	100%	4(1-10)	92,4%	3(0-7)	72,2%	1(0-5)	89,9%	5(0-11)	69,6%	1(0-3)
DDI	100%	5 (1-10)	99,3%	4(0-9)	89,1%	3(0-7)	70,1%	1(0-4)	93,4%	5(0-11)	75%	1(0-3)
D4T	98,7%	5 (0-11)	97,4%	4(0-8)	81,6%	2(0-7)	71,1%	1(0-5)	90,8%	5(0-11)	74,7%	1(0-3)
LPVr	99,2%	5 (0-10)	97,7%	4(0-10)	85,3%	3(0-6)	72,9%	1(0-4)	90,7%	5(0-10)	73,4%	1(0-3)
FPVr	97,8%	5 (0-13)	91,4%	3(0-9)	72%	3(0-7)	71,6%	1(0-6)	90,1%	4(0-12)	53%	1(0-3)

### 3.1.2. Métodos

#### 3.1.2.1. Determinación de la carga viral

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

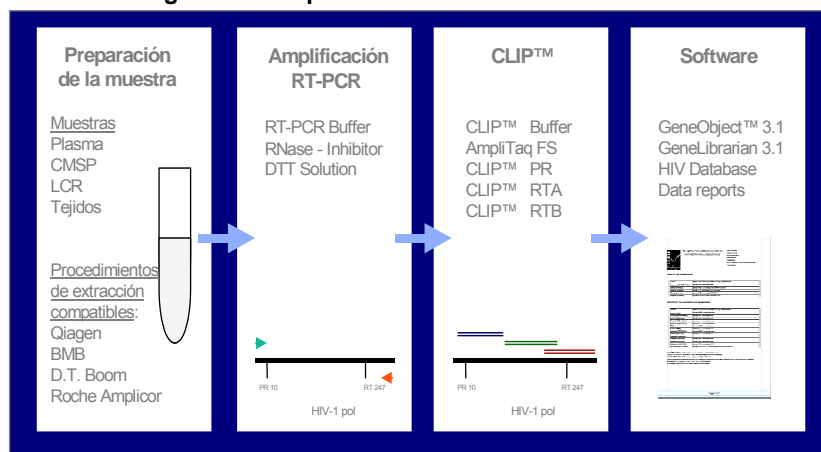
El límite de detección inferior fue distinto en función de la versión utilizada por cada hospital: 200 copias/mL en los hospitales de Poniente y Torrecárdenas, 400 copias/mL en el Hospital Virgen de la Macarena, inicialmente, porque posteriormente pasó a ser 50 copias/mL, que fue el límite de detección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

#### 3.1.2.2. Detección e interpretación de mutaciones de resistencia

El método de detección de resistencias empleado fue, en todos los casos, la técnica de secuenciación de ácidos nucleicos de TruGene™ HIV-1, Visible Genetics.

Esta técnica consta de 5 etapas: extracción del ácido nucleico, amplificación mediante RT-PCR, reacción de secuenciación bidireccional y electroforesis de los secuenciados, alineamiento de las secuencias e interpretación de los resultados.

Figura 3.1. Etapas de la técnica de secuenciación



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

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

### **3.1.2.2.1. Procesamiento de la muestra: extracción del ácido nucleico**

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

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

#### Concentración y lisis de la partícula vírica:

1.- Tomar 140µL de suero.

\* Las muestras con carga viral <1000 copias/mL, se centrifugan para conseguir una mayor concentración de ácido nucleico con el objetivo de optimizar su posterior amplificación (Erali *et al.*, 2001; DHHS, 2006). Para ello se añade 1 mL de muestra en un eppendorf y se centrifuga a 23.600 rpm/ 1 hora / 4°C. Se dejan 140 µL (con cuidado de no arrastrar el pellet) y el sobrenadante se descarta. Vortex 15-30'.

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

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

#### Precipitación y recuperación del ácido nucleico:

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

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

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



Lavado del ácido nucleico:

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

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

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

Elución del ácido nucleico:

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

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

**3.1.2.2.2. Amplificación del ácido nucleico: RT-PCR**

La amplificación se realizó de acuerdo al siguiente protocolo:

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

- Descongelar los reactivos a temperatura ambiente excepto las enzimas y el inhibidor de la RNAsa. Vortex y centrifugar a 13.500 rpm unos segundos.
- Preparar la RT-PCR Master-Mix I en un tubo de 0.5 mL añadiendo los siguientes reactivos en el orden y proporciones que se especifican en la tabla 3.7 (los volúmenes, expresados en µL, están ajustados según el número de muestras a procesar):

**Tabla 3.7. Composición de la RT-PCR Máster-Mix I según nºmuestras a procesar**

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

- Mezclar bien la Master-Mix I y añadir 9 µL de la misma a cada tubo de PCR de 0.2mL.
- Añadir 17 µL de muestra o control al tubo que contiene 9 µL de Master-Mix I. Mezclar con la pipeta.

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

- Preparar la RT-PCR Master-Mix II en un tubo de 0.5 mL añadiendo los siguientes reactivos en el orden y proporciones que se especifican en la tabla 3.8. Trabajar en un tiempo inferior a 15 minutos.

Tabla 3.8. Composición de la RT-PCR Máster-Mix II según nºmuestras a procesar

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

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

Montaje de la RT-PCR

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

90°C, 2 min.

50°C, 5 + 55 min.

94°C, 2 min.

94 °C, 30 seg.

57 °C, 30 seg

68 °C, 2 min.

68 °C, 7 min.

4 °C, ∞

x20

&amp;

94 °C, 30 seg.

60 °C, 30 seg.

68 °C, 2.5 min.

x17

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

### 3.1.2.2.3. Secuenciación bidireccional y electroforesis de los secuenciados

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

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

#### Alicuotar primers-terminadores

Partimos del producto de amplificación de 1.3 Kb del gen *pol*. Para cada amplificado a secuenciar vamos a realizar tres reacciones distintas de secuenciación: CLIP PR, en la que investigaremos la secuencia de la proteasa (codones 6-95 aproximadamente); CLIP RTA en la que investigaremos una parte de la transcriptasa reversa (RT *beginning*, codones 38-140 aproximadamente) y finalmente, CLIP RTB, en la que investigaremos otro fragmento de la transcriptasa reversa (RT *middle*, codones 130-249 aproximadamente).

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

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

Preparación de la CLIP Máster-Mix

- Descongelar los reactivos de la CLIP excepto la enzima.
- Preparar la master mix con los siguientes reactivos en el orden y proporciones que se especifican en la tabla 3.9, y comprobar que se ha mezclado bien (pipetear arriba y abajo):

**Tabla 3.9. Composición de la CLIP Máster-Mix según nºmuestras a procesar**

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

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

Secuenciación

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

94 °C, 5 min.  
 94 °C, 20 seg.  
 56 °C, 20 seg.  
 70 °C, 1,5 min.  
 70 °C, 5 min.  
 4 °C, O/N

} X 30

- Una vez finalizado, añadir 14 µL de solución de parada por tubo (formamida+colorante) (Tural *et al.*, 2002). En este momento se pueden conservar las muestras a 4°C hasta el día siguiente.

- Antes de realizar la electroforesis de las muestras, desnaturalizarlas a 90°C durante cinco minutos en el termociclador del área de secuenciación. Pasar inmediatamente a hielo.

### Electroforesis de los productos de secuenciación

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

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

- Tomar un cristal y colocarle el peine de 16 pocillos. Asegurarlo en su posición correcta en la tostadora (*gel toaster*) y llenar con la pistola de gel de poliacrilamida con cuidado de no formar burbujas.
- Conectar la tostadora y, transcurridos tres minutos de exposición a luz UV, retirar el cristal y limpiar con cuidado los restos del polímero formado que quedan alrededor del peine. Retirar el peine con cuidado de no romper los pocillos del gel.
- Colocar el cristal en el secuenciador (Long-Read Tower™) con cuidado de hacer coincidir los carriles con el lector de láser; llenar las cámaras superior e inferior con 1 ml de buffer TBE 1x.
- Hacer un *prerun* para que el buffer TBE comience a pasar por los carriles.
- Lavar los pocillos con TBE 1x.
- Cargar en cada pocillo 1,5 µL de muestra desnaturalizada.
- Correr las muestras durante 50 minutos a 60 °C y con 2000 voltios de corriente. Previamente a la carga de los pocillos se ha de programar el secuenciador introduciendo en el software los datos de la muestra, de las regiones y direcciones que se van a cargar en cada uno de los pocillos del gel, los parámetros de electroforesis, etc.

Tras finalizar el tiempo de electroforesis, el aparato recoge todas las señales emitidas en cada carril y las transforma en un cromatograma. De este modo para cada

región que se secuencia disponemos de 8 cromatogramas, 4 correspondientes a las bases A, C, G y T en dirección 5' y otros 4 en dirección 3'.

#### **3.1.2.2.4. Alineamiento de las secuencias e interpretación de los resultados**

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

Después de revisar la calidad de las secuencias es necesario combinar las secuencias obtenidas en las direcciones 5' y 3' de cada región secuenciada, y además combinar todas las regiones una tras otra (PR, RTA y RTB).

Asimismo, enfrentamos las secuencias obtenidas con una cepa de referencia en la que no existen mutaciones de resistencia (cepa salvaje, *wild type* o WT, HIV-1 B LAV-1) (Erali *et al.*, 2001).

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

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

Las secuencias obtenidas pueden ser transformadas a formato de texto para ser así exportadas y poder trabajar con ellas para realizar subtipado, análisis de mutaciones de resistencia mediante otros algoritmos de interpretación diferentes, etc.

### 3.1.2.3. Mutaciones estudiadas

En la base de datos se registraron para cada paciente todas las mutaciones presentes en el informe de Trugene (Visible Genetics).

Para el desarrollo del algoritmo de interpretación de cada fármaco se estudiaron todas las mutaciones de resistencia recogidas por el **IAS 2005** (International AIDS Society) (Gallant, 2005) (<http://www.iasusa.org>) así como aquellas reconocidas por la **ANRS 2005** (Agence Nationale de Recherches sur le Sida) (<http://www.hivfrenchresistance.org>) (tablas 3.10 y 3.11).

**Tabla 3.10. Mutaciones analizadas para los ITIANs estudiados**

Mutaciones
M41L, E44D, A62V, K65R, D67N, T69D, Ins69, K70R, L74V, V75I, F77L, F116Y, V118I, Q151M, M184V, L210W, T215YF, K219QE

**Tabla 3.11. Mutaciones analizadas para los IPs estudiados**

Mutaciones
L10FIRV, K20MR, L24I, D30N, V32I, L33FIV, E35D, M36I, R41K, M46IL, I47V, I50V, F53L I54VMLT, L63P, A71ILTV, G73S, V77I, V82AFTS, I84V, N88DS, L90M

### 3.1.2.4. Metodología estadística

Los datos se analizaron mediante tests paramétricos y no paramétricos incluidos dentro del paquete estadístico SPSS 12.0.

Como medida de respuesta clínica al tratamiento se utilizó el cambio en los niveles plasmáticos de ARN vírico desde el momento basal en el que se realizó el estudio genotípico de resistencias hasta los tres meses tras el inicio del nuevo régimen terapéutico ( $\Delta CV_{\text{basal-3meses}}$ ,  $\log_{10}$  copias/mL). Igualmente se repitió todo el estudio tras un seguimiento de seis meses ( $\Delta CV_{\text{basal-6meses}}$ ,  $\log_{10}$  copias/mL).

Para el estudio de los datos referentes a la carga vírica se estableció el valor de 50 copias/mL en todos los casos en los que la carga vírica fue indetectable según la técnica analítica empleada.

Se analizó para cada fármaco el impacto sobre la respuesta virológica de la presencia de cada una de las mutaciones asociadas con resistencia. Para ello se realizó un **análisis univariante** para comparar el cambio en la carga viral en el tiempo en presencia o ausencia de cada mutación. Este análisis se realizó mediante el test no paramétrico de Mann-Whitney.

De la lista de mutaciones estudiadas, se seleccionaron para la posterior elaboración de los modelos de interpretación, aquellas para las cuáles  $p < 0.20$  en el análisis univariante anterior y que además estuviesen presentes en al menos un **10%**

de los pacientes, siguiendo la metodología empleada por otros autores (Brun-Vezinet *et al.*, 2003; Masquelier *et al.*, 2004). *A posteriori*, teniendo en cuenta nuevos estudios de interpretación de mutaciones de resistencia (Marcelin *et al.*, 2004b; Marcelin *et al.*, 2005), se consideró repetir el análisis considerando aquellas mutaciones presentes en al menos un 5% de los pacientes.

A continuación, se analizó la media de  $\Delta CV$  en presencia y ausencia de la mutación para ver si el efecto de la mutación sobre la respuesta virológica era negativo (la presencia de la mutación provoca un menor descenso en los niveles de carga viral del paciente) o positivo (la presencia de la mutación conlleva una mayor caída en la carga viral).

Una vez seleccionadas las mutaciones en el análisis univariante y conocido su efecto sobre la respuesta virológica, se realizaron combinaciones con las distintas mutaciones, considerando la suma de todas aquellas mutaciones que proporcionaban una peor respuesta virológica, así como aquellas asociadas con una mejor respuesta, que restaban en la combinación.

Se analizaron las distintas combinaciones de mutaciones y su relación con los cambios en los niveles plasmáticos de carga viral. La agrupación de mutaciones más fuertemente asociada con la respuesta virológica se seleccionó tras un **análisis paso a paso** de todas las combinaciones. Para realizar este análisis estadístico utilizamos el método del desescalado o *removing*, propuesto por Flandre y colaboradores (Flandre *et al.*, 2005). Así, partiendo de una combinación con todas las mutaciones retenidas en el análisis univariante ( $K$ ), se van creando combinaciones eliminando mutaciones una a una. Se analizan mediante el test no paramétrico de Jonckheere-Terpstra el efecto sobre la respuesta virológica de todas las posibles combinaciones  $K-1$ , reteniéndose aquella combinación que proporciona una  $p$  menor a la obtenida para la combinación  $K$ , es decir, mayor asociación con la respuesta virológica. Partiendo de esa combinación se pasa a eliminar de nuevo, una a una, mutaciones para comparar las diferentes combinaciones  $K-2$ , para retener aquella agrupación que proporcione una  $p$  menor. Este proceso se repite hasta que retirar una mutación del modelo no mejora el valor de  $p$  obtenido en el nivel anterior. Con este método se consigue, de la suma que incluye todas las mutaciones preseleccionadas, mantener una mutación que contribuya de forma significativa a separar grupos de pacientes. A pesar de que el test de Kruskal-Wallis es válido para estos casos, es más general y por eso utilizamos el test de Jonckheere-Terpstra que ha sido específicamente diseñado para este contexto de grupos ordenados como son los grupos de pacientes con distinto número de mutaciones (Flandre *et al.*, 2005).



Seleccionada la combinación de mutaciones, se analizaron en nuestra población los distintos valores de mediana de  $\Delta CV$  según el valor que adoptase esta suma de mutaciones. La **pérdida de eficacia terapéutica** se definió como un descenso en la carga viral inferior a **0,5 log** (Margot *et al.*, 2002; Blanco *et al.*, 2006a). Llegamos así al desarrollo de un algoritmo de interpretación, que define, según el número de mutaciones presentes, una determinada respuesta terapéutica (Vergne *et al.*, 2006).

Una vez obtenido el *score* de interpretación genotípica asociado con respuesta clínica, el siguiente paso fue comprobar si dicho algoritmo predecía la respuesta virológica de forma independiente, para lo cual se llevó a cabo un **análisis multivariante**. Este análisis permite evaluar el efecto del *score*, es decir, de la presencia de distintas mutaciones, acompañadas de los efectos de otros parámetros basales, en la respuesta virológica. De esta manera, se determinan los verdaderos predictores de cambios en los niveles de ARN vírico. Se incluyeron en este análisis las diferentes variables que podían explicar de algún modo la variable respuesta ( $\Delta CV$ ). Se definió significación estadística a un nivel de error del 5% ( $p < 0,05$ ).

El análisis multivariante se realizó por el método de regresión lineal, de dos formas, utilizando los métodos de introducir todas las variables en el modelo y el de pasos sucesivos. Al realizar el análisis de regresión mediante el método introducir, entran todas las variables en el análisis, mientras que al utilizar los pasos sucesivos, tenemos que definir unos valores de entrada y salida de las variables en el modelo (Luna, 2004a). En nuestro estudio consideramos unos valores de entrada  $< 0,20$  y salida  $0,25$ , es decir, que entrarán en el modelo todas aquellas variables cuya  $p \leq 0,20$ , el programa realiza el análisis con esa condición y saca del modelo todas las variables cuya  $p \geq 0,25$ .

Previo a la realización del análisis multivariante realizamos subanálisis multivariantes mediante regresión lineal para seleccionar, de cada grupo variables muy relacionadas entre sí (ej. nº fármacos nuevos, nº fármacos en el nuevo tratamiento, nº clases nuevas, nº clases en el nuevo tratamiento), aquella con un efecto más significativo sobre la variable respuesta. Ésta se eligió como representativa del grupo y fue la que se introdujo en el análisis multivariante general.

### 3.2. Vigilancia epidemiológica de subtipos no-B

#### 3.2.1. Pacientes

Se realizó un estudio retrospectivo, utilizando la base de datos COKOS que incluye datos de pacientes VIH recogidos en el periodo comprendido entre los años 1999 y 2006. Se recogieron datos de distintos hospitales de Andalucía: Hospital de Torrecárdenas, Hospital Provincial y Hospital de Poniente, de la provincia de Almería; Hospital Alto Guadalquivir de Andújar, Hospital Princesa de España, Hospital San Agustín de Linares, Hospital San Juan de la Cruz de Úbeda, Hospital Ciudad de Jaén y Hospital Penitenciario, de la provincia de Jaén; y Hospital Virgen de las Nieves, Hospital Santa Ana de Motril, Hospital de Baza, Prisión y Hospital Clínico San Cecilio, de Granada. En el laboratorio de este último hospital se realizaron los estudios de resistencias genotípicas solicitados por los distintos centros. Los datos del año 1999 proceden de un estudio realizado con un importante número de pacientes inmigrantes de la provincia de Almería, en el que se analizó la presencia de subtipos no-B.

Se analizaron **1399 muestras** pertenecientes a un total de **1012 pacientes**. El estudio de polimorfismos se realizó en **1238** muestras, en las que se conocía la existencia o no de tratamiento previo con IPs.

**Tabla 3.12. Muestras estudiadas para realización de estudio de resistencias a antirretrovirales (1999-2006)**

	Muestras estudiadas (%)
1999	103 (7,4)
2000	12 (0,9)
2001	106 (7,6)
2002	257 (18,4)
2003	237 (16,9)
2004	219 (15,7)
2005	234 (16,7)
2006	231 (16,5)
<b>Total</b>	<b>1399</b>

**Tabla 3.13. Procedencia por hospitales de los estudios de resistencia realizados**

Hospital	Muestras estudiadas (%)
PONIENTE (EL EJIDO, ALMERIA)	138 (9,9)
TORRECARDENAS (ALMERIA)	168 (12,0)
PROVINCIAL (ALMERIA)	4 (0,3)
ALTO GUADALQUIVIR (ANDUJAR, JAEN)	18 (1,3)
PRISIÓN JAEN	11 (0,8)
CIUDAD DE JAEN (JAEN)	48 (3,4)
PRINCESA DE ESPAÑA (JAEN)	7 (0,5)
SAN AGUSTIN (LINARES, JAEN)	6 (0,4)
SAN JUAN DE LA CRUZ (UBEDA, JAEN)	17 (1,2)
BAZA (GRANADA)	3 (0,2)
SANTA ANA (MOTRIL, GRANADA)	99 (7,1)
SAN CECILIO (GRANADA)	511 (36,5)
VIRGEN DE LAS NIEVES (GRANADA)	306 (21,9)
PRISIÓN GRANADA	63 (4,5)
<b>Total</b>	<b>1399</b>

Se recogieron diversos datos de interés de los pacientes: demográficos (sexo; edad; país de origen), epidemiológicos (grupo de riesgo de transmisión de la infección, fecha de diagnóstico de VIH, datos de la pareja, subtipo), clínicos (estadío CDC, coinfección por VHC, VHB, sífilis), laboratorio (recuento de CD4; carga viral de VIH), terapéuticos (tipo de paciente: naïve o pretratados; tratamientos previos y régimen actual) y genotípicos (mutaciones de resistencia a ITIANs, ITINANs e IPs así como datos de la interpretación de dichas mutaciones). Las características generales de los pacientes recogidos en la base de datos COKOS se muestran en la tabla 3.14.

<b>Tabla 3.14. Características de los pacientes base de datos COKOS</b>	
Sexo (%)	V: 72,9; M: 27,1
Edad	37,9 ± 9,2
Media recuento CD4 (n <sup>o</sup> céls/mm <sup>3</sup> )	341 ± 325
Media Carga Viral basal (log <sub>10</sub> copias/mL)	4,06 ± 0,94
Años infección	5,63 ± 5,13
Tipo de paciente (%)	
naïve	23,6
pretratados	76,4
ITIAN	52,1
AZT	44,3
ddl	47,1
d4T	31,1
3TC	41,5
FTC	0,6
ABC	15,4
TDF	5,5
ITINAN	31,3
NVP	18,6
EFV	20,6
IP	43,1
IDV	32,9
NFV	20,6
SQV	18,0
LPV	10,7
ATZ	1,2
APV	4,1
ITIAN+ITINAN+IP	25,2
Estadío CDC (%)	
A	50,5
B	9,3
C	40,2
Grupo de riesgo (%)	
UDVP	43,2
Heterosexual	37,6
Homosexual	13,6
UDVP+Homosexual	0,7
Transfusión sanguínea	0,7
Transmisión vertical	1,0
Desconocido	3,1
Pareja estable (%)	56,5
VIH negativo	19,1
VIH positivo	40,0
Desconocido	40,9
Coinfección (%)	
VHC	59,4
VHB	11,0
Sífilis	7,5

V: varón; M: mujer; UDVP: usuarios de drogas por vía parenteral

De igual manera, las características generales correspondientes a los pacientes infectados por subtipos no-B se detallan en la tabla 3.15.

<b>Tabla 3.15. Características de los pacientes infectados por subtipos no-B</b>	
Sexo (%)	V: 57,1; M: 42,9
Edad	35,9 ± 9,6
Media recuento CD4 (n <sup>o</sup> céls/mm <sup>3</sup> )	289 ± 204
Media Carga Viral basal (log <sub>10</sub> copias/mL)	4,49 ± 0,91
Años infección	1,69 ± 2,92
Tipo de paciente (%)	
naïve	61,4
pretratados	38,6
ITIAN	15,6
AZT	12,5
ddl	1,6
d4T	7,8
3TC	14,1
FTC	0
ABC	6,3
TDF	0
ITINAN	7,8
NVP	6,3
EFV	1,6
IP	7,8
IDV	4,6
NFV	3,1
SQV	0
LPV	1,6
ATZ	0
APV	0
ITIAN+ITINAN+IP	4,7
Estadío CDC (%)	
A	31,2
B	12,5
C	56,3
Grupo de riesgo (%)	
UDVP	8,0
Heterosexual	54,5
Homosexual	1,1
UDVP+Homosexual	1,1
Desconocido	35,2
Pareja estable (%)	73,1
VIH negativo	16,7
VIH positivo	58,3
Desconocido	25,0
Coinfección (%)	
VHC	33,3
VHB	6,7
Sífilis	0

De los pacientes estudiados infectados por **subtipos no-B**, el 37,7% había recibido algún tratamiento previo y el 62,3% restante eran naïve. En la tabla 3.16 se muestran las características terapéuticas, así como genotípicas de los mismos.

**Tabla 3.16. Características terapéuticas y genóticas de pacientes infectados por subtipos no-B**

Pacientes naïve		
<b>Mutaciones (%)</b>	ITIAN	4,8
	TAMs	0
	ITINAN	16,7
	IP	100
Pacientes tratados		
<b>Tratamiento previo (%)</b>		
	ITIAN (1-5 fármacos)	53,8
	AZT	44,0
	ddl	8,7
	3TC	48,0
	d4T	26,1
	ABC	18,2
	ITINAN (1 fármaco)	26,1
	NVP	21,7
	EFV	4,5
	IP (1-2 fármacos)	29,2
	IDV	17,5
	NFV	13,0
	LPV	4,5
	ITIAN+ITINAN+IP	13,6
<b>Mutaciones (%)</b>	ITIAN (1-7 mutaciones)	72,7
	TAMs (1-6 mutaciones)	50
	TAM ruta 1	40,9
	TAM ruta 2	27,3
	ITINAN (1-4 mutaciones)	45,5
	IP (3-12 mutaciones)	100

### 3.2.2. Métodos

#### 3.2.2.1. Determinación del ARN viral

La determinación de la carga viral se llevó a cabo mediante la utilización de la técnica automatizada de COBAS Amplicor (Roche Diagnostics) descrita en el apartado 3.1.2.1.

#### 3.2.2.2. Detección de mutaciones de resistencia

La detección de mutaciones de resistencia se realizó mediante el test genotípico de secuenciación, siguiendo el mismo protocolo descrito para la definición de algoritmos de interpretación (apartado 3.1.2.2).

Se tuvieron en cuenta las reglas de interpretación de resistencia a los distintos inhibidores de la proteasa de la Agencia Nacional Francesa de Estudio del VIH publicadas en 2006 (ANRS, 2006). Éstas incluyen distintas mutaciones de resistencia (K20V/T, D30N, V32I, L33F/I/V, M36A/L, M46I/L, I47V/A, G48V, I50V/L, F53L, I54V/L/M/T, L63I/N/C/S/T, I66F, H69Q, A71I/L, G73S/A/T, T74S/P, L76V, V82A/F/S/T/L/M, N83D, I84V/A, I85V, N88D/S, L90M, T91S), así como otros cambios menores descritos como posibles polimorfismos de subtipos no-B (L10I/F/V/R, I13L/V, G16E/A/R, K20M/R/I, L24I, E35D/G, M36I, R41K, K43R/T/N, K45R, Q58E, D60E, I62V, L63P, H69K, A71V/T, V77I, V82I, L89V/M/I/T e I93L).

### 3.2.2.3. Subtipado del VIH-1

La determinación del subtipo infectante se realizó hasta el año 2000 mediante la técnica de movilidad de los heterodúplex (HA), que analiza la región hipervariable V3-V5 del gen *env*. A partir de dicha fecha, el subtipado se realizó mediante el análisis de las secuencias obtenidas por secuenciación del gen *pol* (Trugene TM HIV-1, Visible Genetics). Para dicho análisis se empleó la base de datos de Stanford (<http://hivdb.stanford.edu>), de uso público. Ésta incluye el programa HIVseq para análisis de secuencias, que compara las secuencias de transcriptasa inversa y proteasa examinadas con la secuencia consenso del subtipo de referencia.

Para la obtención del subtipo la secuencia obtenida en formato FASTA (.fasta) se convierte a formato texto (.txt) y de esta forma el programa la analiza, informando acerca del subtipo y dando un porcentaje de similitud con el aislado de referencia más próximo.

Además, el programa muestra la prevalencia de mutaciones específicas de subtipo para los subtipos A, B, D, F y G, así como para las formas recombinantes AE y A.

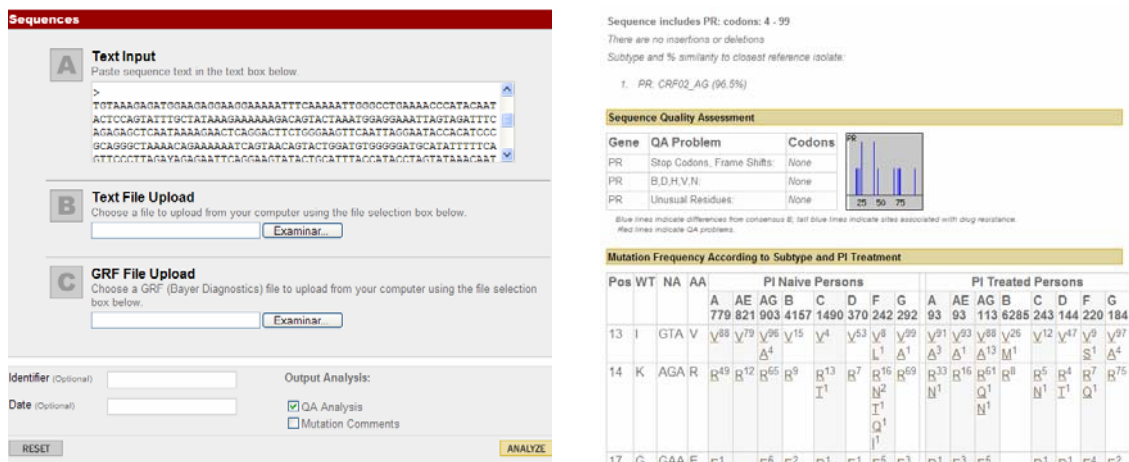


Figura 3.2. Aplicación informática de la Universidad de Stanford para el subtipado del VIH-1

### 3.2.2.4. Metodología estadística

Los datos se analizaron mediante el programa estadístico SPSS 12.0.

Se realizaron análisis de estadísticos descriptivos para conocer la frecuencia de distintas variables.

El estudio comparativo de variables se llevó a cabo mediante el test de chi-cuadrado o Fisher. Se definió significación estadística a un nivel de error del 5% ( $p < 0,05$ ).



## **4. RESULTADOS**





#### 4.1. Desarrollo de algoritmos de interpretación de resistencia de VIH

##### 4.1.1. Algoritmo de interpretación de resistencia de TENOFOVIR considerando la respuesta virológica a los 3 meses

El análisis univariante realizado mediante el test estadístico de Mann-Whitney, permitió realizar la selección de aquellas mutaciones relevantes para la definición del score o algoritmo de interpretación genotípica. En la tabla 4.1 se muestran todas las mutaciones estudiadas, destacando aquellas cuya prevalencia en la población estudiada fue  $\geq 10\%$  y con un efecto significativo ( $p < 0,20$ ) sobre la respuesta virológica a tenofovir, medida ésta en términos de descenso de carga viral a los tres meses. No hubo ninguna mutación a añadir que presentase una frecuencia  $\geq 5\%$  y un nivel de significación de  $p < 0,20$ , por tanto, no se repitió el análisis siguiendo estos criterios. Se muestra también si el efecto de dichas mutaciones sobre la carga viral fue negativo o positivo.

**Tabla 4.1. Variación media de los niveles de CV a los 3 meses en presencia y ausencia de mutaciones (n=153)**

Mutación	Presencia de mutación (%)	Efecto	Diferencia logCV3m-logCVbasal		
			Wild-Type (n)	Mutación (n)	p
<b>M41L</b>	107 (69,9%)	-	1.49±1.23 (46)	1.07±1.27 (107)	<b>0.082</b>
<b>E44D</b>	22 (14,4%)	-	1.28±1.24 (131)	0.70±1.32 (22)	<b>0.064</b>
A62V	4 (2,6%)		1.18±1.27 (149)	1.86±0.82 (4)	0.267
K65R	5 (3,3%)		1.15±1.25 (148)	2.61±0.97 (5)	0.013
<b>D67N</b>	72 (47,1%)	-	1.46±1.15 (81)	0.89±1.33 (72)	<b>0.005</b>
T69D	10 (6,5%)		1.22±1.27 (143)	0.89±1.22 (10)	0.438
INS69	1 (0,7%)		1.19±1.27 (152)	1.30 (1)	0.982
K70R	35 (22,9%)		1.13±1.28 (118)	1.40±1.19 (35)	0.325
L74V	16 (10,5%)		1.18±1.29 (137)	1.30±1.09 (16)	0.698
V75ITMSA	6 (3,9%)		1.20±1.24 (147)	1.02±1.98 (6)	0.714
V75I	2 (1,3%)		1.18±1.26 (149)	1.84±1.17 (2)	0.478
F77L	0 (0%)		1.19±1.26 (153)	-----	-----
F116Y	2 (1,3%)		1.18±1.27 (151)	1.83±1.17 (2)	0.450
<b>V118I</b>	51 (33,3%)	-	1.32±1.23 (102)	0.93±1.21 (51)	<b>0.053</b>
Q151M	4 (2,6%)		1,17±1,25 (149)	2,19±1,47 (4)	0,192
<b>M184V/I</b>	77 (50,3%)	+	0.91±1.25 (76)	1.48±1.23 (77)	<b>0.005</b>
M184V	75 (49%)		0.96±1.27 (78)	1.44±1.22 (75)	0.020
M184I	2 (1,3%)		1.17±1.26 (151)	2.99±0.19 (2)	0.019
<b>L210W</b>	73 (47,7%)	-	1.42±1.26 (80)	0.95±1.24 (73)	<b>0.031</b>
T215Y/F	120 (78,4%)		1.81± 1.34 (33)	1.03±1.20 (120)	0.003
<b>T215Y</b>	97 (63,4%)	-	1.60±1.29 (56)	0.96±1.19 (97)	<b>0.005</b>
T215F	24 (15,7%)		1.19±1.28 (129)	1.24±1.20 (24)	0.936
K219Q/E	36 (23,5%)		1.19±1.26 (117)	1.21±1.30 (36)	0.885
K219Q	15 (10,6%)		1.19±1.24 (127)	1.24±1.34 (15)	0.950
K219E	9 (6,3%)		1.19±1.26 (133)	1.22±1.17 (9)	0.960

Al estudiar mediante el método de *removing* el efecto sobre la respuesta virológica de las distintas combinaciones de las mutaciones seleccionadas previamente y, teniendo en cuenta únicamente la suma de aquellas mutaciones con **efecto negativo**, se obtuvieron los resultados que se muestran en la tabla 4.2. Se resalta la combinación de mutaciones que mejor predecía la respuesta virológica (modelo seleccionado).

**Tabla 4.2. Influencia de distintas combinaciones de mutaciones (10%) con efecto negativo sobre la respuesta virológica a TENOFOVIR (método *removing*)**

		Combinación mutaciones (-)	p (J.Terpstra)
<b>(k)</b>		41+44+67+118+210+215Y	$5,6 \cdot 10^{-4}$
<b>(k-1)</b>	(-215)	41+44+67+118+210	$1,5 \cdot 10^{-3}$
	(-210)	41+44+67+118+215Y	$2,9 \cdot 10^{-4}$
	(-118)	41+44+67+210+215Y	$5,0 \cdot 10^{-4}$
	(-44)	41+67+118+210+215Y	$6,1 \cdot 10^{-4}$
	(-67)	41+44+118+210+215Y	$3,3 \cdot 10^{-3}$
	(-41)	67+44+118+210+215Y	$2,7 \cdot 10^{-4}$

Eliminar una mutación de la combinación inicial (k-1) no mejoró la significación estadística, ya que p disminuía dentro del mismo rango exponencial. Por tanto, se seleccionó la agrupación de partida (k) como mejor modelo para definir la respuesta virológica a tenofovir en presencia de un número de mutaciones.

A continuación, se consideraron además de las mutaciones negativas, aquellas mutaciones con **efecto positivo** sobre la respuesta virológica que también cumplieran los criterios de selección, entrando en el modelo la mutación M184V/I (tabla 4.3).

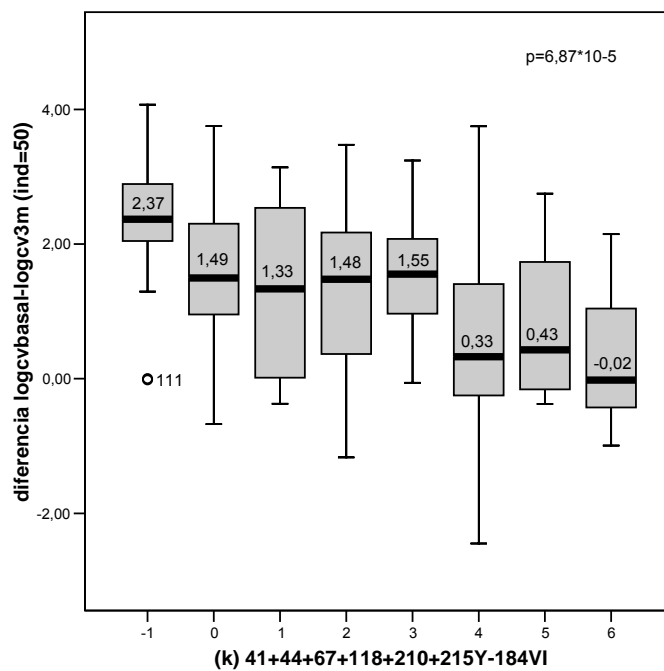
Con respecto al análisis anterior, la significación estadística mejoró, p pasó de  $5,6 \cdot 10^{-4}$  a  $6,9 \cdot 10^{-5}$  y, por tanto, este *score* fue el seleccionado definitivamente como predictor de respuesta a tenofovir.

**Tabla 4.3. Influencia de distintas combinaciones de mutaciones con efecto negativo y positivo sobre la respuesta virológica a TENOFOVIR (método *removing*)**

		Combinación mutaciones (-) y (+)	p (J.Terpstra)
<b>(k)</b>		41+44+67+118+210+215Y-184VI	$6,9 \cdot 10^{-5}$
<b>(k-1)</b>	(-184)	41+44+67+118+210+215Y	$1,1 \cdot 10^{-3}$
	(-215)	41+44+67+118+210-184VI	$1,2 \cdot 10^{-4}$
	(-210)	41+44+67+118+215Y-184VI	$2,1 \cdot 10^{-5}$
	(-118)	41+44+67+210+215Y-184VI	$3,9 \cdot 10^{-5}$
	(-67)	41+44+118+210+215Y-184VI	$3,5 \cdot 10^{-4}$
	(-44)	41+67+118+210+215Y-184VI	$7,6 \cdot 10^{-5}$
	(-41)	44+67+118+210+215Y-184VI	$2,4 \cdot 10^{-5}$

La influencia de este score elegido sobre la respuesta virológica se muestra gráficamente en la figura 4.1. Los cambios en la carga viral a los tres meses están representados por diagramas de cajas, en los que se indican los valores de las medianas de  $\Delta CV$ . Se observa cómo a medida que aumenta el número de mutaciones del score se obtiene peor respuesta, menor reducción en los niveles de carga viral. A partir de un valor 4 del score se pierde la eficacia virológica.

**Figura 4.1. Respuesta virológica a TENOFOVIR a los 3 meses según nº de mutaciones del score**



#### 4.1.2. Algoritmo de interpretación de resistencia de TENOFOVIR considerando la respuesta virológica a los 6 meses

En la tabla 4.4 se muestran todas las mutaciones estudiadas, destacando aquellas cuya prevalencia en la población estudiada fue  $\geq 10\%$  ó  $\geq 5\%$  y cuya presencia a su vez tuvo un efecto significativo ( $p < 0,20$ ) sobre la respuesta virológica a tenofovir, medida ésta en términos de descenso de carga viral a los 6 meses.

Tabla 4.4. Variación media de los niveles de CV a los 6 meses en presencia y ausencia de mutaciones (n=123)

Mutación	Presencia de mutación (%)	Efecto	Diferencia logCV6m-logCVbasal		
			Wild-Type (n)	Mutación (n)	p
<b>M41L</b>	87 ( <b>70.7%</b> )	-	1.50±1.24 (36)	0.94±1.31 (87)	<b>0.040</b>
<b>E44D</b>	18 ( <b>14.6%</b> )	-	1.22±1.29 (105)	0.49±1.27 (18)	<b>0.025</b>
A62V	2 (1.6%)		1.09±1.31 (121)	1.88±0.80 (2)	0.337
K65R	1 (0.8%)		1.10±1.31 (122)	2.53 (1)	0.237
<b>D67N</b>	57 ( <b>46.3%</b> )	-	1.35±1.26 (66)	0.84±1.32 (57)	<b>0.022</b>
<b>T69D</b>	8 ( <b>6,5%</b> )	-	1.15±1.32 (115)	0.48±1.08 (8)	<b>0.160</b>
INS69	1 (0.8%)		1.11±1.31 (122)	1.30 (1)	0.878
K70R	27 (22%)		1.09±1.38 (96)	1.19±1.05 (27)	0.608
L74V	12 (9.8%)		1,13±1,31 (111)	0,92±1,31 (12)	0,633
V75ITMSA	5 (4.1%)		1.12±1.30 (118)	0.91±1.59 (5)	0.710
V75I	0 (0%)		1.12±1.30 (122)	-----	-----
F77L	0 (0%)		1.11±1.31 (123)	-----	-----
F116Y	0 (0%)		1.11±1.31 (123)	-----	-----
V118I	42 (34.1%)		1.15±1.35 (81)	1.03±1.22 (42)	0.586
<b>M184V/I</b>	64 ( <b>52%</b> )	+	0.81±1.24 (59)	1.38±1.31 (64)	<b>0.019</b>
M184V	63 (51.2%)		0.83±1.24 (60)	1.37±1.33 (63)	0.027
M184I	1 (0.8%)		1.10±1.31 (122)	1.91 (1)	0.602
<b>L210W</b>	62 ( <b>50.4%</b> )	-	1.38±1.27 (61)	0.84±1.30 (62)	<b>0.021</b>
T215Y/F	99 (80.5%)		2.00±1.27 (23)	0.91±1.24 (100)	0.001
<b>T215Y</b>	80 ( <b>65%</b> )	-	1.63±1.35 (43)	0.83±1.20 (80)	<b>0.002</b>
T215F	20 (16.3%)		1.09±1.31 (103)	1.20±1.35 (20)	0.656
K219Q/E	29 (23.6%)		1.17±1.32 (94)	0.93±1.29 (29)	0.442
K219Q	12 (10.4%)		1.10±1.32 (103)	0.99±1.39 (12)	0.848
<b>K219E</b>	8 ( <b>7%</b> )	-	1.15±1.31 (107)	0.35±1.35 (8)	<b>0.095</b>

En primer lugar se llevó a cabo el desarrollo del score teniendo en cuenta las mutaciones con una prevalencia  $\geq 10\%$ .

Mediante el test de Jonkheere-Terpstra se estudió el efecto sobre la respuesta virológica de distintas agrupaciones de las mutaciones seleccionadas previamente. Al considerar únicamente las mutaciones con **efecto negativo** se obtuvieron los resultados que se muestran en la tabla 4.5.

**Tabla 4.5. Influencia de distintas combinaciones de mutaciones (10%) con efecto negativo sobre la respuesta virológica a TENOFOVIR (método *removing*)**

		Combinación mutaciones (-)	p (J.Terpstra)
<b>(k)</b>		41+44+67+210+215Y	$2,5*10^{-4}$
<b>(k-1)</b>	(-215)	41+44+67+210	$8,6*10^{-4}$
	(-210)	41+44+67+215Y	$1,3*10^{-4}$
	(-67)	41+44+210+215Y	$1,1*10^{-3}$
	(-44)	41+67+210+215Y	$7,1*10^{-4}$
	(-41)	44+67+210+215Y	$8,89*10^{-4}$

A continuación, se consideraron también aquellas mutaciones con **efecto positivo** sobre la respuesta virológica (tabla 4.6).

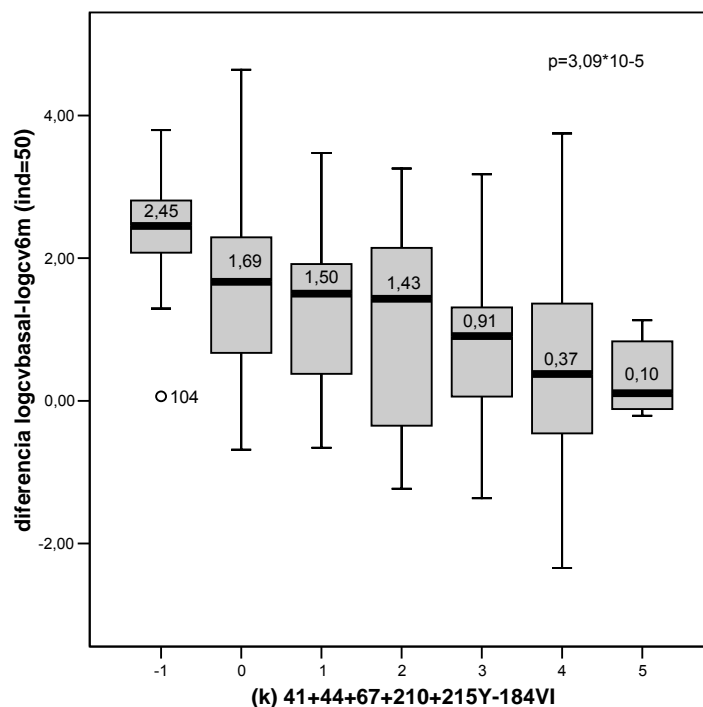
**Tabla 4.6. Influencia de distintas combinaciones de mutaciones (10%) con efecto negativo y positivo sobre la respuesta virológica a TENOFOVIR (método *removing*)**

		Combinación mutaciones (-) y (+)	p (J.Terpstra)
<b>(k)</b>		41+44+67+210+215Y-184VI	$3,09*10^{-5}$
<b>(k-1)</b>	(-184)	41+44+67+210+215Y	$2,47*10^{-4}$
	(-215)	41+44+67+210-184VI	$8,08*10^{-5}$
	(-210)	41+44+67+215Y-184VI	$1,30*10^{-5}$
	(-67)	41+44+210+215Y-184VI	$1,16*10^{-4}$
	(-44)	41+67+210+215Y-184VI	$6,80*10^{-5}$
	(-41)	44+67+210+215Y-184VI	$1,18*10^{-5}$

La significación estadística mejoró, p pasó de  $2,5*10^{-4}$  a  $3,09*10^{-5}$  y, por tanto, este score fue seleccionado definitivamente como predictor de respuesta a tenofovir a los 6 meses.

Se analizó la influencia de este score sobre la respuesta virológica, según la variación en la carga viral en función del número de mutaciones de dicho score que presentasen los pacientes. Este efecto se muestra gráficamente en la figura 4.2. A partir de un valor 4 del score se pierde la eficacia virológica.

Figura 4.2. Respuesta a TDF a los 6 meses por nº de mutaciones (10%) del score



Al considerar las mutaciones presentes en al menos 5% de nuestra población, se añadieron las mutaciones T69D y K219E, ambas con efecto negativo, a las mutaciones previamente seleccionadas para realizar el análisis.

Partimos de la nueva combinación de mutaciones con **efecto negativo** y mediante el test de Jonkheere-Terpstra se estudió el efecto sobre la respuesta virológica. Los resultados se muestran en la tabla 4.7.

Tabla 4.7. Influencia de distintas combinaciones de mutaciones (5%) con efecto negativo sobre la respuesta virológica a TENOFOVIR (método *removing*)

	Combinación mutaciones (-)	p (J.Terpstra)
<b>(k)</b>	41+44+67+69D+ 210+215Y+219E	5,82*10 <sup>-5</sup>
<b>(k-1)</b>	(-219) 41+44+67+69D +210+215Y	1,38*10 <sup>-4</sup>
	(-215) 41+44+67+69D +210+219E	1,19*10 <sup>-4</sup>
	(-210) 41+44+67+69D+215Y+219E	1,27*10 <sup>-5</sup>
	(-69) 41+44+67+210+215Y+219E	1,16*10 <sup>-4</sup>
	(-67) 41+44+69D +210+215Y+219E	2,01*10 <sup>-4</sup>
	(-44) 41+67+69D +210+215Y+219E	1,11*10 <sup>-4</sup>
	(-41) 44+67+69D +210+215Y+219E	2,43*10 <sup>-5</sup>

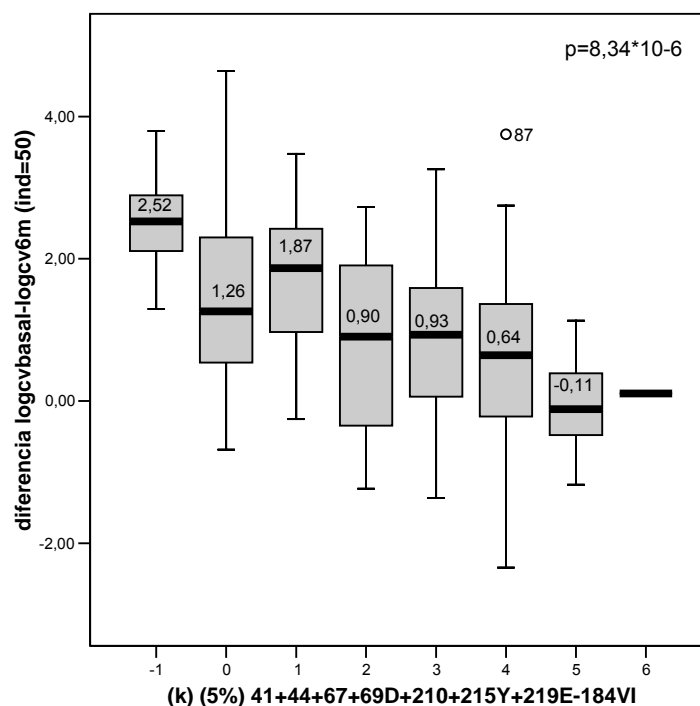
A continuación, se consideraron también aquellas mutaciones con **efecto positivo** sobre la respuesta virológica.

**Tabla 4.8. Influencia de distintas combinaciones de mutaciones (5%) con efecto negativo y positivo sobre la respuesta virológica (método *removing*)**

		Combinación mutaciones (-) y (+)	p (J.Terpstra)
<b>(k)</b>		41+44+67+69D+ 210+215Y+219E-184VI	$8,34 \cdot 10^{-6}$
<b>(k-1)</b>	(-184)	41+44+67+69D +210+215Y+219E	$5,82 \cdot 10^{-5}$
	(-219)	41+44+67+69D +210+215Y-184VI	$1,87 \cdot 10^{-5}$
	(-215)	41+44+67+69D +210+219E -184VI	$1,75 \cdot 10^{-5}$
	(-210)	41+44+67+69D+215+219E -184VI	$1,92 \cdot 10^{-6}$
	(-69)	41+44+67+210+215Y+219E -184VI	$2,17 \cdot 10^{-5}$
	(-67)	41+44+69D +210+215+219E -184VI	$2,46 \cdot 10^{-5}$
	(-44)	41+67+69D +210+215Y+219E -184VI	$1,39 \cdot 10^{-5}$
	(-41)	44+67+69D +210+215+219E -184VI	$6,15 \cdot 10^{-6}$

La influencia del score sobre la respuesta virológica se muestra gráficamente mediante el diagrama de cajas de la figura 4.3. A partir de un valor 5 del score se pierde la eficacia virológica.

**Figura 4.3. Respuesta a TENOFOVIR a los 6 meses según nº de mutaciones (5%) del score**





#### 4.1.3. Algoritmo de interpretación de resistencia de DIDANOSINA considerando la respuesta virológica a los 3 meses

En la tabla 4.9 se muestran todas las mutaciones estudiadas, destacando aquellas cuya prevalencia en la población estudiada fue  $\geq 10\%$  ó  $\geq 5\%$  y cuya presencia a su vez tuvo un efecto significativo ( $p < 0,20$ ) sobre la respuesta virológica a didanosina, medida ésta en términos de descenso de carga viral a los tres meses. Se muestra también si el efecto de dichas mutaciones sobre la carga viral fue negativo o positivo.

**Tabla 4.9. Variación media de los niveles de CV a los 3 meses en presencia y ausencia de mutaciones (n=137)**

Mutación	Presencia de mutación (%)	Efecto	Diferencia $\log CV_{3m} - \log CV_{basal}$		
			Wild-Type (n)	Mutación (n)	p
<b>M41L</b>	94 (68,6%)	-	1,42±1,03 (43)	1,09±1,24 (94)	<b>0,103</b>
<b>E44D</b>	23 (16,8%)	-	1,25±1,12 (114)	0,89±1,46 (23)	<b>0,090</b>
A62V	1 (0,7%)		1,19±1,19 (136)	1,64 (1)	0,861
K65R	1 (0,7%)		1,18±1,18 (136)	2,82 (1)	0,146
<b>D67N</b>	65 (47,4%)	-	1,31±1,05 (72)	1,06±1,31 (65)	<b>0,115</b>
<b>T69D</b>	9 (6,6%)	+	1,16±1,19 (128)	1,68±1,05 (9)	<b>0,168</b>
INS69	1 (0,7%)		1,19±1,18 (136)	1,64 (1)	0,800
<b>K70R</b>	34 (24,8%)	+	1,09±1,78 (103)	1,48±0,98 (34)	<b>0,101</b>
L74V	9 (6,6%)		1,19±1,20 (128)	1,14±0,85 (9)	0,702
V75ITMSA	5 (3,6%)		1,20±1,17 (132)	1,05±1,53 (5)	0,801
V75I	0 (0%)		1,20±1,18 (136)	-----	-----
F77L	0 (0%)		1,19±1,18 (137)	-----	-----
F116Y	0 (0%)		1,19±1,18 (137)	-----	-----
<b>V118I</b>	43 (31,4%)	-	1,33±1,10 (94)	0,90±1,30 (43)	<b>0,020</b>
Q151M	0 (0%)		1,19±1,18 (137)	-----	-----
<b>M184V/I</b>	64 (46,7%)	+	0,98±1,23 (73)	1,43±1,08 (64)	<b>0,020</b>
M184V	63 (46%)		1,01±1,25 (74)	1,40±1,07 (63)	0,041
M184I	1 (0,7%)		1,18±1,17 (136)	3,14 (1)	0,073
<b>L210W</b>	63 (46%)	-	1,49±1,06 (74)	0,85±1,23 (63)	<b>0,002</b>
T215Y/F	101 (73,7%)		1,61±1,11 (35)	1,05±1,18 (102)	0,013
<b>T215Y</b>	82 (59,9%)	-	1,56±1,11 (55)	0,95±1,17 (82)	<b>0,003</b>
T215F	22 (16,1%)		1,17±1,19 (115)	1,32±1,17 (22)	0,633
K219Q/E	34 (24,8%)		1,16±1,20 (103)	1,29±1,14 (34)	0,778
K219Q	11 (8,9%)		1,17±1,17 (113)	1,63±1,22 (11)	0,310
K219E	10 (8,1%)		1,21±1,20 (114)	1,29±0,96 (10)	0,891

En primer lugar se llevó a cabo el desarrollo del score teniendo en cuenta las mutaciones con una prevalencia  $\geq 10\%$ . Mediante el test de Jonkheere-Terpstra se estudió el efecto sobre la respuesta virológica de distintas agrupaciones de dichas mutaciones.

Al tener en cuenta únicamente la suma de mutaciones con **efecto negativo** se obtuvieron los resultados que se muestran en la tabla 4.10.

**Tabla 4.10. Influencia de distintas combinaciones de mutaciones (10%) con efecto negativo sobre la respuesta virológica a DIDANOSINA (método *removing*)**

		Combinación mutaciones (-)	p (J.Terpstra)
<b>(k)</b>		41+44+67+118+210+215Y	$4,8 \cdot 10^{-4}$
<b>(k-1)</b>	(-215)	41+44+67+118+210	$1,5 \cdot 10^{-3}$
	(-210)	41+44+67+118+215Y	$9,3 \cdot 10^{-4}$
	(-118)	41+44+67+210+215Y	$5,7 \cdot 10^{-4}$
	(-67)	41+44+118+210+215Y	$1,5 \cdot 10^{-3}$
	(-44)	41+67+118+210+215Y	$4,5 \cdot 10^{-4}$
	(-41)	44+67+118+210+215Y	$2,1 \cdot 10^{-4}$

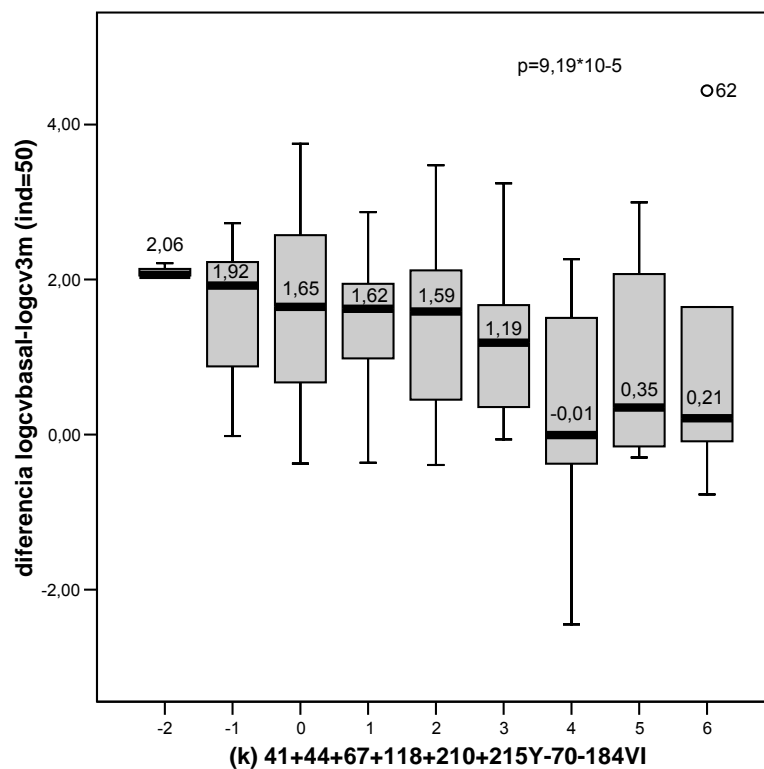
A continuación, se consideraron también aquellas mutaciones con **efecto positivo** sobre la respuesta virológica (tabla 4.11).

**Tabla 4.11. Influencia de distintas combinaciones de mutaciones (10%) con efecto negativo y positivo sobre la respuesta virológica a DIDANOSINA (método *removing*)**

		Combinación mutaciones (-) y (+)	p (J.Terpstra)
<b>(k)</b>		41+44+67+118+210+215Y-70-184VI	$9,19 \cdot 10^{-5}$
<b>(k-1)</b>	(-184)	41+44+67+118+210+215Y-70	$1,12 \cdot 10^{-3}$
	(-70)	41+44+67+118+210+215Y-184VI	$1,18 \cdot 10^{-4}$
	(-215)	41+44+67+118+210-70-184VI	$1,16 \cdot 10^{-4}$
	(-210)	41+44+67+118+215Y-70-184VI	$1,15 \cdot 10^{-4}$
	(-118)	41+44+67+210+215Y-70-184VI	$1,30 \cdot 10^{-4}$
	(-67)	41+44+118+210+215Y-70-184VI	$2,82 \cdot 10^{-4}$
	(-44)	41+67+118+210+215Y-70-184VI	$1,00 \cdot 10^{-4}$
	(-41)	44+67+118+210+215Y-70-184VI	$2,31 \cdot 10^{-5}$

La influencia de este score sobre la respuesta virológica se muestra gráficamente en la figura 4.4, en la que se observa cómo a medida que aumenta el número de mutaciones del score se obtiene peor respuesta. A partir de un valor 4 del score se pierde la eficacia virológica.

Figura 4.4. Respuesta a DIDANOSINA a los 3 meses según nº de mutaciones (10%)



Al considerar las mutaciones presentes en al menos el 5% de la población, se añadió a las mutaciones seleccionadas previamente, la mutación T69D, con efecto positivo.

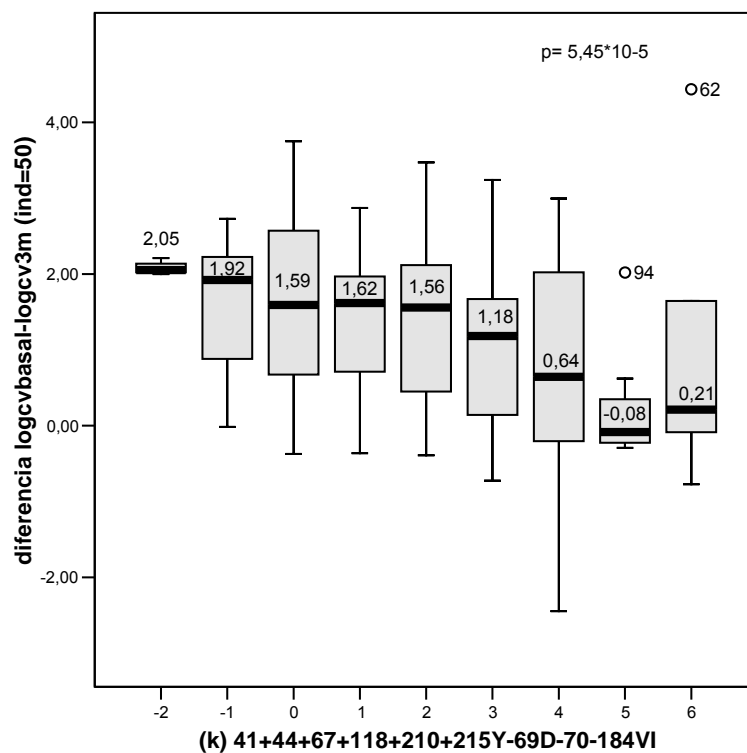
Partimos de la nueva combinación total de mutaciones con **efecto negativo** y **positivo** y mediante el test de Jonkheere-Terpstra se estudió el efecto sobre la respuesta virológica. Los resultados se muestran en la tabla 4.12.

**Tabla 4.12. Influencia de distintas combinaciones de mutaciones (5%) con efecto negativo y positivo sobre la respuesta virológica a DIDANOSINA (método *removing*)**

		Combinación mutaciones (-) y (+)	p (J.Terpstra)
<b>(k)</b>		41+44+67+118+210+215Y-69-70-184VI	5,45*10 <sup>-5</sup>
<b>(k-1)</b>	(-184)	41+44+67+118+210+215Y-69-70	2,73*10 <sup>-4</sup>
	(-70)	41+44+67+118+210+215Y-69-184VI	4,49*10 <sup>-5</sup>
	(-69)	41+44+67+118+210+215Y-70-184VI	9,19*10 <sup>-5</sup>
	(-215)	41+44+67+118+210-69-70-184VI	7,25*10 <sup>-5</sup>
	(-210)	41+44+67+118+215Y-69-70-184VI	7,45*10 <sup>-5</sup>
	(-118)	41+44+67+210+215Y-69-70-184VI	5,43*10 <sup>-5</sup>
	(-67)	41+44+118+210+215Y-69-70-184VI	1,86*10 <sup>-4</sup>
	(-44)	41+67+118+210+215Y-69-70-184VI	5,50*10 <sup>-5</sup>
	(-41)	44+67+118+210+215Y-69-70-184VI	1,39*10 <sup>-5</sup>

Por último, la influencia del score sobre la respuesta virológica se muestra gráficamente mediante el diagrama de cajas de la figura 4.5. A partir de un valor 5 del score se pierde la eficacia virológica.

**Figura 4.5. Respuesta a DIDANOSINA a los 3 meses según nº de mutaciones (5%)**



#### 4.1.4. Algoritmo de interpretación de resistencia de DIDANOSINA considerando la respuesta virológica a los 6 meses

En la tabla 4.13 se muestran todas las mutaciones estudiadas, destacando aquellas cuya prevalencia en la población estudiada fue  $\geq 10\%$  y cuya presencia a su vez tenía un efecto significativo ( $p < 0,20$ ) sobre la respuesta virológica a didanosina, medida ésta en términos de descenso de carga viral a los 6 meses.

**Tabla 4.13. Variación media de los niveles de CV a los 6 meses en presencia y ausencia de mutaciones (n=104)**

Mutación	Presencia de mutación (%)	Efecto	Diferencial $\log CV_{6m} - \log CV_{basal}$		
			Wild-Type (n)	Mutación (n)	p
<b>M41L</b>	72 ( <b>69,2%</b> )	-	1,53 $\pm$ 1,25 (32)	0,98 $\pm$ 1,31 (72)	<b>0,049</b>
<b>E44D</b>	19 ( <b>18,3%</b> )	-	1,27 $\pm$ 1,23 (85)	0,63 $\pm$ 1,55 (19)	<b>0,021</b>
A62V	0 (0%)		1,15 $\pm$ 1,31 (104)	-----	-----
K65R	0 (0%)		1,15 $\pm$ 1,31 (104)	-----	-----
D67N	51 (49%)		1,27 $\pm$ 1,29 (53)	1,03 $\pm$ 1,33 (51)	0,279
T69D	9 (8,7%)		1,14 $\pm$ 1,30 (95)	1,26 $\pm$ 1,46 (9)	0,768
INS69	0 (0%)		1,15 $\pm$ 1,31 (104)	-----	-----
<b>K70R</b>	25 ( <b>24%</b> )	+	1,05 $\pm$ 1,41 (79)	1,47 $\pm$ 0,91 (25)	<b>0,093</b>
L74V	5 (4,8%)		1,16 $\pm$ 1,34 (99)	0,84 $\pm$ 0,71 (5)	0,548
V75ITMSA	4 (3,8%)		1,15 $\pm$ 1,30 (100)	1,10 $\pm$ 1,77 (4)	0,993
V75I	0 (0%)		1,17 $\pm$ 1,31 (103)	-----	-----
F77L	0 (0%)		1,15 $\pm$ 1,31 (104)	-----	-----
F116Y	0 (0%)		1,15 $\pm$ 1,31 (104)	-----	-----
V118I	35 (33,7%)		1,22 $\pm$ 1,24 (69)	1,01 $\pm$ 1,45 (35)	0,314
Q151M	0 (0%)		1,15 $\pm$ 1,31 (104)	-----	-----
<b>M184V/I</b>	50 ( <b>48,1%</b> )	+	0,95 $\pm$ 1,26 (54)	1,37 $\pm$ 1,34 (50)	<b>0,095</b>
M184V	50 (48,1%)		0,95 $\pm$ 1,26 (54)	1,37 $\pm$ 1,34 (50)	0,095
M184I	0 (0%)		1,15 $\pm$ 1,31 (104)	-----	-----
<b>L210W</b>	53 ( <b>51%</b> )	-	1,60 $\pm$ 1,20 (51)	0,71 $\pm$ 1,28 (53)	<b>0,000</b>
T215Y/F	82 (78,8%)		2,02 $\pm$ 1,17 (22)	0,92 $\pm$ 1,25 (82)	0,000
<b>T215Y</b>	66 ( <b>63,5%</b> )	-	1,79 $\pm$ 1,21 (38)	0,78 $\pm$ 1,23 (66)	<b>0,000</b>
T215F	17 (16,3%)		1,10 $\pm$ 1,33 (87)	1,39 $\pm$ 1,22 (17)	0,351
K219Q/E	26 (25%)		1,09 $\pm$ 1,37 (78)	1,34 $\pm$ 1,11 (26)	0,352
K219Q	8 (8,4%)		1,08 $\pm$ 1,34 (87)	1,63 $\pm$ 1,09 (8)	0,238
K219E	9 (9,5%)		1,14 $\pm$ 1,35 (86)	1,05 $\pm$ 1,12 (9)	0,864

Mediante el test de Jonkheere-Terpstra se estudió el efecto sobre la respuesta virológica de distintas agrupaciones de las mutaciones seleccionadas previamente. En primer lugar, se tuvo en cuenta únicamente la suma de aquellas mutaciones con **efecto negativo** (tabla 4.14).

Tabla 4.14. Influencia de distintas combinaciones de mutaciones (10%) con efecto negativo sobre la respuesta virológica a DIDANOSINA (método *removing*)

		Combinación mutaciones (-)	p (J.Terpstra)
<b>(k)</b>		41+44+210+215Y	$1,7 \cdot 10^{-4}$
<b>(k-1)</b>	(-215)	41+44+210	$7,1 \cdot 10^{-4}$
	(-210)	41+44+215Y	$3,6 \cdot 10^{-4}$
	(-44)	41+210+215Y	$6,5 \cdot 10^{-4}$
	(-41)	44+210+215Y	$2,5 \cdot 10^{-4}$

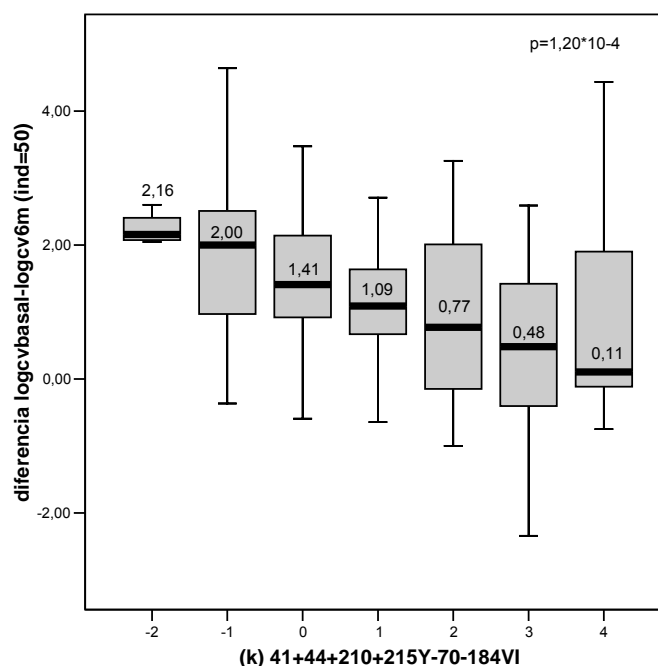
A continuación, se consideraron también aquellas mutaciones con **efecto positivo** sobre la respuesta virológica (tabla 4.15).

Tabla 4.15. Influencia de distintas combinaciones de mutaciones (10%) con efecto negativo y positivo sobre la respuesta virológica a DIDANOSINA (método *removing*)

		Combinación mutaciones (-) y (+)	p (J.Terpstra)
<b>(k)</b>		41+44+210+215Y-70-184VI	$1,20 \cdot 10^{-4}$
<b>(k-1)</b>	(-184)	41+44+210+215Y-70	$4,00 \cdot 10^{-4}$
	(-70)	41+44+210+215Y-184VI	$5,29 \cdot 10^{-4}$
	(-215)	41+44+210-70-184VI	$3,14 \cdot 10^{-4}$
	(-210)	41+44+215Y-70-184VI	$3,42 \cdot 10^{-4}$
	(-44)	41+210+215Y-70-184VI	$1,11 \cdot 10^{-3}$
	(-41)	44+210+215Y-70-184VI	$2,45 \cdot 10^{-4}$

El efecto de este score sobre la respuesta virológica se muestra gráficamente en la figura 4.6. A partir de un valor 3 del score se pierde la eficacia virológica.

Figura 4.6. Respuesta virológica a DIDANOSINA a los 6 meses según nº de mutaciones (10%)



Ninguna mutación presentaba una frecuencia **5-10%** teniendo un nivel de significación de  $p < 0,20$ , por tanto, no se repitió el análisis siguiendo estos criterios.

#### 4.1.5. Algoritmo de interpretación de resistencia de ESTAVUDINA considerando la respuesta virológica a los 3 meses

En la tabla 4.16 se muestran todas las mutaciones estudiadas, destacando aquellas cuya prevalencia en la población estudiada fue  $\geq 10\%$  y cuya presencia a su vez tenía un efecto significativo ( $p < 0,20$ ) sobre la respuesta virológica a estavudina, medida ésta en términos de descenso de carga viral a los tres meses.

**Tabla 4.16. Variación media de los niveles de CV a los 3 meses en presencia y ausencia de mutaciones (n=75)**

Mutación	Presencia de mutación (%)	Efecto	Diferencia logCV3m-logCVbasal		
			Wild-Type (n)	Mutación (n)	p
<b>M41L</b>	42 (56%)	-	1.39±1.11 (33)	1.04±1.25 (42)	<b>0.162</b>
E44D	8 (10.7%)		1.22±1.11 (67)	0.97±1.86 (8)	0.354
A62V	4 (5.3%)		1.19±1.20 (71)	1.11±1.31 (4)	1.000
K65R	1 (1.3%)		1.19±1.20 (74)	1.01 (1)	0.960
<b>D67N</b>	24 (32%)	-	1.38±1.09 (51)	0.79±1.33 (24)	<b>0.029</b>
T69D	3 (4%)		1.25±1.18 (72)	-0.06±0.99 (3)	0.068
INS69	1 (1.3%)		1.19±1.20 (74)	1.64 (1)	0.773
K70R	18 (24%)		1.12±1.16 (57)	1.44±1.30 (18)	0.333
L74V	4 (4.9%)		1,14±1,21 (71)	2,06±0,30	0.088
V75ITMSA	3 (4%)		1.19±1.18 (72)	1.31±1.81 (3)	0.849
V75I	2 (2.7%)		1.22±1.19 (73)	0.18±1.17 (2)	0.274
F77L	1 (1.3%)		1.22±1.18 (74)	-0.64 (1)	0.107
F116Y	2 (2.7%)		1,22±1,19 (73)	0,18±1,17 (2)	0.274
<b>V118I</b>	24 (32%)	-	1.38±1.10 (51)	0.79±1.31 (24)	<b>0.017</b>
Q151M	3 (4%)		1.18±1.52 (72)	1.48±2.39 (3)	1.000
<b>M184V/I</b>	43 (57.3%)	+	0.81±1.15 (32)	1.48±1.16 (43)	<b>0.007</b>
M184V	42 (56%)		0.87±1.19 (33)	1.44±1.16 (42)	0.017
M184I	1 (1.3%)		1.17±1.19 (74)	2.86 (1)	0.187
<b>L210W</b>	23 (30.7%)	-	1.28±1.14 (52)	1.01±1.33 (23)	<b>0.201</b>
T215Y/F	45 (60%)		1.37±1.20 (30)	1.08±1.19 (45)	0.304
<b>T215Y</b>	40 (53.3%)	-	1.41±1.17 (35)	1.01±1.19 (40)	<b>0.129</b>
T215F	7 (9.3%)		1.20±1.20 (68)	1.14±1.23 (7)	0.899
K219Q/E	12 (16%)		1.20±1.18 (63)	1.15±1.33 (12)	0.729
K219Q	1 (1.5%)		1.20±1.19 (67)	-0.18 (1)	0.265
K219E	4 (5.9%)		1.18±1.18 (64)	1.19±1.56 (4)	0.910

Mediante el test de Jonkheere-Terpstra se estudió el efecto sobre la respuesta virológica de distintas agrupaciones de las mutaciones seleccionadas previamente. En primer lugar, se tuvo en cuenta únicamente la suma de aquellas mutaciones con **efecto negativo** (tabla 4.17).

**Tabla 4.17. Influencia de distintas combinaciones de mutaciones (10%) con efecto negativo sobre la respuesta virológica a ESTAVUDINA (método *removing*)**

		Combinación mutaciones (-)	p (J.Terpstra)
<b>(k)</b>		41+67+118+210+215Y	0,019
<b>(k-1)</b>	(-215)	41+67+118+210	0,018
	(-210)	41+67 Y+118+215	0,010
	(-118)	41+67+210+215Y	0,031
	(-67)	41+118+210+215Y	0,055
	(-41)	67+118+210+215Y	0,014

A continuación, se consideraron también aquellas mutaciones con **efecto positivo** sobre la respuesta virológica (tabla 4.18).

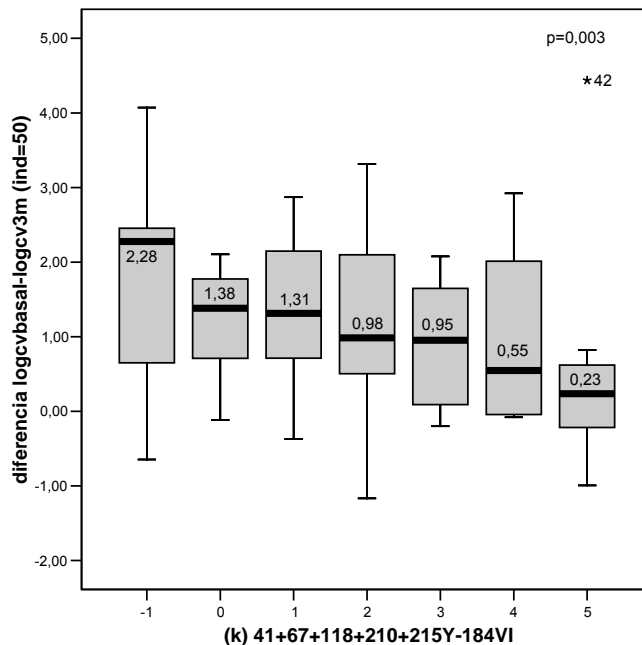
**Tabla 4.18. Influencia de distintas combinaciones de mutaciones (10%) con efecto negativo y positivo sobre la respuesta virológica a ESTAVUDINA (método *removing*)**

		Combinación mutaciones (-) y (+)	p (J.Terpstra)
<b>(k)</b>		41+67+118+210+215Y-184VI	0.003
<b>(k-1)</b>	(-184)	41+67+118+210+215Y	0.019
	(-215)	41+67+118+210-184VI	0.002
	(-210)	41+67+118+215Y-184VI	0.001
	(-118)	41+67+210+215Y-184VI	0.005
	(-67)	41+118+210+215Y-184VI	0.008
	(-41)	67+118+210+215Y-184VI	0.001



La influencia de este score sobre la respuesta virológica se muestra gráficamente en la figura 4.7. A partir de un valor 5 del score se pierde la eficacia virológica.

Figura 4.7. Respuesta virológica a ESTAVUDINA a los 3 meses según nº de mutaciones (10%)



Ninguna mutación presentaba una frecuencia **5-10%** teniendo un nivel de significación de  $p < 0,20$ , por tanto, no se repitió el análisis siguiendo estos criterios.

#### 4.1.6. Algoritmo de interpretación de resistencia de ESTAVUDINA considerando la respuesta virológica a los 6 meses

En la tabla 4.19 se muestran todas las mutaciones estudiadas, destacando aquellas cuya prevalencia en la población estudiada fue  $\geq 10\%$  y cuya presencia a su vez tenía un efecto significativo ( $p < 0,20$ ) sobre la respuesta virológica a estavudina, medida ésta en términos de descenso de carga viral a los 6 meses.

**Tabla 4.19. Variación media de los niveles de CV a los 6 meses en presencia y ausencia de mutaciones (n=54)**

Mutación	Presencia de mutación (%)	Efecto	Diferencia logCV6m-logCVbasal		
			Wild-Type (n)	Mutación (n)	p
<b>M41L</b>	32 (59.3%)	-	1.62±0.83 (22)	1.03±1.37 (32)	<b>0.060</b>
<b>E44D</b>	8 (14.8%)	-	1.35±1.08 (46)	0.85±1.80 (8)	<b>0.144</b>
A62V	1 (1.9%)		1.25±1.21 (53)	2.45 (1)	0.333
K65R	0 (0%)		1.27±1.21 (54)	(0)	----
<b>D67N</b>	18 (33.3%)	-	1.41±1.20 (36)	1.01±1.21 (18)	<b>0.177</b>
T69D	2 (3.7%)		1.32±1.21 (52)	0.06±0.08 (2)	0.162
INS69	0 (0%)		1.27±1.21 (54)	(0)	----
K70R	12 (22.2%)		1.21±1.29 (42)	1.51±0.86 (12)	0.405
L74V	4 (7.4%)		1,25±1,22 (50)	1,60±1,04 (4)	0.621
V75ITMSA	1 (1.9%)		1.24±1.19 (53)	2.92 (1)	0.132
V75I	0 (0%)		1.27±1.21 (54)	(0)	----
F77L	0 (0%)		1.27±1.21 (54)	(0)	----
F116Y	0 (0%)		1.27±1.21 (54)	(0)	----
<b>V118I</b>	19 (35.2%)	-	1.44±0.97 (35)	0.97±1.53 (19)	<b>0.150</b>
Q151M	0 (0%)		1.27±1.21 (54)	(0)	----
<b>M184V/I</b>	34 (63%)	+	0.98±1.24 (20)	1.44±1.17 (34)	<b>0.123</b>
M184V	33 (61.1%)		1.03±1.23 (21)	1.43±1.18 (33)	0.169
M184I	1 (1.9%)		1.26±1.22 (53)	1.91 (1)	0.585
L210W	18 (33.3%)		1.31±1.08 (36)	1.20±1.45 (18)	0.666
T215Y/F	35 (64.8%)		1.64±0.92 (19)	1.07±1.31 (35)	0.066
<b>T215Y</b>	32 (59.3%)	-	1.64±1.04 (22)	1.03±1.26 (32)	<b>0.036</b>
T215F	4 (7.4%)		1.27±1.18 (50)	1.29±1.71 (4)	0.766
K219Q/E	4 (7.4%)		1.35±1.22 (50)	0.37±0.55 (4)	0.129
K219Q	1 (1.9%)		1.32±1.21 (52)	0.12 (1)	0.528
K219E	2 (3.8%)		1.32±1.22 (51)	0.65±0.77 (2)	0.401

Mediante el test de Jonkheere-Terpstra se estudió el efecto sobre la respuesta virológica de distintas agrupaciones de las mutaciones seleccionadas previamente. En primer lugar, se tuvo en cuenta únicamente la suma de aquellas mutaciones con **efecto negativo** (tabla 4.20).

**Tabla 4.20. Influencia de distintas combinaciones de mutaciones (10%) con efecto negativo sobre la respuesta virológica a ESTAVUDINA (método *removing*)**

		Combinación mutaciones (-)	p (J.Terpstra)
<b>(k)</b>		41+44+67+118+215Y	0,009
<b>(k-1)</b>	(-215)	41+44+67+118	0,018
	(-118)	41+44+67+215Y	0,011
	(-67)	41+44+118+215Y	0,015
	(-44)	41+67+118+215Y	0,018
	(-41)	44+67+118+215Y	0,005

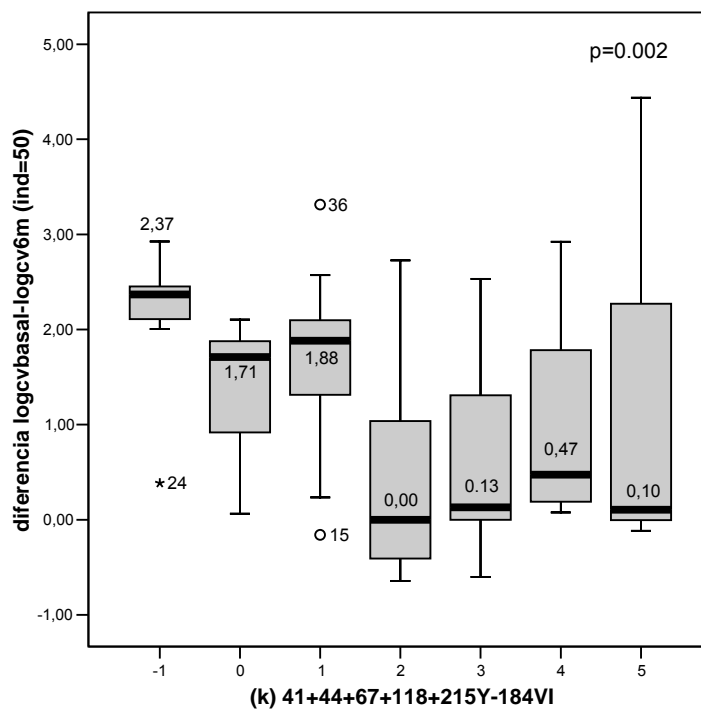
A continuación, se consideraron también aquellas mutaciones con **efecto positivo** sobre la respuesta virológica (tabla 4.21).

**Tabla 4.21. Influencia de distintas combinaciones de mutaciones (10%) con efecto negativo y positivo sobre la respuesta virológica a ESTAVUDINA (método *removing*)**

		Combinación mutaciones (-) y (+)	p (J.Terpstra)
<b>(k)</b>		41+44+67+118+215Y-184VI	0.002
<b>(k-1)</b>	(-184)	41+44+67+118+215Y	0.011
	(-215)	41+44+67+118-184VI	0.002
	(-118)	41+44+67+215Y-184VI	0.002
	(-67)	41+44+118+215Y-184VI	0.002
	(-44)	41+67+118+215Y-184VI	0.003
	(-41)	44+67+118+215Y-184VI	0.001

Por último, se vio la influencia de este score sobre la respuesta virológica, según la variación en la carga viral en función del número de mutaciones de dicho score que presentasen los pacientes. Este efecto se muestra gráficamente en la figura 4.8. A partir de un valor 2 del score se pierde la eficacia virológica.

Figura 4.8. Respuesta virológica a ESTAVUDINA a los 6 meses según nº de mutaciones (10%)



Ninguna mutación presentaba una frecuencia **5-10%** teniendo un nivel de significación de  $p < 0,20$ , por tanto, no se repitió el análisis siguiendo estos criterios.

#### 4.1.7. Algoritmo de interpretación de resistencia de LOPINAVIR/RITONAVIR considerando la respuesta virológica a los 3 meses

En la tabla 4.22 se muestran todas las mutaciones estudiadas, destacando aquellas cuya prevalencia en la población estudiada fue  $\geq 10\%$  o  $\geq 5\%$  y cuya presencia a su vez tenía un efecto significativo ( $p < 0,20$ ) sobre la respuesta virológica a lopinavir/ritonavir, medida ésta en términos de descenso de carga viral a los 3 meses.

Tabla 4.22. Variación media de los niveles de CV a los 3 meses en presencia y ausencia de mutaciones (n=110)

Mutación	Presencia de mutación (%)	Efecto	Diferencia logCV3m-logCVbasal		
			Wild-Type (n)	Mutación (n)	p
<b>10FIRV</b>	59 (48%)	-	1.67±1.35 (64)	1.16±1.10 (59)	<b>0.018</b>
10F	9 (8.2%)		1.58±1.23 (101)	0.86±0.93 (9)	0.065
10I	30 (27.3%)		1.61±1.29 (80)	1.29±1.01 (30)	0.145
10R	0 (0%)		1.52±1.22 (110)	0 (0)	----
10V	8 (7.3%)		1.49±1.25 (102)	1.88±0.77 (8)	0.401
20MR	10 (8.1%)		1.44±1.27 (113)	1.29±1.11 (10)	0.684
20M	2 (1.7%)		1.46±1.27 (119)	0.13±0.52 (2)	0.108
20R	6 (5%)		1.41±1.28 (115)	1.83±1.09 (6)	0.358
24I	6 (4.9%)		1.41±1.25 (117)	1.78±1.43 (6)	0.716
<b>30N</b>	10 (8,1%)	+	1.37±1.25 (113)	2.02±1.23 (10)	<b>0.136</b>
32I	8 (6.5%)		1.43±1.26 (115)	1.31±1.29 (8)	0.608
33F	4 (3.3%)		1.45±1.26 (119)	0.76±1.32 (4)	0.311
36I	45 (36.6%)		1.48±1.20 (78)	1.34±1.36 (45)	0.713
<b>46IL</b>	45 (36.6%)	-	1.53±1.28 (78)	1.24±1.20 (45)	<b>0.107</b>
46I	26 (23.9%)		1.56±1.25 (83)	1.03±0.99 (26)	0.025
46L	5 (4.6%)		1.41±1.23 (104)	2.04±0.46 (5)	0.241
47V	5 (4.1%)		1.44±1.27 (118)	1.09±0.87 (5)	0.473
48V	5 (4.1%)		1.40±1.25 (118)	1.97±1.46 (5)	0.450
50V	1 (0.8%)		1.41±1.26 (122)	2.87 (1)	0.176
53L	5 (4.1%)		1.43±1.28 (118)	1.29±0.87 (5)	0.828
<b>54VMLT</b>	33 (26.8%)	-	1.53±1.29 (90)	1.15±1.14 (33)	<b>0.083</b>
54V	23 (19.7%)		1.52±1.28 (94)	1.33±1.19 (23)	0.411
54L	4 (3.4%)		1.49±1.27 (113)	1.27±1.08 (4)	0.653
54M	0 (0%)		1.48±1.26 (117)	0 (0)	----
54S	1 (1%)		1.45±1.27 (100)	0.50 (1)	0.337
58E	3 (2.4%)		1.43±1.25 (120)	1.30±1.98 (3)	0.945
63P	56 (45.5%)		1.41±1.17 (67)	1.44±1.37 (56)	0.780
71VT	55 (44.7%)		1.43±1.31 (68)	1.42±1.19 (55)	0.665
71V	28 (26.4%)		1.37±1.29 (78)	1.46±1.03 (28)	0.971
71T	10 (9.4%)		1.44±1.23 (96)	0.98±1.04 (10)	0.218
73S	20 (16.3%)		1.48±1.27 (103)	1.12±1.17 (20)	0.230
<b>77I</b>	19 (15.4%)	-	1.48±1.32 (104)	1.14±0.82 (19)	<b>0.191</b>
<b>82AFTS</b>	30 (24.4%)	-	1.52±1.23 (93)	1.14±1.32 (30)	<b>0.121</b>
82A	14 (12.2%)		1.51±1.21 (101)	1.30±1.17 (14)	0.402
82F	0 (0%)		1.48±1.20 (15)	0 (0)	----
82T	6 (5.2%)		1.49±1.21 (109)	1.43±1.08 (6)	0.831
82S	2 (1.9%)		1.38±1.17 (102)	1.37±0.87 (2)	1.000
<b>84V</b>	26 (21.1%)	-	1.58±1.28 (97)	0.84±1.02 (26)	<b>0.004</b>
88	13 (10.6%)		1.39±1.21 (110)	1.68±1.66 (13)	0.633
90M	63 (51.2%)		1.49±1.19 (60)	1.36±1.33 (63)	0.631

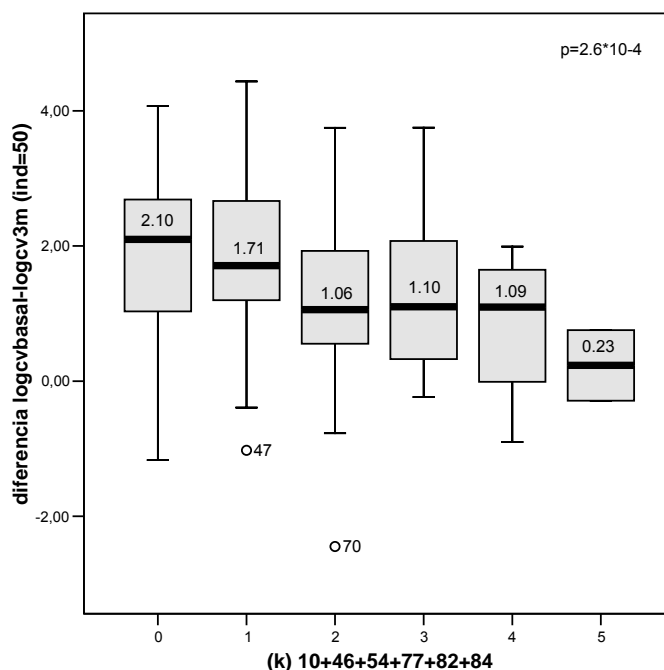
En primer lugar se llevó a cabo el desarrollo del score teniendo en cuenta las mutaciones con una prevalencia  $\geq 10\%$ . El efecto de todas ellas sobre la carga viral fue en todos los casos **negativo**. Mediante el test de Jonkheere-Terpstra se estudió el efecto sobre la respuesta virológica de distintas agrupaciones de las mutaciones seleccionadas previamente (tabla 4.23).

**Tabla 4.23. Influencia de distintas combinaciones de mutaciones (10%) con efecto negativo sobre la respuesta virológica a LOPINAVIR/RITONAVIR (método *removing*)**

		Combinación mutaciones (-)	p (J.Terpstra)
<b>(k)</b>		10FIRV+46IL+54VMLT+77I+82AFTS+84V	$2.6 \cdot 10^{-4}$
<b>(k-1)</b>	(-84)	10FIRV+46IL+54VMLT+77I+82AFTS	$2,1 \cdot 10^{-3}$
	(-82)	10FIRV+46IL+54VMLT+77I+84V	$1,1 \cdot 10^{-3}$
	(-77)	10FIRV+46IL+54VMLT+82AFTS+84V	$1,1 \cdot 10^{-3}$
	(-54)	10FIRV+46IL+77I+82AFTS+84V	$2.1 \cdot 10^{-4}$
	(-46)	10FIRV+54VMLT+77I+82AFTS+84V	$3.3 \cdot 10^{-4}$
	(-10)	46IL+54VMLT+77I+82AFTS+84V	$1,1 \cdot 10^{-3}$

El efecto de este score sobre la respuesta virológica, se muestra gráficamente en la figura 4.9. A partir de un valor **5** del score se pierde la eficacia virológica.

**Figura 4.9. Respuesta virológica a LOPINAVIR/RITONAVIR a los 3 meses según nº de mutaciones (10%)**



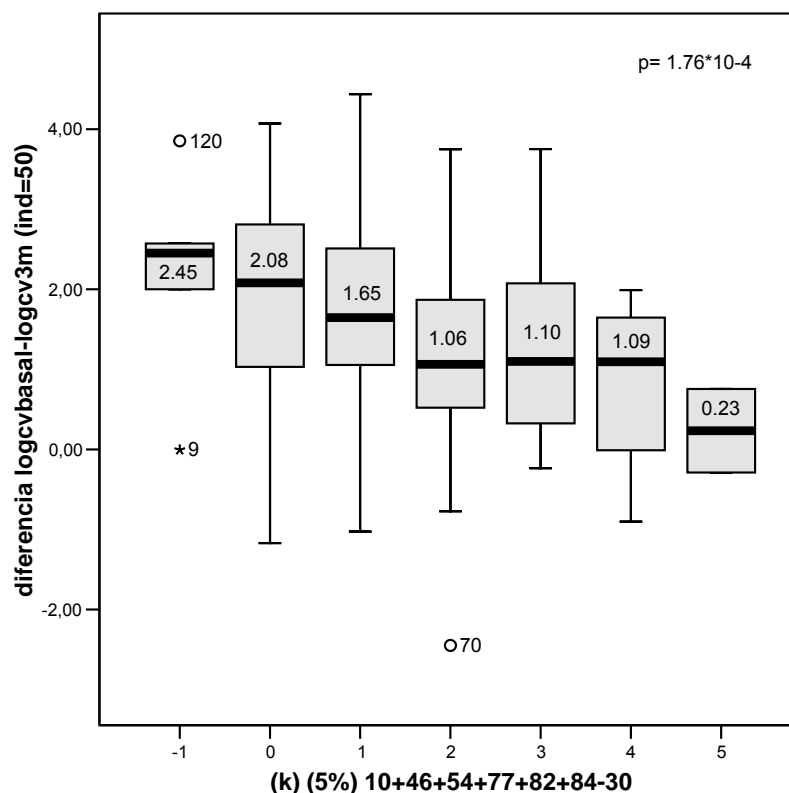
Al considerar las mutaciones presentes en  $\geq 5\%$ , entraría en el modelo la mutación D30N, con **efecto positivo** sobre la respuesta virológica. Por tanto, se partió de la combinación 10+46+54+77+82+84-30 para llevar a cabo el nuevo análisis estadístico (Tabla 4.24).

**Tabla 4.24. Influencia de distintas combinaciones de mutaciones (5%) con efecto negativo y positivo sobre la respuesta virológica a LOPINAVIR/RITONAVIR (método removing)**

		Combinación mutaciones (-) y (+)	p (J.Terpstra)
<b>(k)</b>		10FIRV+46IL+54VMLT+77I+82AFTS+84V-30N	1.8*10 <sup>-4</sup>
<b>(k-1)</b>	(-30)	10FIRV+46IL+54VMLT+77I+82AFTS+84V	2.6*10 <sup>-4</sup>
	(-84)	10FIRV+46IL+54VMLT+77I+82AFTS-30N	1,1*10 <sup>-3</sup>
	(-82)	10FIRV+46IL+54VMLT+84V-30N	3.1*10 <sup>-4</sup>
	(-77)	10FIRV+46IL+82AFTS+84V-30N	3.6*10 <sup>-4</sup>
	(-54)	10FIRV+77I+82AFTS+84V-30N	1.5*10 <sup>-4</sup>
	(-46)	10FIRV+54VMLT+77I+82AFTS+84V	2.2*10 <sup>-4</sup>
	(-10)	46IL+54VMLT+77I+82AFTS+84V-30N	3.7*10 <sup>-4</sup>

La influencia de este score sobre la respuesta virológica se muestra gráficamente en la figura 4.10. A partir de un valor **5** del score se pierde la eficacia virológica.

**Figura 4.10. Respuesta virológica a LOPINAVIR/RITONAVIR a los 3 meses según nº de mutaciones (5%)**



#### 4.1.8. Algoritmo de interpretación de resistencia de LOPINAVIR/RITONAVIR considerando la respuesta virológica a los 6 meses

En la tabla 4.25 se muestran se muestran todas las mutaciones estudiadas, destacando aquellas cuya prevalencia en la población estudiada fue  $\geq 10\%$  y  $\geq 5\%$  y cuya presencia a su vez tenía un efecto significativo ( $p < 0,20$ ) sobre la respuesta virológica a lopinavir/ritonavir, medida ésta en términos de descenso de carga viral a los 6 meses.

Tabla 4.25. Variación media de los niveles de CV a los 3 meses en presencia y ausencia de mutaciones (n=89)

Mutación	Presencia de mutación(%)	Efecto	Diferencia logCV6m-logCVbasal		
			Wild-Type (n)	Mutación (n)	p
<b>10FIRV</b>	42 (42.9%)	-	1.62±1.36 (56)	0.95±1.33 (42)	<b>0.013</b>
10F	6 (6.7%)		1.47±1.37 (83)	0.75±0.77 (6)	0.145
10I	23 (25.8%)		1.58±1.30 (66)	0.98±1.42 (23)	0.048
10R	0 (0%)		1.43±1.35 (89)	(0)	----
10V	5 (5.6%)		1.40±1.37 (84)	1.80±0.78 (5)	0.593
<b>20MR</b>	7 (7.1%)	-	1.39±1.39 (91)	0.62±1.03 (7)	<b>0.116</b>
20M	2 (2.1%)		1.38±1.37 (95)	-0.35±0.14 (2)	0.071
20R	4 (4.1%)		1.35±1.40 (93)	1.27±0.88 (4)	0.786
24I	5 (5.1%)		1.32±1.39 (93)	1.52±1.16 (5)	0.716
<b>30N</b>	8 (8.2%)	+	1.25±1.40 (90)	2.24±0.65 (8)	<b>0.037</b>
32I	6 (6.1%)		1.33±1.38 (92)	1.45±1.58 (6)	0.917
33F	4 (4.1%)		1.38±1.37 (94)	0.31±1.51 (4)	0.123
36I	34 (34.7%)		1.48±1.32 (64)	1.05±1.47 (34)	0.278
<b>46IL</b>	39 (39.8%)	-	1.48±1.35 (59)	1.12±1.42 (39)	<b>0.135</b>
46I	22 (25.6%)		1.46±1.33 (64)	0.95±1.33 (22)	0.097
46L	5 (5.8%)		1.33±1.36 (81)	1.33±1.23 (5)	0.934
47V	3 (3.1%)		1.34±1.39 (95)	1.23±1.44 (3)	0.877
48V	6 (6.1%)		1.33±1.34 (92)	1.38±2.09 (6)	0.744
50V	1 (1%)		1.35±1.37 (97)	-0.66 (1)	0.124
53L	3 (3.1%)		1.32±1.39 (95)	1.58±1.38 (3)	0.657
<b>54VMLT</b>	27 (27.6%)	-	1.48±1.34 (71)	0.93±1.44 (27)	<b>0.043</b>
54V	23 (24.2%)		1.49±1.33 (72)	0.96±1.51 (23)	0.071
54L	1 (1.1%)		1.36±1.39 (94)	1.69 (1)	0.884
54M	0 (0%)		1.36±1.38 (95)	(0)	----
54S	1 (1.3%)		1.35±1.39 (79)	-0.45 (1)	0.187
58E	2 (2%)		1.33±1.38 (96)	1.27±2.33 (2)	0.949
<b>63P</b>	47 (48%)	+	1.12±1.28 (51)	1.56±1.46 (47)	<b>0.110</b>
71VT	44 (44.9%)		1.29±1.35 (54)	1.39±1.43 (44)	0.940
71V	24 (28.2%)		1.25±1.31 (61)	1.36±1.44 (24)	0.984
71T	7 (8.2%)		1.31±1.37 (78)	0.97±1.02 (7)	0.415
73S	13 (13.3%)		1.33±1.37 (85)	1.36±1.49 (13)	0.929
<b>77I</b>	15 (15.3%)	-	1.41±1.40 (83)	0.93±1.24 (15)	<b>0.184</b>
<b>82AFTS</b>	28 (28.6%)	-	1.49±1.29 (70)	0.94±1.53 (28)	<b>0.063</b>
82A	13 (14.3%)		1.44±1.29 (78)	1.15±1.58 (13)	0.364
82F	0 (0%)		1.40±1.33 (91)	(0)	----
82T	6 (6.6%)		1.44±1.33 (85)	0.85±1.24 (6)	0.263
82S	2 (2.4%)		1.27±1.31 (80)	1.57±1.42 (2)	0.741
<b>84V</b>	16 (16.3%)	-	1.48±1.35 (82)	0.57±1.35 (16)	<b>0.013</b>
<b>88DS</b>	10 (10.2%)	+	1.21±1.32 (88)	2.42±1.49 (10)	<b>0.022</b>
<b>90M</b>	50 (51%)	-	1.52±1.07 (48)	1.15±1.62 (50)	<b>0.153</b>



En primer lugar se llevó a cabo el desarrollo del score teniendo en cuenta las mutaciones con una prevalencia  $\geq 10\%$ . Mediante el test de Jonkheere-Terpstra se estudió el efecto sobre la respuesta virológica de distintas agrupaciones de las mutaciones seleccionadas previamente. Inicialmente, se tuvo en cuenta únicamente la suma de aquellas mutaciones con efecto **negativo** (tabla 4.26).

**Tabla 4.26. Influencia de distintas combinaciones de mutaciones (10%) con efecto negativo sobre la respuesta virológica a LOPINAVIR/RITONAVIR (método *removing*)**

		Combinación mutaciones (-)	p (J.Terpstra)
<b>(k)</b>		10FIRV+46IL+54VMLT+77I+82AFTS+84V+90	0,001
<b>(k-1)</b>	(-90)	10FIRV+46IL+54VMLT+77I+82AFTS+84V	0,001
	(-84)	10FIRV+46IL+54VMLT+77I+82AFTS+90	0,002
	(-82)	10FIRV+46IL+54VMLT+77I+84V+90	0,002
	(-77)	10FIRV+46IL+54VMLT+82AFTS+84V+90	0,001
	(-54)	10FIRV+46IL+77I+82AFTS+84V+90	0,001
	(-46)	10FIRV+54VMLT+77I+82AFTS+84V+90	0,001
	(-10)	46IL+54VMLT+77I+82AFTS+84V+90	0,002

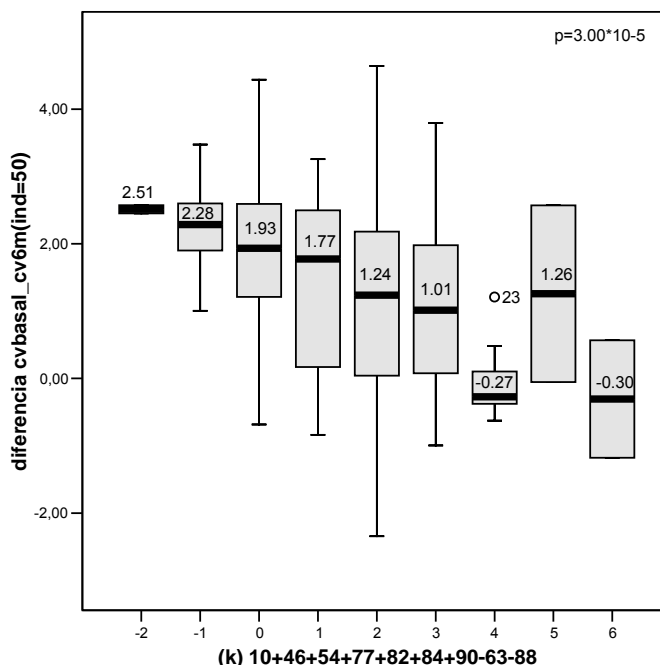
A continuación, se consideraron también aquellas mutaciones con efecto **positivo** sobre la respuesta virológica (tabla 4.27).

**Tabla 4.27. Influencia de distintas combinaciones de mutaciones (10%) con efecto negativo y positivo sobre la respuesta virológica a LOPINAVIR/RITONAVIR (método *removing*)**

		Combinación mutaciones (-) y (+)	p (J.Terpstra)
<b>(k)</b>		10FIRV+46IL+54VMLT+77I+82AFTS+84V+90-63P-88DS	3,00*10 <sup>-5</sup>
<b>(k-1)</b>	(-88)	10FIRV+46IL+54VMLT+77I+82AFTS+84V+90-63P	1,02*10 <sup>-4</sup>
	(-63)	10FIRV+46IL+54VMLT+77I+82AFTS+84V+90-88DS	3,31*10 <sup>-4</sup>
	(-90)	10FIRV+46IL+54VMLT+77I+82AFTS+84V-63P-88DS	1,67*10 <sup>-5</sup>
	(-84)	10FIRV+46IL+54VMLT+77I+82AFTS+90-63P-88DS	7,89*10 <sup>-5</sup>
	(-82)	10FIRV+46IL+54VMLT+77I+84V+90-63P-88DS	5,60*10 <sup>-5</sup>
	(-77)	10FIRV+46IL+54VMLT+82AFTS+84V+90-63P-88DS	4,94*10 <sup>-5</sup>
	(-54)	10FIRV+46IL+77I+82AFTS+84V+90-63P-88DS	1,69*10 <sup>-5</sup>
	(-46)	10FIRV+54VMLT+77I+82AFTS+84V+90-63P-88DS	2,89*10 <sup>-5</sup>
	(-10)	46IL+54VMLT+77I+82AFTS+84V+90-63P-88DS	5,15*10 <sup>-5</sup>

La influencia de este score sobre la respuesta virológica se muestra gráficamente en la figura 4.11. A partir de un valor **4** del score se pierde la eficacia virológica.

**Figura 4.11. Respuesta virológica a LOPINAVIR/RITONAVIR a los 6 meses según nº de mutaciones (10%)**



Al considerar las mutaciones presentes en  $\geq 5\%$  con **efecto negativo**, entraría en el modelo la mutación 20MR. Partimos de la nueva combinación de mutaciones y mediante el test de Jonkheere-Terpstra se estudió el efecto sobre la respuesta virológica (tabla 4.28).

**Tabla 4.28. Influencia de distintas combinaciones de mutaciones (5%) con efecto negativo sobre la respuesta virológica a LOPINAVIR/RITONAVIR (método removing)**

	Combinación mutaciones (-)	p (J.Terpstra)
<b>(k)</b>	10FIRV+20MR+46IL+54VMLT+77I+82AFTS+84V+90	5,17*10 <sup>-4</sup>
<b>(k-1)</b>	(-90) 10FIRV+20MR+46IL+54VMLT+77I+82AFTS+84V	5,37*10 <sup>-4</sup>
	(-84) 10FIRV+20MR+46IL+54VMLT+77I+82AFTS+90	1,11*10 <sup>-3</sup>
	(-82) 10FIRV+20MR+46IL+54VMLT+77I+84V+90	9,79*10 <sup>-4</sup>
	(-77) 10FIRV+20MR+46IL+54VMLT+82AFTS+84V+90	7,05*10 <sup>-4</sup>
	(-54) 10FIRV+20MR+46IL+77I+82AFTS+84V+90	4,29*10 <sup>-4</sup>
	(-46) 10FIRV+20MR+54VMLT+77I+82AFTS+84V+90	5,31*10 <sup>-4</sup>
	(-20) 10FIRV+46IL+54VMLT+77I+82AFTS+84V+90	7,67*10 <sup>-4</sup>
	(-10) 20MR+46IL+54VMLT+77I+82AFTS+84V+90	9,39*10 <sup>-4</sup>

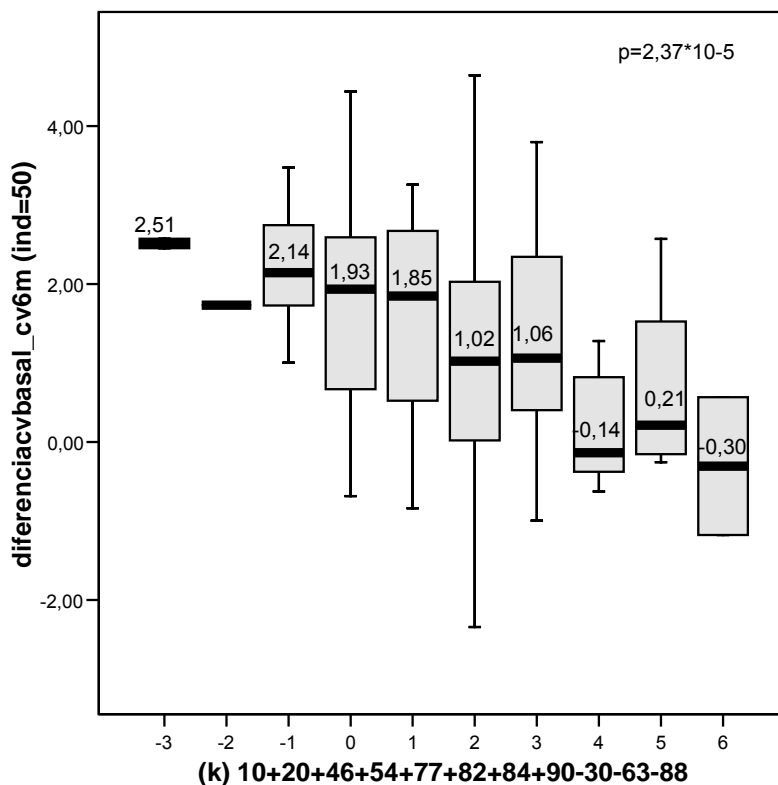
A continuación, se consideraron también aquellas mutaciones con efecto **positivo** sobre la respuesta virológica (tabla 4.29).

**Tabla 4.29. Influencia de distintas combinaciones de mutaciones (5%) con efecto negativo y positivo sobre la respuesta virológica a LOPINAVIR/RITONAVIR (método *removing*)**

	Combinación mutaciones (-) y (+)	p (J.Terpstra)
<b>(k)</b>	10FIRV+20MR+46IL+54VMLT+77I+82AFTS+84V+90-30-63-88	2,37*10 <sup>-5</sup>
<b>(k-1)</b>	(-88) 10FIRV+20MR+46IL+54VMLT+77I+82AFTS+84V+90-30-63	5,98*10 <sup>-5</sup>
	(-63) 10FIRV+20MR+46IL+54VMLT+77I+82AFTS+84V+90-30-88	1,77*10 <sup>-4</sup>
	(-30) 10FIRV+20MR+46IL+54VMLT+77I+82AFTS+84V+90-63-88	2,91*10 <sup>-5</sup>
	(-90) 10FIRV+20MR+46IL+54VMLT+77I+82AFTS+84V-30-63-88	1,44*10 <sup>-5</sup>
	(-84) 10FIRV+20MR+46IL+54VMLT+77I+82AFTS+90-30-63-88	5,47*10 <sup>-5</sup>
	(-82) 10FIRV+20MR+46IL+54VMLT+77I+84V+90-30-63-88	2,82*10 <sup>-5</sup>
	(-77) 10FIRV+20MR+46IL+54VMLT+82AFTS+84V+90-30-63-88	3,64*10 <sup>-5</sup>
	(-54) 10FIRV+20MR+46IL+77I+82AFTS+84V+90-30-63-88	1,39*10 <sup>-5</sup>
	(-46) 10FIRV+20MR+54VMLT+77I+82AFTS+84V+90-30-63-88	2,28*10 <sup>-5</sup>
	(-20) 10FIRV+46IL+54VMLT+77I+82AFTS+84V+90-30-63-88	2,44*10 <sup>-5</sup>
	(-10) 20MR+46IL+54VMLT+77I+82AFTS+84V+90-30-63-88	2,33*10 <sup>-5</sup>

La influencia de este score sobre la respuesta virológica se muestra gráficamente en la figura 4.12. A partir de un valor **4** del score se pierde la eficacia virológica.

**Figura 4.12. Respuesta virológica a LOPINAVIR/RITONAVIR a los 6 meses según nº de mutaciones (5%)**



#### 4.1.9. Algoritmo de interpretación de resistencia de FOSAMPRENAVIR/RITONAVIR considerando la respuesta virológica a los 3 meses

En la tabla 4.30 se muestran todas las mutaciones estudiadas, destacando aquellas cuya prevalencia en la población estudiada fue  $\geq 10\%$  y  $\geq 5\%$  y cuya presencia a su vez tenía un efecto significativo ( $p < 0,20$ ) sobre la respuesta virológica a fosamprenavir/ritonavir, medida ésta en términos de descenso de carga viral a los tres meses. Todas tuvieron un efecto negativo sobre el descenso de carga viral.

**Tabla 4.30. Variación media de los niveles de CV en presencia y ausencia de mutaciones (n=203)**

Mutación	Presencia de mutación (%)	Efecto	Diferencia $\log CV_{3m} - \log CV_{basal}$		
			Wild-Type (n)	Mutación (n)	p
<b>10FIRV</b>	102 ( <b>50,25%</b> )	-	1,68±1.00 (101)	0.83±1.17 (102)	<b>1.38*10<sup>-7</sup></b>
10F	11 (5.42%)		1.30±1.15 (192)	0.47±1.27 (11)	
10I	79 (38.92%)		1.57±1.06 (124)	0.75±1.17 (79)	
10R	1 (0.49%)		1.26±1.17 (202)	-0.15 (1)	
10V	15 (7.39%)		1.25±1.17 (188)	1.35±1.18 (15)	
<b>20MRIT</b>	42 ( <b>20.69%</b> )	-	1.41±1.13 (161)	0.65±1.14 (42)	<b>1.6*10<sup>-4</sup></b>
20M	7 (3.45%)		1.26±1.67 (196)	0.97±1.36 (7)	
20R	26 (12.81%)		1.35±1.15 (177)	0.58±1.11 (26)	
20I	6 (2.96%)		1.25±1.17 (197)	1.31±1.39 (6)	
20T	5 (2.46%)		1.28±1.17 (198)	0.01±0.50 (5)	
<b>24I</b>	18 ( <b>8.87%</b> )	-	1.29±1.16 (185)	0.86±1.24 (18)	<b>0.128</b>
30N	10 (4.93%)		1.20±1.16 (193)	2.28±0.83 (10)	0.005
32I	2 (0.98%)		1.26±1.18 (201)	0.95±1.06 (2)	0.668
<b>33FIV</b>	25 ( <b>12.31%</b> )	-	1.38±1.14 (178)	0.36±1.06 (25)	<b>3.86*10<sup>-5</sup></b>
33F	23 (11.33%)		1.36±1.15 (180)	0.45±1.01 (23)	
33I	2 (0.98%)		1.27±1.16 (201)	-0.67±1.45 (2)	
33V	0 (0%)		(0)	(0)	
<b>36ILV</b>	74 ( <b>36.45%</b> )	-	1.36±1.10 (129)	1.08±1.28 (74)	<b>0.118</b>
36I	68 (33.50)		1.37±1.12 (135)	1.02±1.25 (68)	
36L	7 (5.26%)		1.03±1.10 (126)	1.30±1.73 (7)	
36V	1 (0.78%)		1.06±1.14 (127)	0.04 (1)	
<b>46IL</b>	49 ( <b>24.14%</b> )	-	1.42±1.16 (154)	0.72±1.06 (49)	<b>1.5*10<sup>-4</sup></b>
46I	28 (13.79%)		1.32±1.18 (175)	0.84±1.08 (28)	
46L	21 (10.34%)		1.33±1.16 (182)	0.57±1.05 (21)	
47V	3 (1.48%)		1.27±1.17 (200)	0.05±0.44 (3)	0.064
48V	15 (7.39%)		1.26±1.18 (188)	1.13±1.12 (15)	0.632
50VL	0 (0%)		(0)	(0)	
50V	0 (0%)		(0)	(0)	
50L	0 (0%)		(0)	(0)	
<b>53L</b>	16 ( <b>7.88%</b> )	-	1.30±1.15 (158)	0.73±1.32 (16)	<b>0.060</b>
<b>54VMLST</b>	61 ( <b>30.05%</b> )	-	1.48±1.08 (142)	0.74±1.22 (61)	<b>3.76*10<sup>-5</sup></b>
54V	55 (27.09%)		1.42±1.10 (148)	0.81±1.25 (55)	
54M	0 (0%)		(0)	(0)	
54L	7 (3.45%)		1.29±1.17 (196)	0.25±0.62 (7)	
54S	0 (0%)		(0)	(0)	
54T	1 (0.49%)		1.26±1.17 (202)	0.50 (1)	
58E	2 (0.98%)		1.27±1.17 (201)	-0.25±0.36 (2)	0.058
63P	145 (71.43%)		1.32±1.24 (58)	1.23±1.15 (145)	0.523
<b>71VTLI</b>	86 ( <b>42.36%</b> )	-	1.45±1.11 (117)	0.99±1.21 (86)	<b>0.005</b>
71V	57 (28.08%)		1.43±1.10 (146)	0.80±1.23 (57)	
71T	28 (13.79%)		1.26±1.19 (175)	1.22±1.09 (28)	
71L	0 (0%)		(0)	(0)	
71I	3 (1.48%)		1.23±1.17 (200)	2.60±0.79 (3)	
<b>73SCTA</b>	20 ( <b>9.85%</b> )	-	1.30±1.17 (183)	0.80±1.15 (20)	<b>0.050</b>

73S	19 (9.36%)		1.30±1.17 (184)	0.84±1.17 (19)	
73C	1 (0.49%)				
73T	0 (0%)		(0)	(0)	
73A	0 (0%)		(0)	(0)	
<b>82AFTSL</b>	<b>64 (31.53%)</b>	-	1.51±1.12 (139)	0.70±1.10 (64)	<b>2.13*10<sup>-6</sup></b>
82A	49 (24.14%)		1.41±1.17 (154)	0.76±1.06 (49)	
82F	4 (1.97%)		1.26±1.16 (199)	0.69±1.77 (4)	
82T	5 (2.46%)		1.27±1.18 (198)	0.74±0.98 (5)	
82S	5 (2.46%)		1.27±1.16 (198)	0.70±1.53 (5)	
82L	1 (0.49%)				
<b>84V</b>	<b>15 (7.39%)</b>	-	1.32±1.15 (188)	0.38±1.17 (15)	<b>0.004</b>
88DS	14 (6.90%)		1.23±1.18 (189)	1.60±1.08 (14)	0.300
88D	11 (5.42%)		1.22±1.17 (192)	1.79±1.06 (11)	
88S	3 (1.48%)		1.26±1.18 (200)	0.92±1.07 (3)	
<b>90M</b>	<b>62 (30.54%)</b>	-	1.40±1.17 (141)	0.92±1.12 (62)	<b>0.005</b>
93L	23 (17.56%)		1.01±1.13 (108)	1.17±1.19 (23)	0.533

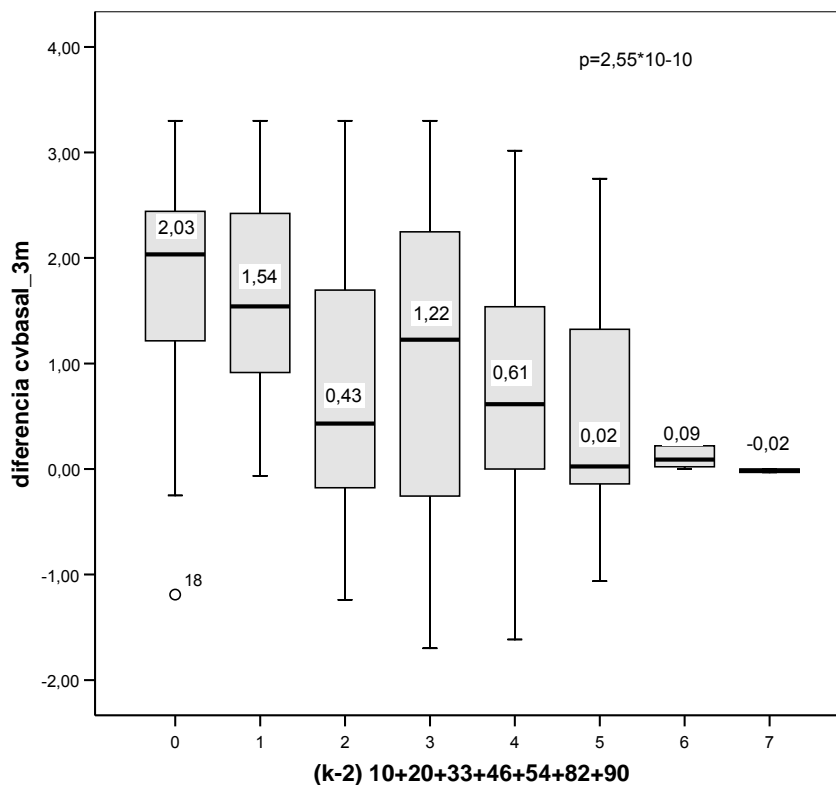
En primer lugar se llevó a cabo el desarrollo del score teniendo en cuenta las mutaciones con una prevalencia  $\geq 10\%$ . Mediante el test de Jonkheere-Terpstra se estudió el efecto sobre la respuesta virológica de distintas agrupaciones de las mutaciones seleccionadas previamente. Al tener en cuenta las mutaciones con efecto **negativo** se obtuvieron los resultados que se muestran en la tabla 4.31.

**Tabla 4.31. Influencia de distintas combinaciones de mutaciones (10%) con efecto negativo sobre la respuesta virológica a FOSAMPRENAVIR/RITONAVIR (método removing)**

		<b>Combinación mutaciones</b>	<b>p (J.Terpstra)</b>
<b>(k)</b>		10+20+33+36+46+54+71+82+90	$7,06 \cdot 10^{-9}$
<b>(k-1)</b>	(-90)	10+20+33+36+46+54+71+82	$1,27 \cdot 10^{-8}$
	(-82)	10+20+33+36+46+54+71+90	$3,11 \cdot 10^{-8}$
	(-71)	10+20+33+36+46+54+82+90	$5,27 \cdot 10^{-9}$
	(-54)	10+20+33+36+46+71+82+90	$9,04 \cdot 10^{-9}$
	(-46)	10+20+33+36+54+71+82+90	$1,16 \cdot 10^{-8}$
	(-36)	10+20+33+46+54+71+82+90	$8,86 \cdot 10^{-10}$
	(-33)	10+20+36+46+54+71+82+90	$1,83 \cdot 10^{-8}$
	(-20)	10+33+36+46+54+71+82+90	$9,72 \cdot 10^{-9}$
	(-10)	20+33+36+46+54+71+82+90	$7,37 \cdot 10^{-8}$
<b>(k-2)</b>	(-90)	10+20+33+46+54+71+82	$1,08 \cdot 10^{-9}$
	(-82)	10+20+33+46+54+71+90	$3,39 \cdot 10^{-9}$
	(-71)	10+20+33+46+54+82+90	$2,55 \cdot 10^{-10}$
	(-54)	10+20+33+46+71+82+90	$1,15 \cdot 10^{-9}$
	(-46)	10+20+33+54+71+82+90	$1,27 \cdot 10^{-9}$
	(-33)	10+20+46+54+71+82+90	$2,42 \cdot 10^{-9}$
	(-20)	10+33+46+54+71+82+90	$2,44 \cdot 10^{-9}$
	(-10)	20+33+46+54+71+82+90	$1,41 \cdot 10^{-8}$
<b>(k-3)</b>	(-90)	10+20+33+46+54+82	$1,57 \cdot 10^{-10}$
	(-82)	10+20+33+46+54+90	$9,56 \cdot 10^{-10}$
	(-54)	10+20+33+46+82+90	$2,07 \cdot 10^{-10}$
	(-46)	10+20+33+54+82+90	$3,52 \cdot 10^{-10}$
	(-33)	10+20+46+54+82+90	$7,55 \cdot 10^{-10}$
	(-20)	10+33+46+54+82+90	$6,22 \cdot 10^{-10}$
	(-10)	20+33+46+54+82+90	$1,50 \cdot 10^{-9}$

La influencia de este score sobre la respuesta virológica se muestra gráficamente en la figura 4.13. A partir de un valor **5** del score se pierde la eficacia virológica.

**Figura 4.13. Respuesta virológica a FOSAMPRENAVIR/RITONAVIR según nº de mutaciones (10%)**



A las mutaciones seleccionadas previamente al considerar la prevalencia del 10%, se añadirían cuatro mutaciones más, cuya prevalencia fue **>5%**: 24, 53, 73 y 84.

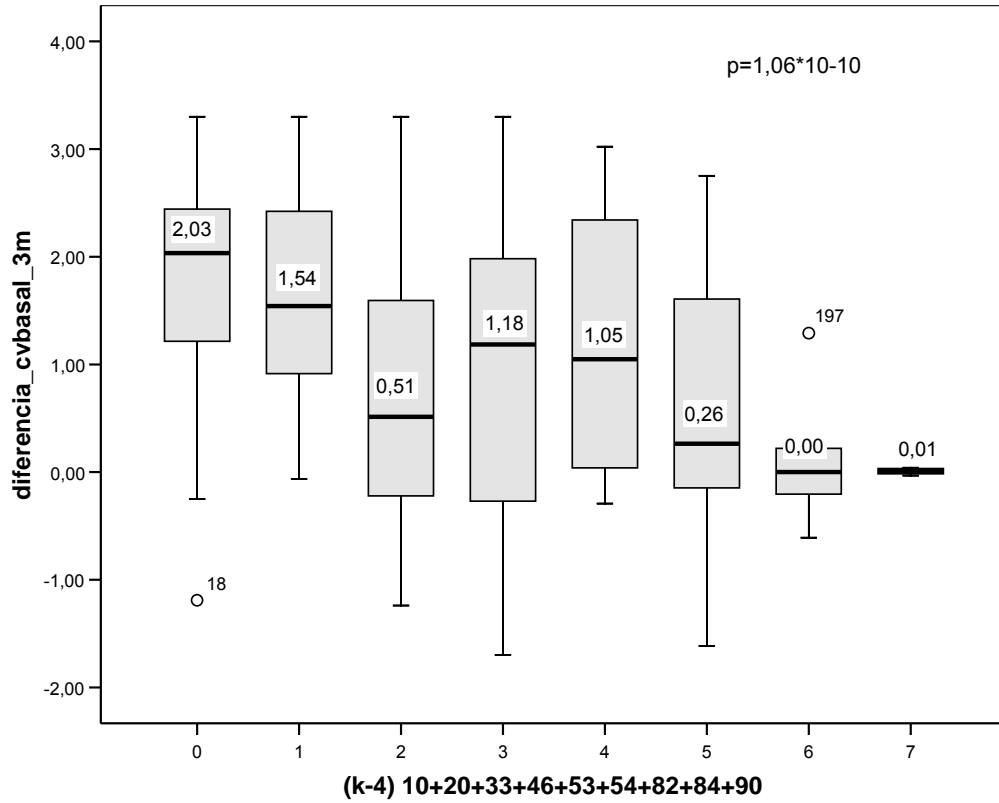
Partimos, de la combinación 10+20+24+33+36+46+53+54+71+73+82+84+90. Mediante el test de Jonkheere-Terpstra se estudió el efecto sobre la respuesta virológica, como se aprecia en la tabla 4.32.

**Tabla 4.32. Influencia de distintas combinaciones de mutaciones (5%) con efecto negativo sobre la respuesta virológica a FOSAMPRENAVIR/RITONAVIR (método *removing*)**

		Combinación mutaciones	p (J.Terpstra)
(k)		10+20+24+33+36+46+53+54+71+73+82+84+90	$1,01 \cdot 10^{-8}$
(k-1)	(-36)	10+20+24+33+46+53+54+71+73+82+84+90	$1,21 \cdot 10^{-9}$
(k-2)	(-71)	10+20+24+33+46+53+54+73+82+84+90	$5,82 \cdot 10^{-10}$
(k-3)	(-73)	10+20+24+33+46+53+54+82+84+90	$2,55 \cdot 10^{-10}$
(k-4)	(-24)	10+20+33+46+53+54+82+84+90	$1,06 \cdot 10^{-10}$
(k-5)	(-90)	10+20+33+46+53+54+82+84	$6,66 \cdot 10^{-11}$

Por último, se vio la influencia del score sobre la respuesta virológica, según la variación en la carga viral en función del número de mutaciones de dicho score que presentasen los pacientes. Este efecto se muestra gráficamente en la figura 4.14. A partir de un valor 5 del score se pierde la eficacia virológica.

**Figura 4.14. Respuesta virológica a FOSAMPRENAVIR/RITONAVIR a los 3 meses según nº de mutaciones (5%)**





#### 4.1.10. Análisis multivariante

En el análisis **multivariante** realizado para cada fármaco incluimos junto con el *score* seleccionado, aquellas variables que también pudiesen explicar de algún modo la variable respuesta ( $\Delta CV$ ).

En primer lugar, realizamos subanálisis multivariantes para seleccionar, de cada grupo de variables relacionadas, aquella con un efecto más significativo sobre la variable dependiente respuesta, la diferencia en los niveles de carga viral. Se llevó a cabo para variables referidas todas ellas a los fármacos en el nuevo tratamiento (número de fármacos nuevos, número de fármacos en el nuevo tratamiento, ITIANs en el nuevo tratamiento, ITINANs en el nuevo tratamiento, número de clases nuevas y número de clases en el nuevo tratamiento); igualmente para variables relacionadas todas ellas con mutaciones en la transcriptasa inversa (número de mutaciones en la RT, mutaciones a ITIANs, NAMs, TAMs y mutaciones a ITINANs).

Variables introducidas	Método
número de fármacos en el nuevo tto, número de fármacos nuevos, número de familias en el nuevo tto, número de clases nuevas, nº de nrti en el nuevo tto ips en el nuevo tto, nrtis en el nuevo tto,	Introducir

	Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados	t	Sig.
	B	Error típ.	Beta		
número de fármacos en el nuevo tto	-,606	,431	-,198	-1,406	,162
número de fármacos nuevos	,446	,145	,294	3,067	,003
número de familias en el nuevo tto	,101	,222	,051	,457	,649
número de clases nuevas	,043	,190	,025	,227	,821
nº de nrti en el nuevo tto	,200	,408	,081	,490	,625
nrtis en el nuevo tto	,101	,435	,032	,233	,816
ips en el nuevo tto	,519	,461	,177	1,126	,262

Variables introducidas	Método
mutNNRT, Número de TAMs, mut analogos, Número de NAMs, mutRT	Introducir

	Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados	t	Sig.
	B	Error típ.	Beta		
mutRT	,149	,217	,256	,688	,492
mut analogos	-,007	,209	-,010	-,033	,974
Número de NAMs	-,421	,204	-,546	-2,070	,040
Número de TAMs	,162	,205	,167	,791	,430
mutNNRT	-,292	,235	-,238	-1,244	,216

A continuación, realizamos, para cada fármaco, el análisis multivariante incluyendo todas las posibles variables: *score*, edad, sexo, adherencia, CD4 basales, log cv basal, la presencia o no en el tratamiento actual de cada fármaco (ABC, ddl, d4T, LPVr o FPVr) y las variables seleccionadas en cada caso en el subanálisis anterior. En todos los casos la variable dependiente fue la diferencia en los niveles de carga viral. Es decir, tratamos de ver, de la totalidad de factores, cuáles eran realmente predictores de respuesta.

Aunque inicialmente se incluyeron todas las variables en el análisis, finalmente se eliminaron algunas de éstas, indirectamente recogidas por la variable *score*. De esta manera, se analizaron únicamente aquellas no relacionadas con el *score*: edad, sexo, adherencia, número de fracasos, número de fármacos nuevos o CD4 basales.

A continuación se muestran los resultados del análisis multivariante final realizado para tenofovir a los tres meses como ejemplo de los pasos que sigue el programa estadístico para analizar el valor predictivo del *score* desarrollado en presencia de otras co-variables que pueden influir también en la variable respuesta.

El método introducir sigue los siguientes pasos:

**Método introducir:**

**Variable dependiente:** diferencia logcvbasal-logcv3m

Modelo	Variables introducidas	Método
1	Edad, sexo, adherencia, fracaso, número de fármacos nuevos, score k, CD4 basal	Introducir

Modelo	R	R cuadrado	R cuadrado corregida	Error típ. de la estimación
1	,451	,204	,100	1,02591

Modelo		Significación
1	edad	,295
	sexo	,078
	adherencia	,662
	fracaso	,564
	número de fármacos nuevos	,127
	score k	,035
	CD4 basal	,541

\*R cuadrado representa el porcentaje de respuesta que es capaz de explicar la variable o variables del modelo.

El método de pasos sucesivos se realiza siguiendo el siguiente esquema:

**Método de pasos sucesivos:**

**Variable dependiente:** diferencia logcvbasal-logcv3m

Modelo	Variables introducidas	Sig.
1	Score k	,052
2	Score k	,021
	Número de fármacos nuevos	,047
3	Score k	,026
	Número de fármacos nuevos	,025
	Sexo	,063

Modelo	R	R cuadrado	R cuadrado corregida	Error típ. de la estimación
1	,248	,062	,046	1,05657
2	,351	,123	,093	1,03008
3	,417	,174	,131	1,00820

En la tabla 4.33 se muestra el resumen de los análisis multivariantes realizados para los distintos fármacos. Se observa que todos los *scores* desarrollados permiten predecir la respuesta virológica, independientemente de otros factores que pueden influir en la misma ( $p < 0,05$ ). Los porcentajes de respuesta que son capaces de explicar oscilan entre 11,1 y 37,3%.

**Tabla 4.33. Predicción de respuesta de los *scores* desarrollados en el análisis multivariante**

Fármaco	p / $R^2$ score
TDF	0,035 / 0,204
ddl	0,051 / 0,126
D4T	0,004 / 0,373
LPVr	0,015 / 0,111
FPVr	0,000 / 0,196

## 4.2. Epidemiología del VIH en Andalucía Oriental

### 4.2.1. Prevalencia de subtipos no-B y CRFs

De los 1012 pacientes estudiados, el 91.9% estaba infectado por subtipos B y el 8.1% restante por subtipos no-B y formas recombinantes. Las formas recombinantes CRF02\_AG, CRF01\_AE y el subtipo G, fueron los subtipos no-B mayoritariamente encontrados, como se muestra en la figura 4.15, en la que aparece la distribución de subtipos no-B de nuestra población.

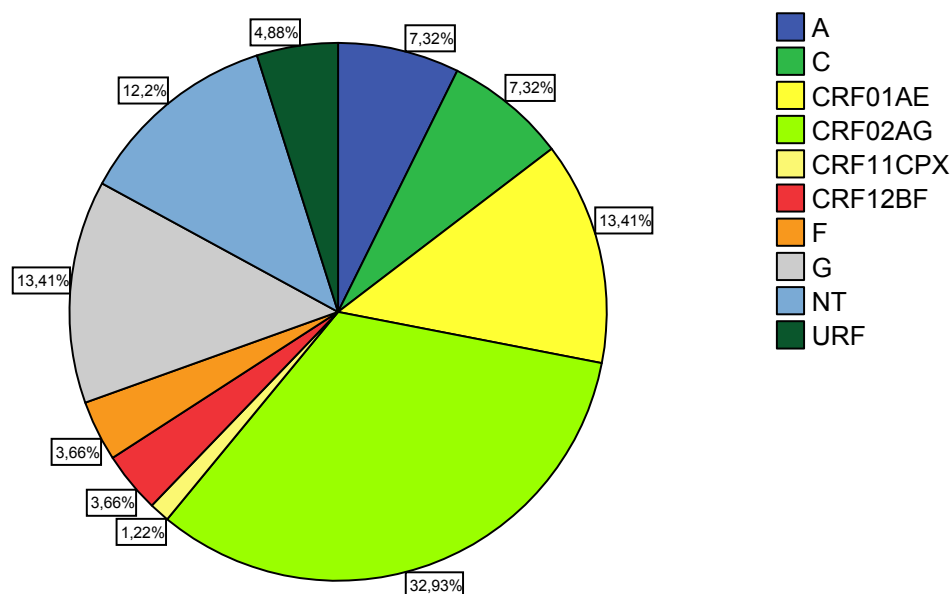


Figura 4.15. Distribución de subtipos no-B

La distribución interanual de subtipos B y no-B se muestra en la figura 4.16. Se aprecia que desde 2000 a 2004 se estudiaron de manera casi exclusiva subtipos B, mientras que en 1999, 2005 y 2006 se encontraron más casos de subtipos no-B.

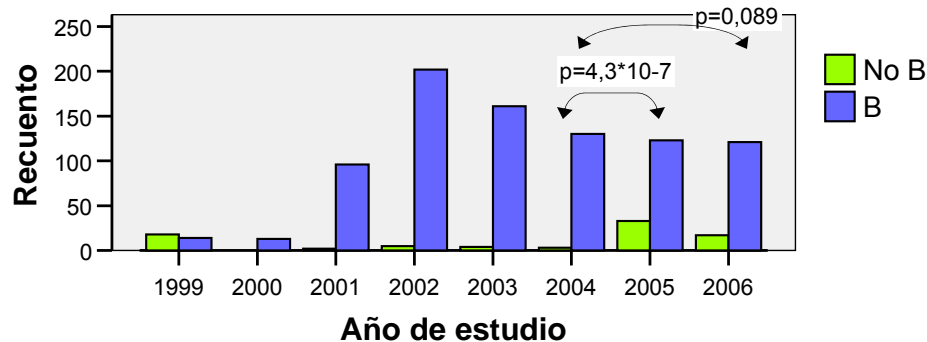


Figura 4.16. Distribución interanual de subtipos B y no-B

Los subtipos no-B encontrados entre 1999 y 2006 aparecen detallados en la figura 4.17. En ella se puede observar el alto número de cepas no tipables el primer año de estudio (1999), así como un número importante de pacientes infectados por subtipo A. Desde entonces, se observa la presencia de CRF02\_AG todos los años y cabe destacar un aumento del número de subtipos G a partir de 2005, así como de las formas recombinantes CRF01\_AE.

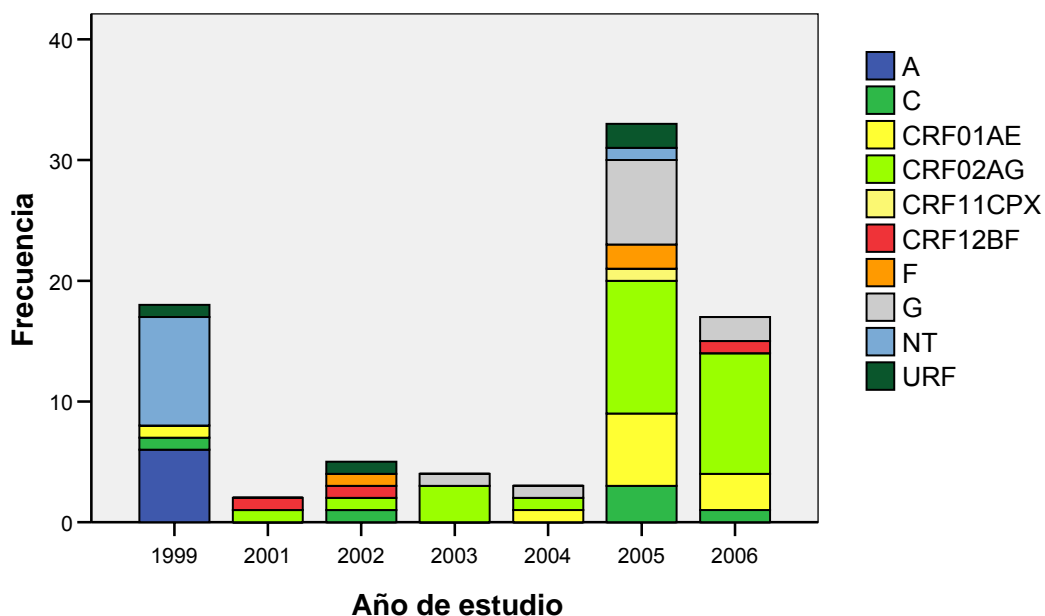


Figura 4.17. Subtipos no-B estudiados entre 1999 y 2006

## 4.2.2. Caracterización de la infección por subtipos no-B

### 4.2.2.1. Pacientes infectados por subtipos no-B

Al estudiar las características de la población infectada, analizamos en primer lugar su procedencia geográfica. Como muestra la figura 4.18, se observa un mayor número de pacientes extranjeros en los años 1999, 2005 y 2006, coincidiendo con la mayor distribución de subtipos no-B que se había destacado previamente en la figura 4.17. Al superponer estos datos, se observa por tanto la procedencia mayoritariamente no española de los subtipos no-B y, a la inversa, el mayor número de pacientes españoles infectados por subtipos B (figuras 4.18-4.20). La mayoría de los pacientes extranjeros estudiados provenían de la provincia de Almería, seguida de Granada y Jaén.

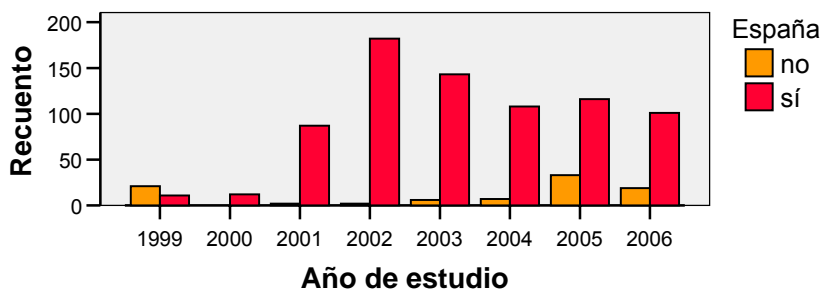


Figura 4.18. Distribución de pacientes españoles y extranjeros (1999-2006)

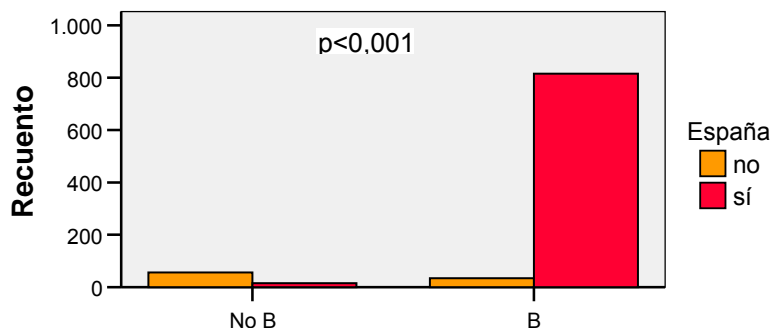


Figura 4.19. Distribución total de subtipos B y no-B en pacientes españoles y extranjeros (1999-2006)

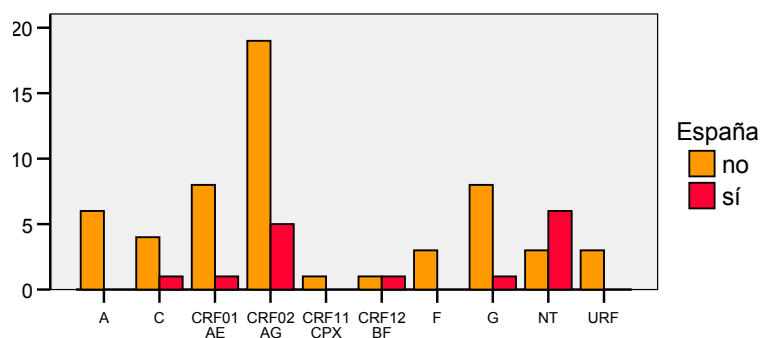


Figura 4.20. Distribución de subtipos no-B en pacientes españoles y extranjeros (1999-2006)

Al estudiar específicamente el país de origen, se observa que el 93,9% del total de pacientes estudiados, provienen de regiones occidentales (España, Europa Occidental y Norteamérica), siendo el resto procedentes de África, Europa del Este, Sudamérica y Centroamérica. Del total de pacientes infectados por subtipos no-B, el 31,7% eran españoles, mientras que el 68,3% restante procedían de países en vías de desarrollo.

La distribución por países de origen de los pacientes infectados por los diferentes subtipos se muestra en la tabla 4.34.

**Tabla 4.34. País de origen de los pacientes infectados por subtipos B y no-B**

Subtipo	España	No-España (número de casos)		Desconocido	Total
B	810	Francia(1), Holanda(1), Italia(1), Portugal(3), Reino Unido (1), EEUU(1)	Argentina(3), Brasil(1), Colombia(2), Chile(1), Rep.Dominicana(2), P.Rico(1) Guinea-E(1), Nigeria(1), Rusia(1)	92	923
A	0	-	Guinea-B(1), Mali(1), Senegal(2)	2	6
C	1	-	Rumania(2)	3	6
F	0	-	Rumania(1), Marruecos(1)	1	3
G	1	-	Guinea-B(2), Nigeria(4), Sierra- Leona(1)	3	11
CRF01_AE	1	-	Ghana(1), Guinea-B(1), Marruecos(1), Rusia(4)	3	11
CRF02_AG	5	-	Gambia(1), Ghana(3), Guinea-B(3), Mali(1), Nigeria(2), Senegal(4), Guinea-E (1), Ecuador(1)	8	29
CRF11_cpx	0	-	-	1	1
CRF12_BF	0	-	Argentina(1)	2	3
NT	6	-	Camerún(1), Gambia(1)	1	9
URF	5	-	Cuba(1)	4	10
Total no-B	19	0	41	28	88
Total	829	8	55	120	1012

Con respecto al factor de riesgo de infección por los distintos subtipos, en la figura 4.21 se observa que el modo de transmisión más frecuente de subtipos no-B en nuestra población es la vía heterosexual, seguida del uso de drogas por vía parenteral, factores igualmente característicos para subtipos B, aunque en este caso los UDVP son la principal fuente de transmisión.



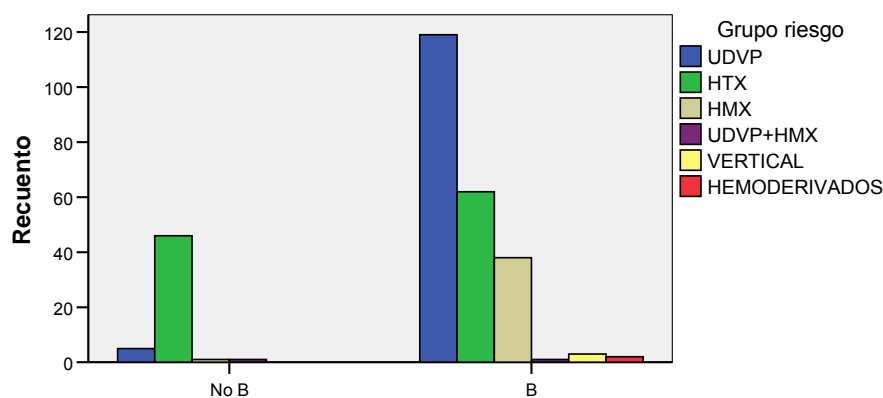


Figura 4.21. Relación de factores de riesgo con la infección por subtipos B y no-B

En la tabla 4.35 se indica la asociación de grupos de riesgo con la procedencia geográfica de los pacientes estudiados. En ella se podía observar que los pacientes africanos se infectan únicamente por vía heterosexual, mientras que en Occidente la infección se produce por distintas formas, especialmente la asociada al consumo de drogas por vía parenteral.

Tabla 4.35. Distribución de grupos de riesgo por regiones del mundo

	UDVP	HMX	HTX	VERTICAL	HEMO	UDVP+HMX	TOTAL
<b>África</b>	0 (0%)	0 (0%)	<b>28</b> <b>(100%)</b>	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	28 (100%)
<b>Sudamérica</b>	0 (0%)	2 (50%)	2 (50%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	4 (100%)
<b>Centroamérica</b>	0 (0%)	0 (0%)	1 (50%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (50,0%)	2 (100%)
<b>Europa Este</b>	0 (0%)	0 (0%)	3 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	3 (100%)
<b>Europa Occidental</b>	<b>123</b> <b>(53,5%)</b>	<b>37</b> <b>(16,1%)</b>	<b>64</b> <b>(27,8%)</b>	3 (1,3%)	2 (0,9%)	1 (0,4%)	230 (100%)
<b>Total</b>	123 <b>(46,1%)</b>	39 <b>(14,6%)</b>	98 <b>(36,7%)</b>	3 <b>(1,1%)</b>	2 <b>(0,7%)</b>	2 <b>(0,7%)</b>	267

#### 4.2.2.2. Polimorfismos en el gen de la proteasa de subtipos no-B

El estudio específico de los polimorfismos en el gen de la proteasa relacionados con subtipos no-B, se realizó comparando la prevalencia en los subtipos B y no-B de los distintos cambios en el gen de la proteasa considerados como mutaciones de resistencia a IPs por las actuales reglas de interpretación de resistencia genotípica de la ANRS.

Esta comparación se llevó a cabo considerando los datos de 1238 pacientes, de los cuales conocíamos el dato de tratamiento previo con IPs:

- 704 (56,9%) pacientes naïve para IPs, 65 (9,2%) infectados por subtipos no-B. De estos pacientes infectados por subtipos no-B el 58,3% eran de origen africano y el 20,9% eran españoles.
- 534 (43,1%) pacientes tratados con IPs, 12 (2,2%) infectados por subtipos no-B. De estos pacientes infectados por subtipos no-B, el 71,4% eran españoles y el 28,6% procedían de otros países.

##### 4.2.2.2.1. Mutaciones en el gen de la proteasa. Diferencias entre subtipos B y no-B

Globalmente las **mutaciones** encontradas con **mayor frecuencia** en pacientes **naïve**, no tratados previamente con IPs, infectados por subtipos B y no-B fueron, por orden decreciente de frecuencia, las siguientes:

- **B:** L63P (58,2%), I93L (26,6%), E35D (26,4%), I62V (26,1%), R41K (23,7%) y M36I (22,5%).
- **No-B:** M36I (96,9%), L89VMIT (89,2%), R41K (86,2%), H69K (75,5%), K20I (58,5%), I13V (55,4%), E35D (49,2%), L63P (24,6%), V82I (23,1%), G16E (23,1%), I93L (18,5%) y L10I/V (12,3%).

Para pacientes **tratados** previamente con algún IP, la frecuencia de mutaciones se muestra a continuación:

- **B:** L63P (71,9%), I62V (34,6%), I93L (33,1%), E35D (28,9%), M36I (26,6%), L90M (24,3%).
- **No-B:** M36I (100%), R41K (83,3%), H69K (83,3%), L89VMIT (66,7%), K20I (50%), E35D (50%).

Todos los pacientes naïve infectados por **subtipos no-B** presentaron al menos un polimorfismo en el gen de la proteasa. Se detectaron **3 polimorfismos** en el 98,5% de estos pacientes, **4** en el 95,5%, **5** en el 93,9% y **6** en el 89,4%. Hubo hasta cinco casos con **10 o más** polimorfismos. En las tablas 4.36 y 4.37 se recogen las diferencias encontradas en la prevalencia de mutaciones en el gen de la proteasa para los pacientes infectados por subtipos B y no-B estudiados. Se han agrupado por un lado los datos referentes a pacientes naïve y por otro los referentes a pacientes pretratados con algún IP.

**Tabla 4.36. Diferencias en la prevalencia de mutaciones en el gen de la proteasa entre subtipos B y no-B (pacientes NAÏVE)**

	10	10	10	10	13	13	16	20	20	20	20	20	24	30	32	33	33	33	35	35	36	36	36	41	43	45	46	46	47	47	48	50	50	53	54	54	54	54	58	
	I	F	V	R	L	V	E	M	R	I	V	T	I	N	I	F	I	V	D	G	A	I	L	K	R	R	I	L	V	A	V	V	L	L	V	L	M	T	E	
<b>No B (%)</b>	12	0	12	0	0	55	23	6,2	11	59	1,5	0	1,5	0	0	0	0	0	49	17	0	97	0	86	6,2	4,6	3,1	4,6	0	0	0	0	0	0	0	1,5	0	0	0	3,1
<b>B (%)</b>	9	0,3	2,8	0,9	0,9	7,7	4,1	0,8	3,9	0,8	0,5	0	1,3	5	0,6	1,4	0,9	1,9	26	0,3	0	23	0	24	3,6	1,9	4,1	1,7	0,3	0	0,3	0	0	0,6	3	0,2	0,3	0	1,1	
<b>p</b>	0,369	1,000	0,001	1,000	1,000	0,001	0,001	0,006	0,022	0,001	0,323	-	0,586	0,063	1,000	1,000	1,000	0,616	0,001	0,001	-	0,001	-	0,001	0,304	0,155	1,000	0,132	1,000	-	1,000	-	-	1,000	1,000	1,000	1,000	-	0,200	

	60	62	63	63	63	63	63	66	69	69	71	71	71	71	73	73	73	74	74	76	77	82	82	82	82	82	82	82	82	83	84	84	85	88	88	89	90	91	93
	E	V	P	I	N	C	S	T	F	Q	K	V	T	I	L	S	A	T	S	P	V	I	A	F	S	T	I	L	M	D	V	A	V	D	S	M	M	S	L
<b>No B (%)</b>	7,7	9,2	25	0	0	0	1,5	0	0	0	76	3,1	1,5	0	0	0	0	0	0	0	0	1,5	0	0	0	23	0	0	0	1,5	0	0	0	1,5	89	3,1	0	19	
<b>B (%)</b>	6,4	26	58	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,8	0	0,9	11	8,8	0,5	0	1,1	0,2	0,2	0	0,3	0,9	0	3,5	0,2	0,2	0,6	0,5	0	0	0	2,2	0	0,6	4,2	0,8	2,7	7,4	0	27
<b>p</b>	0,605	0,002	0,001	1,000	1,000	1,000	0,177	1,000	1,000	-	0,001	0,055	0,041	1,000	-	1,000	1,000	1,000	-	1,000	1,000	-	0,714	1,000	1,000	1,000	0,001	-	-	-	1,000	-	1,000	0,164	0,443	0,001	0,303	-	0,181

**Tabla 4.37. Diferencias en la prevalencia de mutaciones en el gen de la proteasa entre subtipos B y no-B (pacientes PRETRATADOS)**

	10	10	10	10	13	13	16	20	20	20	20	20	24	30	32	33	33	33	35	35	36	36	36	41	43	45	46	46	47	47	48	50	50	53	54	54	54	54	58
	I	F	V	R	L	V	E	M	R	I	V	T	I	N	I	F	I	V	D	G	A	I	L	K	R	R	I	L	V	A	V	V	L	L	V	L	M	T	E
<b>No B (%)</b>	0	0	17	0	17	33	0	8,3	17	50	0	0	0	0	8,3	8,3	0	0	50	8,3	0	100	0	83	33	0	8,3	17	0	8,3	0	0	0	0	8,3	8,3	17	0	0
<b>B (%)</b>	24	1,3	4	2,7	1	5,7	6,1	2,1	6,9	0,4	0,4	0,2	5,2	7,3	5	6,5	1,1	0,4	29	0	0	27	0,2	23	3,4	2,7	19	5,7	3,6	0	2,1	1,1	0,4	2,7	16	1,3	2,1	0,8	5,7
<b>p</b>	0,041	1,000	0,090	1,000	0,009	0,005	1,000	0,241	0,207	0,001	1,000	1,000	1,000	1,000	0,466	0,560	1,000	1,000	0,120	0,022	-	0,001	1,000	0,001	0,001	1,000	0,705	0,157	1,000	0,022	1,000	1,000	1,000	1,000	0,702	0,167	0,031	1,000	1,000

	60	62	63	63	63	63	63	66	69	69	71	71	71	71	73	73	73	74	74	76	77	82	82	82	82	82	82	82	82	83	84	84	85	88	88	89	90	91	93
	E	V	P	I	N	C	S	T	F	Q	K	V	T	I	L	S	A	T	S	P	V	I	A	F	S	T	I	L	M	D	V	A	V	D	S	M	M	S	L
<b>No B (%)</b>	0	8,3	42	0	0	0	0	0	17	0	83	17	0	0	0	0	0	0	0	17	0	8,3	0	0	0	25	0	0	0	17	0	0	0	0	0	67	0	0	17
<b>B (%)</b>	9	35	72	0	0	0,2	0,2	0,2	2,5	0,4	1,3	21	12	1,5	0,2	5,4	0,4	0,4	0,4	1,9	1,9	0,6	15	1,1	3,6	1,3	0,6	0	0	0,2	10	0	1,7	5,6	0,4	4,2	24	0,8	33
<b>p</b>	0,612	0,067	0,046	-	-	1,000	1,000	1,000	0,041	1,000	0,001	1,000	0,377	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,027	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,001	-	-	1,000	0,355	-	1,000	1,000	1,000	0,001	0,050	1,000	0,353	

En la tabla 4.36 al comparar el gen de la proteasa entre subtipos B y no-B, se puede comprobar la mayor prevalencia de los cambios **L10V**, **G16E**, **K20M** y **K20R** en **subtipos no-B naïve** a IPs. Los cambios **I13V**, **K20I**, **E35D**, **M36I**, **H69K** y **L89M** fueron significativamente más prevalentes en **subtipos no-B** tanto en pacientes **naïve** como en **pretratados**. En la tabla 4.37 se observa que los cambios **K43T**, **I47A**, **I54M**, **L76V** aparecían con una prevalencia significativamente mayor en pacientes infectados por **subtipos no-B pretratados**.

#### 4.2.2.2. Efecto de los polimorfismos de subtipos no-B en las reglas de interpretación de resistencia

A continuación se muestran las reglas o *scores* de interpretación de resistencia de la ANRS para cada IP estudiado, definidas éstas en base al subtipo B, así como las tablas que contienen nuestros resultados obtenidos. Se resaltan en ellas los cambios para los que se encontró una diferencia estadísticamente significativa en la prevalencia entre subtipos B y no-B. Se recogieron estas diferencias para los pacientes naïve a IPs.

##### Regla de interpretación genotípica de resistencia a SAQUINAVIR/RITONAVIR (ANRS, 2006)

- Saquinavir/ritonavir resistencia:
- G48V
  - $\geq 4$  mutaciones entre: L10F//M/R/V, I15A/V, K20I/M/R/T, L24I, I62V, G73S/T, V82A/F/S/T, I84V, L90M
- Saquinavir/ritonavir posible resistencia:
- $\geq 3$  mutaciones entre: L10F//M/R/V, I15A/V, K20I/M/R/T, L24I, I62V, G73S/T, V82A/F/S/T, I84V, L90M

Tabla 4.38. Prevalencia de polimorfismos en el gen de la proteasa que afectan a SAQUINAVIR/RITONAVIR en pacientes naïve para IPs

Naïve IP	10	10	10	10	15	20	20	20	20	24	48	62	73	73	82	82	82	82	84	90
	I	F	V	R	A/V	M	R	I	T	I	V	V	S	T	A	F	S	T	V	M
<b>No B (%)</b>	12,3	0	12,3	0	-	6,2	10,8	58,5	0	1,5	0	9,2	0	0	1,5	0	0	0	1,5	3,1
<b>B (%)</b>	9	0,3	2,8	0,9	-	0,8	3,9	0,8	0	1,3	0,3	26,1	1,1	0,2	3,5	0,2	0,2	0,6	2,2	7,4
<b>p</b>	0,369	1,000	0,001	1,000	-	0,006	0,022	0,001	-	0,586	1,000	0,002	1,000	1,000	0,714	1,000	1,000	1,000	1,000	0,303

Se observa una prevalencia significativamente mayor en subtipos no-B de los cambios L10V, K20M, K20R y K20I en pacientes naïve para IPs. El 78,8% de estos subtipos no-B presentaba alguna de estas cuatro mutaciones de manera natural y, por tanto, en estos casos al aplicar la regla de interpretación, el número de mutaciones del *score* requeridas para desarrollar resistencia o posible resistencia a SQVr sería de 3 y 2 mutaciones, respectivamente. El 9,1% de estos pacientes presentaban simultáneamente dos de estos polimorfismos y su *score* sería 2 y 1 mutación, para resistencia y posible resistencia, respectivamente. Debido a la presencia de estos polimorfismos disminuiría, por tanto, la barrera genética de resistencia.

**Regla de interpretación genotípica de resistencia a FOSAMPRENAVIR/RITONAVIR (ANRS, 2006)**

Fosamprenavir/ritonavir resistencia:

- I50L
- V32I y I47A/V
- $\geq 6$  entre: L10F/I/V, L33F, M36I, I54A/L/M/S/T/V, I62V, V82A/C/F/G, I84V, L90M

**Tabla 4.39. Prevalencia de polimorfismos en el gen de la proteasa que afectan a FOSAMPRENAVIR/RITONAVIR en pacientes naïve para IPs**

Naïve IP	10	10	10	32	33	36	47	47	50	54	54	54	54	62	82	82	84	90
	I	F	V	I	F	I	V	A	V	V	L	M	T	V	A	F	V	M
<b>No B (%)</b>	12,3	0	12,3	0	0	96,9	0	0	0	1,5	0	0	0	9,2	1,5	0	1,5	3,1
<b>B (%)</b>	9	0,3	2,8	0,6	1,4	22,5	0,3	0	0	3	0,2	0,3	0	26,1	3,5	0,2	2,2	7,4
<b>p</b>	0,369	1,000	0,001	1,000	1,000	0,001	1,000	-	-	1,000	1,000	1,000	-	0,002	0,714	1,000	1,000	0,303

En nuestra serie, el 97,0% de los pacientes naïve para IPs infectados con subtipos no-B presentaron la mutación L10V o M36I y por tanto, tendrían su score de resistencia de FPVr reducido a 5 mutaciones. Por otro lado el 12,1% de estos pacientes presentaban ambas mutaciones, siendo su score de resistencia 4 mutaciones.

**Regla de interpretación genotípica de resistencia a LOPINAVIR/RITONAVIR (ANRS, 2006)**

Lopinavir/ritonavir resistencia:

- I47A
- $\geq 8$  entre: L10F/I/R/V, K20M/R, L24I, L33F, M46I/L, I50V, F53L, I54M/L/T/V, L63P, A71I/L/V/T, V82A/F/S/T, I84V, L90M

Lopinavir/ritonavir posible resistencia:

- **6-7** entre: L10F/I/R/V, K20M/R, L24I, L33F, M46I/L, I50V, F53L, I54M/L/T/V, L63P, A71I/L/V/T, V82A/F/S/T, I84V, L90M

**Tabla 4.40. Prevalencia de polimorfismos en el gen de la proteasa que afectan a LOPINAVIR/RITONAVIR en pacientes naïve para IPs**

Naïve IP	10	10	10	20	20	24	33	46	46	47	50	53	54	54	63	71	71	71	82	84	90
	I	V	F/R	M	R	I	F	I	L	A	V	L	V/L/T	M	P	V	T	I/L	A/F/S/T	V	M
<b>No B (%)</b>	12,3	12,3	0	6,2	10,8	1,5	0	3,1	4,6	0	0	0	0-1,5	0	24,6	3,1	1,5	0	0-1,5	1,5	3,1
<b>B (%)</b>	9	2,8	0,3-0,9	0,8	3,9	1,3	1,4	4,1	1,7	0	0	0,6	0,2-3	0,3	58,2	10,5	8,8	0-0,5	0,2-3,5	2,2	7,4
<b>p</b>	0,369	0,001	1,000	0,006	0,022	0,586	1,000	1,000	0,132	-	-	1,000	1,000	1,000	0,001	0,055	0,041	1,000	0,714	1,000	0,303

En nuestra serie, el 27,3% de los pacientes naïve para IPs infectados con subtipos no-B presentaron la mutación L10V, K20M o K20R y por tanto, tendrían su score de resistencia de LPVr reducido a 7 mutaciones. Por otro lado el 1,5% de los pacientes presentaban las mutaciones L10V y K20R, siendo su score de 6 mutaciones.

**Regla de interpretación genotípica de resistencia a ATAZANAVIR/RITONAVIR (ANRS, 2006)**

Atazanavir/ritonavir resistencia:

- I50L
- $\geq 3$  entre: L10F/I/V, G16E, L33F/I/V, M46I/L, D60E, I84V, I85V, L90M

**Tabla 4.41. Prevalencia de polimorfismos en el gen de la proteasa que afectan a ATAZANAVIR/RITONAVIR en pacientes naïve para IPs**

Naïve IP	10	10	10	16	33	33	33	46	46	50	60	84	85	90
	I	F	V	E	F	I	V	I	L	L	E	V	V	M
<b>No B (%)</b>	12,3	0	12,3	23	0	0	0	3,1	4,6	0	7,7	1,5	0	3,1
<b>B (%)</b>	9	0,3	2,8	4,1	1,4	0,9	1,9	4,1	1,7	0	6,4	2,2	0,6	7,4
<b>p</b>	0,369	1,000	0,001	0,001	1,000	1,000	0,616	1,000	0,132	-	0,605	1,000	1,000	0,303

El 28,8% de los pacientes naïve infectados por subtipos no-B presentaron la mutación L10V o G16E y así, tendrían su *score* reducido a 2 mutaciones. Ambas mutaciones estaban presentes en el 6,1% de pacientes, que, por ello, tendrían su *score* reducido a 1 mutación.

**Regla de interpretación genotípica de resistencia a TIPRANAVIR/RITONAVIR (ANRS, 2006)**

Tipranavir/ritonavir resistencia:

- $\geq 8$  entre: L10V, I13V, K20M/R/V, L33F, E35G, M36I, K43T, M46L, I47V, I54A/M/V, Q58E, H69K, T74P, V82L/T, N83D, I84V

Tipranavir/ritonavir posible resistencia:

- 4-7 entre: L10V, I13V, K20M/R/V, L33F, E35G, M36I, K43T, M46L, I47V, I54A/M/V, Q58E, H69K, T74P, V82L/T, N83D, I84V

**Tabla 4.42. Prevalencia de polimorfismos en el gen de la proteasa que afectan a TIPRANAVIR/RITONAVIR en pacientes naïve para IPs**

Naïve IP	10	13	20	20	20	33	35	36	43	46	47	54	54	58	69	74	82	82	83	84
	V	V	M	R	V	F	G	I	T	L	V	V	M	E	K	P	T	L	D	V
<b>No B (%)</b>	12	55	6,2	11	1,5	0	17	97	6,2	4,6	0	1,5	0	3,1	76	0	0	0	0	1,5
<b>B (%)</b>	2,8	7,7	0,8	3,9	0,5	1,4	0,3	22,5	3,6	1,7	0,3	3	0,3	1,1	0,9	0,3	0,6	0	0	2,2
<b>p</b>	0,001	0,001	0,006	0,022	0,323	1,000	0,001	0,001	0,304	0,132	1,000	1,000	1,000	0,200	0,001	1,000	1,000	-	-	1,000

En nuestra serie, el 98,5% de los pacientes naïve para IPs infectados con subtipos no-B presentaron de manera natural alguna de las mutaciones L10V, I13V, K20M, K20R, E35G, M36I o H69K y por tanto, el *score* de resistencia de TPVr sería de 7 mutaciones; el 95,5% presentaba dos de dichas mutaciones simultáneamente, siendo su *score* de 6; el 65,2% presentaba 3 de dichas mutaciones, siendo su *score* de 5 mutaciones y, por último, el 21,2% de los pacientes presentaban hasta cuatro de dichas mutaciones, por lo que mostrarían posible resistencia a tipranavir de manera natural y su *score* de resistencia sería de 4 mutaciones. No hubo ningún paciente que presentara simultáneamente más de cuatro de esos polimorfismos.

**Regla de interpretación genotípica de resistencia a DARUNAVIR/RITONAVIR (ANRS, 2006)**

Darunavir/ritonavir resistencia:

- $\geq 4$  entre: V11I, V32I, L33F, I47V, I50V, I54L/M, G73S, L76V, I84V, L89V

Darunavir/ritonavir posible resistencia:

- 3 entre: V11I, V32I, L33F, I47V, I50V, I54L/M, G73S, L76V, I84V, L89V

**Tabla 4.43. Prevalencia de polimorfismos en el gen de la proteasa que afectan a DARUNAVIR/RITONAVIR en pacientes naïve para IPs**

	11	32	33	47	50	54	54	73	76	84	89
Naïve IP											
	I	I	F	V	V	L	M	S	V	V	V
No B (%)	-	0	0	0	0	0	0	0	0	1,5	1,5
B (%)	-	0,6	1,4	0,3	0	0,2	0,3	1,1	0,9	2,2	2,7
p	-	1,000	1,000	1,000	-	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,657

En nuestra serie, no hubo ninguna mutación del score de darunavir que presentase una prevalencia significativamente mayor en subtipos no-B frente a B.

**Regla de interpretación genotípica de resistencia a INDINAVIR (ANRS, 2006)**

Indinavir resistencia:

- M46I/L
- V82A/F/M/S/T
- I84A/V
- L90M y  $\geq 2$  mutaciones entre: K20M/R, L24I, V32I, M36I, I54V/L/M/T, A71V/T, G73S/A, V77I

Indinavir posible resistencia:

- L90M

**Tabla 4.44. Prevalencia de polimorfismos en el gen de la proteasa que afectan a INDINAVIR en pacientes naïve para IPs**

	20	20	24	32	36	46	54	54	54	71	71	73	73	82	82	82	82	84	90
Naïve IP																			
	M	R	I	I	I	I	V	L	M	V	T	S	A	A	F	S	T	V	M
No B (%)	6,2	10,8	1,5	0	96,9	3,1	1,5	0	0	3,1	1,5	0	0	1,5	0	0	0	1,5	3,1
B (%)	0,8	3,9	1,3	0,6	22,5	4,1	3	0,2	0,3	10,5	8,8	1,1	0,2	3,5	0,2	0,2	0,6	2,2	7,4
p	0,006	0,022	0,586	1,000	0,001	1,000	1,000	1,000	1,000	0,055	0,041	1,000	1,000	0,714	1,000	1,000	1,000	1,000	0,303

En nuestra serie, el 97% de los pacientes naïve para IPs infectados con subtipos no-B presentaron alguna de las mutaciones K20M, K20R o M36I y, por tanto, requerirían 1 mutación, además de la L90M para desarrollar resistencia a IDV. El 16,7% presentaban dos de esos cambios y, únicamente requerían la presencia de la L90M para mostrar resistencia a este fármaco.

**Regla de interpretación genotípica de resistencia a NELFINAVIR (ANRS, 2006)**

Nelfinavir resistencia:

- D30N
- I84A/V
- N88S/D
- L90M

Nelfinavir posible resistencia:

- V82A/F/S/T y  $\geq 2$  mutaciones entre: L10I, M36I, M46I/L, I54V/L/M/T, A71V/T, V77I

**Tabla 4.45. Prevalencia de polimorfismos en el gen de la proteasa que afectan a NELFINAVIR en pacientes naïve para IPs**

	10	30	36	46	46	54	54	54	54	71	71	77	82	82	82	82	84	84	88	88	90
Naïve IP	I	N	I	I	L	V	L	M	T	V	T	I	A	F	S	T	V	A	D	S	M
<b>No B (%)</b>	12	0	97	3,1	4,6	1,5	0	0	0	3,1	1,5	0	1,5	0	0	0	1,5	0	0	1,5	3,1
<b>B (%)</b>	9	5	23	4,1	1,7	3	0,2	0,3	0	11	8,8	0	3,5	0,2	0,2	0,6	2,2	0	4,2	0,8	7,4
<b>p</b>	0,369	0,063	0,001	1,000	0,132	1,000	1,000	1,000	-	0,055	0,041	-	0,714	1,000	1,000	1,000	1,000	-	0,164	0,443	0,303

Como se observa en la tabla 4.45, la mutación M36I estaba presente en el 96,9% de los pacientes naïve para IPs infectados con subtipos no-B, por lo que sólo requerían acumular 1 mutación, además de la V82A/F/S/T, para desarrollar posible resistencia a nelfinavir.

Finalmente, al aplicar en nuestra población los algoritmos de interpretación de la ANRS 2006 con el fin de estudiar la presencia de **resistencia a IPs** se obtuvieron los datos que se muestran en la tabla 4.46 para pacientes naïve a IPs.

**Tabla 4.46. Resistencia a IPs de pacientes naïve a IPs, infectados por subtipos B y no-B**

		SQVr		FOSr	LPVr		ATZr	TPVr		DRVr	
		R	AD	R	R	AD	R	R	AD	R	AD
704 Naïve IP	66 No-B	1 (1,5)	3 (4,5)	-	-	1 (1,5)	5 (7,6)	-	18 (27,3)	-	-
	638 B	10 (1,5)	22 (3,5)	6	6	10 (1,6)	21 (3,2)	-	7 (1,1)	4	-

**R: resistencia; AD: actividad disminuida**

Si la interpretación se llevase a cabo con los scores desarrollados por la ANRS, en los pacientes naïve a IPs infectados por subtipos no-B la actividad de estos fármacos en general sería menor que en los pacientes infectados por subtipo B. Cabe destacar una clara diferencia entre los subtipos en la actividad de tipranavir/ritonavir (27,3% de los pacientes infectados por subtipos no-B naïve a IPs mostraban posible resistencia a este fármaco, frente al 1,1% para subtipo B).



#### 4.2.2.2.3. Estudio de polimorfismos en los distintos subtipos no-B

Al relacionar los polimorfismos encontrados en subtipos no-B naïve a IPs con cada subtipo específico obtuvimos los resultados que se muestran en la tabla 4.48.

Tabla 4.48. Prevalencia de polimorfismos en distintos subtipos estudiados (%)

	I13V	K20I	E35D	M36I	R41K	L63P	H69K	V82I	L89M
<b>C</b>	0	0	50	<b>100</b>	50	0	100	0	<b>100</b>
<b>F</b>	0	0	100	<b>100</b>	100	33,3	0	0	<b>100</b>
<b>G</b>	81,8	<b>90,9</b>	27,3	<b>81,8</b>	100	45,5	81,8	<b>81,8</b>	<b>90,9</b>
<b>CRF02_AG</b>	66,7	<b>92,6</b>	29,6	<b>100</b>	88,9	25,9	92,6	11,1	<b>92,6</b>
<b>CRF01_AE</b>	63,6	9,1	72,7	<b>100</b>	90,9	9,1	90,9	9,1	<b>90,9</b>

Se observa que el polimorfismo K20I es específico del subtipo G y el CRF02\_AG. Por otro lado, cabe destacar la mutación M36I, que aparece prácticamente en todos los subtipos no-B, incluidas las variantes CRF11\_cpx, CRF12\_BF e incluso en los URFs encontrados, que por ser menos numerosos no se muestran en la tabla. El polimorfismo H69K aparece en todos los subtipos no-B, excepto en F. El cambio V82I está altamente relacionado con el subtipo G, que lo presenta en un 81,8% de los casos. Por último, la mutación L89M está presente en la mayoría de los subtipos no-B. El polimorfismo L63P apenas aparece en los subtipos no-B en general, siendo, como ya se indicó anteriormente, característico de subtipo B.

## **5. DISCUSIÓN**



### 5.1. Interpretación de la resistencia de VIH basada en respuesta clínica

La utilización de tests de resistencia y su correcta interpretación es una herramienta muy útil para el manejo terapéutico de los pacientes infectados por VIH ya que, en función de los resultados obtenidos, se determina qué fármacos en el nuevo régimen dejan de ser activos y cuáles mantienen actividad.

Para interpretar correctamente un ensayo de resistencia debemos conocer la correlación existente entre un determinado patrón de mutaciones (en el caso de un ensayo genotípico) o un determinado *fold change* (si el ensayo es fenotípico) con la respuesta virológica. Esto es, emplear **algoritmos de interpretación o reglas basadas en la eficacia virológica**, en el caso de ensayos genotípicos, y puntos de corte clínicos en los ensayos fenotípicos. Se consigue así definir la resistencia en términos clínicos, facilitando al médico que atiende al paciente VIH la toma de decisiones terapéuticas.

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

Si se consideran los **niveles plasmáticos de ARN como medida de respuesta**, existen tres formas diferentes para definir esta variable: a) reducción de los niveles de ARN desde el momento basal en el que se comienza un nuevo tratamiento hasta un tiempo de seguimiento determinado (Cabrera *et al.*, 2004; Vandamme *et al.*, 2004); b) porcentaje de pacientes que alcanzan en un tiempo determinado unos niveles de ARN por debajo del límite de cuantificación de la técnica empleada (Kempf *et al.*, 2002); c) tiempo en llegar a fracaso virológico definido como la primera determinación de dos medidas consecutivas de carga viral que está por encima de un valor límite predefinido (normalmente el límite de cuantificación) (Joly *et al.*, 2002).

En nuestro trabajo consideramos la reducción de los niveles de ARN en un tiempo definido para medir la respuesta de los pacientes. Esta medida se suele utilizar cuando no se espera alcanzar el límite de detección del ensayo como, por ejemplo, en pacientes altamente pretratados (que sería nuestro caso), en estudios en los que la medida de carga viral de seguimiento se realiza poco después de iniciar el nuevo régimen terapéutico o en

estudios pediátricos (Brun-Vezinet *et al.*, 2004). Es una medida continua de respuesta, útil para obtener información completa acerca del éxito o fracaso terapéutico.

Una dificultad que surge al usar *endpoints* basados en la reducción de niveles de ARN, es proporcionar estimaciones fiables de la magnitud de la reducción debido a que las medidas de ARN están sesgadas por los límites de cuantificación del ensayo utilizado. Por debajo del límite inferior de detección los niveles exactos de ARN se desconocen, lo que lleva a una observación incompleta de la reducción de ARN o reducción censurada (Flandre *et al.*, 2002). Este problema lo observamos en nuestro trabajo debido a la presencia de un porcentaje de pacientes que alcanzan una carga viral indetectable: 37,9% de los pacientes a los tres meses y 42,4% a los seis meses.

No obstante, los **datos censurados** no son despreciables, aportan mucha información y para su análisis se han desarrollado distintos métodos. Uno es el *crude method* que consiste en definir todos los niveles de ARN inferiores al límite de cuantificación como iguales a dicho límite. Nosotros usamos este método para corregir datos censurados en aquellos casos en los que la respuesta viral alcanzaba el límite inferior de detección. Consideramos el valor 50 como valor de indetectabilidad en todos los casos.

El problema de esta simplificación es que puede infravalorar la reducción de ARN, al considerar que el paciente llega a ese límite cuando en realidad el paciente ha podido presentar una reducción mayor. Es decir, proporciona una estimación de la reducción de ARN sesgada y puede enmascarar diferencias estadísticas significativas (Marschner *et al.*, 1999).

A pesar de que actualmente los ensayos para medir carga viral son más sensibles, sigue siendo alto el porcentaje de datos censurados debido a que también hay terapias antirretrovirales más potentes que llevan a conseguir cargas virales más bajas en un elevado número de pacientes. Por consiguiente, el *crude method* no es siempre el método más apropiado y, por tanto, la reducción de ARN tampoco el mejor *endpoint* para medir el éxito del tratamiento. Sin embargo, en nuestro caso observamos que, aun teniendo un método sesgado, obtuvimos resultados significativos.

La medida de respuesta en base a si se alcanzan o no niveles de carga viral indetectables, medida avalada por la FDA (Naeger y Struble, 2006), no se ve afectada por el problema de datos censurados. Sin embargo, proporciona menos información acerca de en qué medida la actividad antirretroviral en los pacientes con experiencia farmacológica está influenciada por los niveles basales de partida. Además, otro problema asociado a la

utilización de carga viral indetectable como medida de respuesta terapéutica es el amplio rango de medida de indetectabilidad, que en nuestro caso va desde <50 a <400 copias/mL.

En nuestro trabajo nos propusimos desarrollar algoritmos de interpretación genotípica basados en respuesta terapéutica para fármacos inhibidores de la transcriptasa inversa e inhibidores de la proteasa para los cuales existen discrepancias entre los distintos algoritmos publicados. De los primeros estudiamos tenofovir (**TDF**), didanosina (**ddl**) y estavudina (**d4T**). Como representantes del grupo de los inhibidores de la proteasa estudiamos lopinavir/ritonavir (**LPVr**) y (**FOSr**).

No se consideró el estudio de abacavir (ABC), saquinavir (SQV) ni atazanavir (ATZ) por no contar con tamaños de muestras suficientemente grandes para poder llevarlo a cabo. Con respecto a zidovudina (AZT), indinavir (IDV) y nelfinavir (NFV), no tuvimos en cuenta su estudio dado que se trata de fármacos con un papel limitado en el rescate de pacientes.

Es difícil calcular el **tamaño de muestra** requerido para proporcionar una adecuada confianza estadística a la hora de determinar relaciones genotipo-respuesta. Como regla general una muestra de 200-300 pacientes proporciona suficiente confianza para establecer una regla preliminar que recoja al menos los patrones más comunes de resistencia. Se requieren bases de datos más grandes para evaluar la presencia de mutaciones o combinaciones de mutaciones poco representativas que se espera que afecten a la respuesta (Brun-Vezinet *et al.*, 2004; De Luca *et al.*, 2004; Luna, 2004b). En nuestro trabajo el tamaño de muestra conseguido para los distintos fármacos fue: 153 y 123 pacientes para TDF a los tres y seis meses respectivamente, 137 y 104 para ddl, 75 y 54 para d4T, 123 y 98 para LPVr y 203 para FPVr, tamaños de muestra semejantes a los empleados en otros estudios similares (Masquelier *et al.*, 2004; Marcelin *et al.*, 2005; Pellegrin *et al.*, 2005).

Idealmente una regla para predecir la respuesta a partir del genotipo debería considerar un **periodo de seguimiento** a corto plazo y a más largo plazo (Brun-Vezinet *et al.*, 2004). Algunos autores consideran que la respuesta se debería definir al mes ó 2 meses desde el momento basal puesto que las mutaciones que aparecen en bajos niveles en el momento basal después, pueden aumentar bajo presión farmacológica, no dejando por tanto ver una posible respuesta transitoria al primer o segundo mes que luego pasa a resistencia con un rebote en la carga viral (Cabrera *et al.*, 2004).

Nosotros realizamos todo el estudio considerando como momento de seguimiento los tres meses y seis meses tras la realización del estudio de resistencias. A los seis meses en general perdimos pacientes, siendo por tanto, este menor tamaño de muestra

una limitación para el desarrollo de los algoritmos de interpretación. Para fosamprenavir/ritonavir se consideró la respuesta en un margen de tiempo (entre ocho y veinticuatro semanas) debido a que el seguimiento de los pacientes fue variado, no a fechas exactas de tres y seis meses.

En relación al diseño del estudio, añadir también que existen dos tipos de ensayos para evaluar la respuesta a un nuevo fármaco en pacientes pretratados: en primer lugar, los estudios **add-on** que suponen la adición de un fármaco al régimen antirretroviral al que se ha fracasado; aportan una gran ventaja que es proporcionar la medida más directa de la respuesta a un fármaco individual ante un determinado patrón genotípico. El segundo tipo de ensayo, que es el que seguimos nosotros, supone la inclusión del fármaco en estudio en el contexto de un **cambio completo de régimen**. El empleo de este tipo de estudios es más frecuente dado que reflejan más la práctica clínica. Sin embargo, su problema es que la respuesta a un fármaco concreto puede ser difícil de evaluar debido a la actividad del resto de componentes del régimen.

Con este diseño de estudio de cambio completo de régimen tras el estudio genotípico, el estudio estadístico es complicado, aunque se simplifica si el agente en estudio es el único de su clase en el régimen. Es difícil, por tanto, desarrollar scores, establecer puntos de corte clínicos para cada antirretroviral de forma individualizada (Arnedo y Pumarola, 2005) que es lo que nosotros hemos pretendido en nuestro trabajo. La respuesta virológica de nuestros pacientes puede reflejar no sólo el efecto del fármaco en estudio sino también el de los **fármacos acompañantes** y, por tanto, se puede tratar de una respuesta mayor a la posiblemente obtenida en un estudio de tipo *add-on*. Igualmente el tratamiento antirretroviral concomitante puede influir por la **resistencia cruzada** que puede tener lugar entre los fármacos del régimen limitando las opciones de tratamientos futuros, reduciendo la eficacia del régimen.

Otra posibilidad para evaluar la respuesta es quitar fármacos específicos de un régimen en fracaso virológico para poder ver la actividad residual del fármaco en presencia de determinadas mutaciones. El problema es que puede aumentar el riesgo de emergencia de resistencia (Brun-Vezinet *et al.*, 2004).

Para conseguir una interpretación adecuada del estudio genotípico se deberían tener en cuenta todos los **antecedentes** del paciente, entre ellos, la **historia terapéutica previa**. Es un dato no siempre fácil de obtener en detalle. Nosotros conocíamos específicamente el último tratamiento previo al estudio de resistencias de algunos pacientes y del resto de tratamientos anteriores contábamos, al igual que otros autores (Margot *et al.*, 2002; Brun-Vezinet *et al.*, 2003; Lanier *et al.*, 2004; Masquelier *et al.*, 2004)

con el dato del total de líneas de tratamiento utilizadas en toda la historia terapéutica del paciente.

Entre los antecedentes también puede ayudarnos en nuestro análisis la información de **estudios de resistencia previos**, en el caso de haberse realizado, así como en qué medida se utilizan para guiar la elección de nuevos tratamientos (Liu y Shafer, 2006). No obstante, en general, en los trabajos realizados para el desarrollo de algoritmos de interpretación utilizamos los datos del estudio genotípico realizado en el momento basal, sin referirnos a cualquier genotipado previo.

De este genotipo basal seleccionamos, siguiendo el trabajo realizado por Brun-Vézinet y colaboradores para abacavir (Brun-Vezinet *et al.*, 2003), Marcelin y colaboradores para didanosina (Marcelin *et al.*, 2005) y el equipo de Vora para atazanavir/ritonavir (Vora *et al.*, 2006), aquellas mutaciones cuya presencia estaba relacionada con la respuesta virológica con un nivel de significación de  **$p < 0.20$** . De esta forma dimos más margen de entrada de las mutaciones en el modelo que, por ejemplo, en el trabajo realizado por Masquelier para tenofovir en el que consideraban una  $p < 0.15$  (Masquelier *et al.*, 2004) o en el estudio de Marcelin para saquinavir/ritonavir que, aún más estrictos, fijaban una  $p < 0.10$  (Marcelin *et al.*, 2004b). No consideramos en ningún caso mutaciones adicionales reconocidas como mutaciones seleccionadas por cada fármaco si el valor de  $p$  estaba por encima de este valor fijado (De Luca y Perno, 2003).

Otro criterio que seguimos adicionalmente para la selección de estas mutaciones fue que presentasen una determinada prevalencia en la población estudiada, sabiendo que debido a la carencia de amplias bases de datos, algunas mutaciones podían presentar una baja prevalencia pudiendo ser por tanto infravaloradas. Al igual que hicieron el grupo de Brun-Vézinet para abacavir o Masquelier y su equipo para tenofovir, fijamos este criterio en un **10%**. A posteriori, teniendo en cuenta nuevos estudios de interpretación de mutaciones de resistencia (Marcelin *et al.*, 2004b; Marcelin *et al.*, 2005), repetimos el análisis teniendo en cuenta aquellas mutaciones presentes en al menos un **5%** de los pacientes. Al introducir esta modificación y repetir el análisis únicamente recuperamos nuevas mutaciones para tenofovir y fosamprenavir.

Al desarrollar nuestros algoritmos de interpretación tuvimos en cuenta si el **efecto de las mutaciones** sobre la respuesta virológica fue **negativo o positivo**. No consideramos una suma total de mutaciones para mostrar la globalidad del efecto. Ajustándonos más a la realidad, aquellas mutaciones cuya presencia suponía un aumento en los niveles de carga viral (efecto positivo) las introdujimos restando en la combinación, siguiendo el modelo planteado anteriormente (Marcelin *et al.*, 2005).



Construimos nuestros *scores* considerando la simple combinación de las mutaciones significativas. Sin embargo, la contribución relativa de cada mutación a la resistencia puede diferir dando lugar a **mutaciones de distinto peso** con respecto a la respuesta virológica. El proceso de añadir mutaciones sin un peso específico de cada una de las mismas es algo demasiado simple para describir la complejidad del mecanismo de resistencia. No obstante, se requerirían bases de datos con un alto número de pacientes que presentasen una única mutación para estimar el peso de cada mutación de manera fiable (Flandre *et al.*, 2005).

Con el método del desescalado o *removing* se consigue, de la suma que incluye todas las mutaciones preseleccionadas, mantener una mutación que contribuya de forma significativa a separar grupos de pacientes. Tanto a los tres como a los seis meses nos quedamos con la agrupación de partida (k) para definir la respuesta virológica a los fármacos estudiados en presencia de un número de mutaciones. Quitar una mutación de la combinación inicial (k-1) no mejoró la significación estadística, ya que p disminuía pero dentro del mismo rango exponencial y, por tanto, no se continuó el estudio de combinaciones k-2, k-3, etc. Comprobamos así que para los ITIANs todas las mutaciones tienen un peso semejante. Marcelin y colaboradores sí consiguen una mayor significación estadística, al eliminar las mutaciones D67N y V118I en su score de didanosina. Parten, por tanto, del concepto de que todas las mutaciones de análogos tienen igual peso. Por el contrario, para IPs sí existen mutaciones de distinto peso (mutaciones primarias, secundarias, polimorfismos). Por ello, al hacer el desescalado en nuestro score de interpretación de fosamprenavir consideramos continuar el desescalado a pesar de no haber cambio exponencial cuando las mutaciones que se eliminaran fuesen menores. De esta manera, llegamos al nivel (k-4) (10+20+33+46+53+54+82+84+90) tras eliminar las mutaciones en las posiciones 36, 71, 73 y 24. A partir de ahí, al quitar una mutación p mejoraría cuando se elimina la mutación L90M, cambio en el gen de la proteasa considerado mutación mayor, por ello, no continuamos el desescalado.

Una simplificación que la mayoría de los sistemas de interpretación utilizan, también nosotros, es definir la respuesta como **sensibilidad, sensibilidad disminuida o resistencia**. Esto se debe a la necesidad de dar un consejo simple, sin embargo, no debemos olvidar nunca que aunque el score esté definiendo, por ejemplo, un fármaco como resistente, puede haber actividad farmacológica residual. Además, el valor pronóstico de los distintos algoritmos es variable, es decir, según el algoritmo utilizado, el mismo virus puede que se considere resistente, intermedio o sensible, lo que afectará en la elección del régimen terapéutico (García *et al.*, 2003; Cabrera *et al.*, 2004). Se han encontrado **discordancias entre los distintos algoritmos de interpretación**,

principalmente para los inhibidores de la retrotranscriptasa como son la estavudina, didanosina y abacavir (Cabrera *et al.*, 2004; Zazzi *et al.*, 2004). Entre los IP, el lopinavir es uno de los inhibidores en el que se ha observado un mayor grado de discrepancia entre los diferentes sistemas de interpretación. En general para los no nucleósidos no suelen existir discordancias.

En nuestro trabajo observamos estas discrepancias entre algoritmos de interpretación al comparar nuestros scores con otras reglas o con otros estudios que también correlacionan genotipos con respuesta virológica: las reglas del grupo francés ANRS (*Agence Nationale de Recherches sur le SIDA*), los listados de mutaciones de resistencia del IAS (*Internacional AIDS Society*), así como los algoritmos desarrollados en distintos trabajos publicados en la misma línea.

Para cada fármaco consideramos el **total de mutaciones recogidas** por el IAS y ANRS para ITIANs así como para IPs. Aunque alguna mutación no estuviese recogida por estas reglas para algún fármaco en concreto, nosotros estudiamos todas porque si nos limitáramos a las definidas para cada fármaco, estaríamos acotando el estudio y lo que queremos es definir unas reglas que muestren la realidad de nuestra población. Es decir, no tratamos de comprobar reglas ya publicadas en nuestra población, sino de definir unas reglas según los datos de nuestra población.

En primer lugar, analizamos las mutaciones relacionadas con **tenofovir**, que es un fármaco eficaz para pacientes con elevada experiencia con tratamientos antirretrovirales. Es una buena opción terapéutica ante la presencia de un amplio rango de mutaciones de resistencia a pesar de que se ha observado que, al igual que para el resto de antirretrovirales, a medida que aumenta el número de mutaciones de resistencia, la respuesta virológica a tenofovir es menor (de Mendoza *et al.*, 2002).

A los tres meses la mejor regla predictora de respuesta fue la regla M41L+E44D+D67N+V118I+L210W+T215Y-M184VI  $\geq 4$ . El algoritmo de interpretación de la ANRS versión 13 (2005) incluye en su definición de resistencia a tenofovir la presencia de 6 ó más mutaciones entre M41L+E44D+D67N+ L210W+T215YF+T69DNS+74V y posible resistencia si aparecen entre 3 y 5 de las mismas. Esta regla se definió en base a un estudio realizado con una población similar a la nuestra, tanto en tamaño de muestra (161 pacientes frente a 153 que incluíamos nosotros), como en alto pretratamiento y fracaso. Para la definición de la regla analizaron el impacto de las mutaciones presentes en al menos un 10% sobre la respuesta virológica a los tres meses ( $p < 0,15$ ) (Masquelier *et al.*, 2004). En relación a la barrera genética, la ANRS considera dos niveles de respuesta clínica: resistencia y posible resistencia. Nosotros hablamos de pérdida de eficacia y lo

consideramos a partir de una reducción en los niveles de carga viral igual o menor a 0,5 log, al igual que Masquelier y colaboradores (2004). Ellos encuentran que a partir de 5 mutaciones tiene lugar esta pérdida de eficacia, mientras que nosotros, que incluimos en nuestro score la mutación M184V/I, cuya presencia resta -1 en el score, fijamos este número en 4. De esta forma, podemos apreciar que encontramos scores muy semejantes, en los que coinciden cinco mutaciones relevantes, que son M41L, E44D, D67N, L210W y T215Y.

Las cuatro **TAMs** incluidas en nuestro score (M41L, D67N, L210W y T215YF) son las mismas que se habían asociado con resistencia a tenofovir en estudios clínicos previos (Margot *et al.*, 2002; Miller *et al.*, 2002; Masquelier *et al.*, 2004). El efecto de la T215YF lo analizamos tanto en conjunto como por separado, T215Y y T215F, observando que todo el efecto significativo era debido a la variante T215Y, siendo por tanto ésta la que incluimos en el score. Se trata de mutaciones principalmente representativas de la ruta TAM1 (M41L, L210W y T215Y). Aparece la mutación D67N que parece tener la misma probabilidad de seleccionarse en las dos rutas, es decir, esta mutación no parece ser tan específica de la ruta TAM2, que es con la que inicialmente más se asociaba. De cualquier manera, en general los sistemas de interpretación no distinguen, por el momento, entre la ruta TAM1 y TAM2 a la hora de construir reglas de interpretación, como por ejemplo Rega o ANRS. Stanford sí parece tenerlo en cuenta puesto que asigna un menor peso a las mutaciones de la ruta TAM2 (Cozzi-Lepri *et al.*, 2005).

Incluimos en nuestro score las mutaciones **E44D** y **V118I**, que son otros cambios en la RT que han sido clasificados como NAMs y que parecen estar más asociadas con la ruta TAM1. Las reglas del IAS las consideraban para AZT y d4T y desde 2006 no las consideran para ningún ITIAN (Johnson *et al.*, 2006). La última versión del algoritmo de la ANRS únicamente incluye la E44D para tenofovir y la V118I para ningún fármaco (ANRS, 2005).

La mutación **M184VI** la incluimos en nuestro score, presentando un efecto positivo sobre la respuesta virológica a tenofovir y, por tanto, aparece restando. El IAS 2005 indica que puede retrasar la aparición de TAMs, así como mejorar la respuesta a tenofovir (Waters *et al.*, 2006). Su presencia supone alcanzar un mayor descenso en la carga viral, efecto que observamos igualmente para didanosina y estavudina.

El grupo de Masquelier en el desarrollo de su algoritmo de interpretación para tenofovir también la estudió, sin embargo, ésta no aparece en su score puesto que no presentó un efecto estadísticamente significativo sobre la respuesta virológica ( $p= 0,811$ ) (Masquelier *et al.*, 2004).

Nosotros consideramos el efecto conjunto y por separado de esta mutación. No obstante, el score definitivo incluye la variante conjunta, M184VI, ya que la M184I precede a M184V (Diallo *et al.*, 2003; Sproat *et al.*, 2005) y, por tanto, todas las variantes M184I detectadas en el estudio genotípico acabarán pasando a M184V.

Otro criterio de la ANRS para definir resistencia a tenofovir es la presencia de la **K65R**, únicamente con esta mutación ya se desarrolla resistencia a este fármaco. Para definir este criterio se apoyaron en los hallazgos de diversos estudios previos que han mostrado que la mutación K65R puede ser seleccionada por tenofovir, resultando en una sensibilidad disminuida al mismo (Stone *et al.*, 2002; Miller *et al.*, 2004; Waters *et al.*, 2006). En nuestro trabajo observamos que la presencia de esta mutación tiene un efecto significativo sobre el descenso de la carga viral. Sin embargo, de manera similar a la baja frecuencia que presenta esta mutación en otros estudios (Margot *et al.*, 2002; Waters *et al.*, 2006), encontramos que la mutación K65R aparece únicamente en un 3,3 y 0,8% del total de pacientes de los que se disponía de datos, a los tres y seis meses respectivamente, por tanto, no entró en el desarrollo del score de interpretación. El grupo de Masquelier tampoco incluyó esta mutación en su score de interpretación debido a que sólo dos pacientes de su estudio presentaban esta mutación (Masquelier *et al.*, 2004). Esta baja prevalencia en una población altamente pretratada con diversos fármacos (didanosina, zalcitabina o abacavir) que seleccionan esta mutación podría deberse a la menor capacidad replicativa del virus que expresa la K65R.

Por último, la ANRS también define resistencia a tenofovir con la presencia de la **inserción T69SS**, cambio genético que sólo apareció en un caso de nuestro estudio y que, por tanto, no pudimos analizar. Masquelier y colaboradores presentaron igualmente muy baja prevalencia de esta mutación, lo que no les permitió estudiar su impacto sobre la respuesta virológica (Masquelier *et al.*, 2004).

A diferencia de los grupos franceses, nosotros no incluimos en nuestro score, las mutaciones **T69DNS** y **L74V** por su baja prevalencia en nuestra población. Cuando consideramos la prevalencia de  $\geq 5\%$ , incluimos la mutación T69D en nuestro score.

Las reglas del IAS incluyen las mutaciones **K70R** y **K219E** como mutaciones relacionadas en general con todos los fármacos análogos, éstas no aparecen en más algoritmos. Al realizar el desarrollo de nuestro score considerando la respuesta a los seis meses sí incluimos la mutación K219E en el mismo.

En la última actualización de las reglas de la ANRS y del IAS (Johnson *et al.*, 2006) se considera una nueva mutación en la interpretación de tenofovir, la **K70E**, cuya presencia implica una posible resistencia al fármaco (Sluis-Cremer *et al.*, 2006). El uso de

tenofovir ha aumentado de manera significativa desde su introducción a finales de 2001 y la prevalencia de esta mutación ha aumentado desde entonces de un 0,15% (periodo pre-tenofovir 1998-2001) a un 0,25% (2002-2004) (Kagan *et al.*, 2005). Sin embargo, nosotros no la hemos incluido en nuestro score debido a que únicamente un paciente de los 153 (0,65%) a los que se les prescribió tenofovir en su nuevo régimen presentaba esta mutación.

Analizamos también las posibles diferencias entre algoritmos para **didanosina** que, al igual que tenofovir, es una opción terapéutica eficaz para pacientes con elevada experiencia de tratamientos antirretrovirales y con un amplio rango de mutaciones de resistencia (Molina *et al.*, 2005). Para evaluar el efecto de las mutaciones sobre la respuesta virológica a didanosina la metodología que seguimos fundamentalmente fue la realizada por Marcelin y colaboradores (Marcelin *et al.*, 2005). Sin embargo, éste se trataba de un estudio de tipo *add-on*, en el que, por tanto, evalúan el efecto de añadir didanosina al régimen TARGA actual en fracaso, obteniendo una evaluación muy rigurosa de la actividad intrínseca del fármaco y de los determinantes genotípicos de la respuesta virológica al mismo.

Para hablar de pérdida de eficacia de didanosina definimos la regla predictora de respuesta como:  $M41L+E44D+D67N+V118I+L210W+T215Y-K70R-M184VI \geq 4$ . La ANRS define la resistencia a didanosina cuando se da la condición:  $M41+T69D+L74V+T215YF+K219QE-K70R-M184V/I \geq 2$ . Esta regla se definió en base al estudio de Marcelin y colaboradores previamente referido, que evaluaba la respuesta a las cuatro semanas desde el inicio del tratamiento en un grupo de 168 pacientes, tamaño de muestra semejante al nuestro, que contaba con 137 pacientes. Ellos encuentran una pérdida de eficacia cuando la combinación definida era igual a 1. Ambos scores coinciden en dos mutaciones que suman, M41L y T215Y y dos que restan, K70R y M184V/I, luego la diferencia real en el número que marcamos para indicar la barrera genética la dan el resto de mutaciones.

Inicialmente la resistencia a la didanosina se relacionaba únicamente con la mutación **L74V**, debido a la rapidez con que aparecía esta mutación entre los pacientes en monoterapia con este fármaco. En nuestro trabajo esta mutación no presentó un impacto significativo sobre la respuesta virológica a didanosina, dato que igualmente mostraron Capdepon y colaboradores (Capdepon *et al.*, 2006). Blanco y colaboradores (2006) hacen mención a que en los pacientes que presentaban esta mutación acompañada de la K65R la respuesta era significativamente menor que en el resto de pacientes. No obstante, cuando algún paciente mostraba únicamente alguna de estas dos mutaciones no encontraron diferencias en la respuesta virológica. Por el contrario, las reglas francesas y

los datos mostrados por el equipo de Parikh y Costagliola y colaboradores (2006), sí encuentran la presencia de las mutaciones **K65R** y **L74V** relacionada con una menor respuesta a didanosina (Costagliola *et al.*, 2006; Parikh *et al.*, 2006).

Más recientemente la reducción de la sensibilidad a la didanosina se ha asociado también con la presencia de un número creciente de **NAMs**. Sin embargo, a pesar de que su actividad se ve afectada por la presencia de este grupo de mutaciones nuestro score muestra, de manera semejante a otros trabajos, como el estudio español diNAM (Blanco *et al.*, 2005), que este fármaco mantiene cierta actividad antiviral frente a cepas que expresan hasta 3 NAMs. Por tanto, su uso puede tener interés en pacientes en fracaso con otros ITIANs que se ven afectados por un menor número de NAMs, como pueden ser AZT o d4T (Molina *et al.*, 2005). Entre las NAMs nuestro score incluye la mutación **M41L**, que recogen numerosos estudios (Blanco *et al.*, 2005; Marcelin *et al.*, 2005; Blanco *et al.*, 2006b; Capdeponet *et al.*, 2006). Por el contrario, ninguno de los scores de los grupos franceses estudiados recoge la mutación **D67N**, que nosotros únicamente incluimos a los 6 meses. Nuestros resultados confirman que la didanosina mantiene actividad frente a virus que presentan la mutación **K70R**. Ésta se asocia normalmente con la D67N siguiendo la ruta 2 de acumulación de NAMs (D67N/K70R/T215F/K219Q), que de hecho normalmente se relaciona con una mejor respuesta virológica que la ruta 1, lo que se podría asociar a la presencia de la esta mutación en esta ruta (Marcelin *et al.*, 2004a; Capdeponet *et al.*, 2006). Blanco y colaboradores (2006) también refieren un mayor descenso en la carga viral en presencia de mutaciones de la ruta 2 de las TAMs (D67N, K70R o K219E/Q) que con las mutaciones de la ruta 1 (M41L, L210W y T215Y). Al igual que observamos para la mutación K70R, la **M184VI** tiene un cierto impacto positivo sobre la respuesta virológica. Aparece restando tanto en nuestro score como en el definido por las reglas de la ANRS. De hecho, como muestran otros estudios, su presencia no nos hace excluir el uso de didanosina en el tratamiento de pacientes con esta mutación (Sproat *et al.*, 2005).

De la mutación en la posición 215, analizamos las variantes **T215Y** y F, incluyendo en el score la T215Y, que fue a la que se debía el efecto. Capdeponet y colaboradores estudian cualquier variante, T215Y/F/C/D/E y, esta variable total, que incluye las revertientes C, D y E (de Mendoza *et al.*, 2002) es la que introducen en su score (Capdeponet *et al.*, 2006). No obstante, si observamos sus resultados, todo el peso de la significación de esta mutación se debe a las mutantes Y y F. El grupo de Marcelin y el de Blanco incluyen en sus respectivos scores la variante T215Y/F (Marcelin *et al.*, 2005; Blanco *et al.*, 2006b).

En relación a la mutación **K219Q/E**, no la incluimos en nuestro score ya que no se seleccionó en el análisis univariante por no mostrar un efecto significativo sobre la

respuesta virológica. Los autores del estudio diNAM indican que se trata de una TAM que, al igual que el resto de mutaciones de la ruta 2 de las TAMs, tiene un efecto menor sobre la respuesta virológica a didanosina (Blanco *et al.*, 2006b). Igualmente, el algoritmo de interpretación del Detroit Medical Center (DMC) considera que la actividad de este fármaco no se ve afectada por esta vía (Boulme *et al.*, 2001; MacArthur, 2004). Tanto las reglas de interpretación de la resistencia a didanosina de la ANRS, como los scores definidos por otros autores, incluyeron esta mutación pero fue seleccionada en sus análisis con un valor de significación muy cercano al límite del criterio establecido (0,20-0,22) (Marcelin *et al.*, 2005; Capdepon *et al.*, 2006).

En general, los distintos grupos de estudio hablan del efecto de las NAMs pero se refieren únicamente a las TAMs. Además de éstas, nosotros, al igual que Blanco y colaboradores (2006) incluimos en nuestro score las NAMs **E44D** y **V118I**, ésta última sólo entró a formar parte de nuestro score cuando estudiamos la respuesta virológica a los tres meses.

Las reglas de interpretación de la ANRS también definen resistencia a didanosina cuando se da la presencia del **complejo 151 de multirresistencia** a ITIANs. Para didanosina sí estudiamos su efecto, que no habíamos estudiado para tenofovir por ser éste el único fármaco del grupo que no se ve afectado por estas mutaciones. Sin embargo, ningún paciente del total de la población presentó dicha mutación y sólo en 1 paciente se detectó la A62V, una de las mutaciones asociadas al complejo. Según muestran diversos trabajos (Quiros-Roldan *et al.*, 2001; Re *et al.*, 2003) se trata de un grupo de mutaciones con una prevalencia muy baja actualmente, a pesar de que con el tiempo pueda aumentar a medida que vaya incrementándose el uso de tratamientos combinados. No obstante, la mutación Q151M ocasiona una resistencia que no es absoluta y además se trata de una mutación que no es estable y, por tanto, puede revertir hasta en un 10% de los casos (Zaccarelli *et al.*, 2004).

Por último, únicamente las reglas de la ANRS definen resistencia a didanosina ante la mera presencia de la **inserción 69**.

La **estavudina** ha sido uno de los fármacos más utilizados en el tratamiento de pacientes VIH. Su uso ha disminuido en los últimos años debido a su asociación con diversos efectos adversos y, sin embargo, últimamente parece que vuelve a resurgir su empleo, no tanto como fármaco de primera línea sino junto a tenofovir como parte de las terapias de rescate de pacientes en fracaso.

Para hablar de pérdida de eficacia de estavudina definimos la regla predictora de respuesta  $M41L+E44D+D67N+V118I+T215Y-M184VI \geq 2$ . Con la presencia de 3

mutaciones de las NAMs incluidas en el score y la M184V/I (supone un -1) tiene lugar una pérdida de eficacia de estavudina, criterio semejante a las reglas de interpretación de la ANRS que definen resistencia a este fármaco cuando se da que  $M41L+D67N+K70R+L210W+T215ACDEGHILNSV+K219QE \geq 3$ . Coincidimos en las mutaciones M41L, D67N y T215Y.

La primera mutación asociada con resistencia a estavudina fue la **V75T**, cambio que se seleccionaba *in vitro* y, sin embargo, se ha ido viendo su baja prevalencia *in vivo* en aislados clínicos de pacientes tratados con este fármaco (Shulman *et al.*, 2001; Martín-Carbonero *et al.*, 2004). Las reglas de interpretación de la ANRS sí recogen esta mutación, que debido a su baja prevalencia en nuestra población no fue seleccionada en el desarrollo de nuestro score de interpretación de resistencia a estavudina. El grupo español formado por Blanco y colaboradores, ha llevado a cabo recientemente el estudio ZENAM para ver la relación entre la actividad antirretroviral de estavudina y el número de mutaciones en la transcriptasa inversa. Indican que en los 40 pacientes estudiados, aquellos con la V75T, la mediana de reducción de los niveles de ARN de VIH era 0,39 log, por lo que muestran así que hay pérdida de eficacia de la estavudina en presencia de esta mutación (Blanco *et al.*, 2006a).

A partir de 1999 varios investigadores demostraron que la estavudina podía seleccionar algunas de las mutaciones de resistencia a AZT (Lafeuillade y Tardy, 2003). Desde entonces, diversos ensayos clínicos han mostrado que los regímenes que contienen estavudina son menos eficaces en pacientes que han tenido experiencia con AZT que en pacientes que nunca han recibido tratamiento debido a la selección de **TAMs** (Ross *et al.*, 2001; Calvez *et al.*, 2002). Nosotros pudimos observar, al igual que otros autores (Maggiolo *et al.*, 2005; Blanco *et al.*, 2006a) que la presencia de TAMs reducía la actividad antirretroviral de la estavudina, a pesar de que incluso en presencia de 4 TAMs ésta retenía cierta actividad. De ahí la posición actual de la estavudina en el rescate de pacientes en fracaso virológico, incluso con experiencia previa con análogos de timidina y en presencia de TAMs, especialmente TAMs de tipo 2 (Antinori *et al.*, 2005; Cozzi-Lepri *et al.*, 2005).

Con respecto a los cambios en la posición 215 del gen de la transcriptasa inversa, las reglas de la ANRS indican, en base a un estudio (Calvez *et al.*, 2002) la mera presencia de la mutación **T215Y/F** ya implica resistencia a estavudina. Aparte, recogen la influencia de las variantes T215ACDEGHILNSV en la resistencia a este fármaco.

La mutación **K65R** únicamente la recogen en el estudio ZENAM, en el que vieron que su presencia no afectaba a la respuesta virológica. En nuestra población, que



presentaba un número de pacientes mayor que este estudio, la prevalencia de esta mutación fue muy baja (1,3 y 0% a los tres y seis meses respectivamente).

Combinada con tenofovir, la estavudina es también una posible opción para rescatar no-TAMs, especialmente en fracasos tras la selección de mutaciones como L74V o M184V, que pueden aparecer tras un régimen que incluya por ejemplo ddl+3TC o ABC+3TC o K65R o M184V tras una terapia con TDF+3TC (Wainberg y Turner, 2004). En estas situaciones tenofovir es un fármaco adecuado combinado con un análogo de timidina, pudiéndonos plantear el uso de AZT o d4T. Sin embargo, de estas dos opciones el porcentaje de selección de TAMs es menor para la estavudina (Bocket *et al.*, 2004), que, como muestran Antinori y colaboradores (2006), tolera mejor que AZT el incremento en el número de TAMs.

La mutación **M184V** que incluimos en nuestro score no está considerada en la mayoría de algoritmos de interpretación de estavudina ya que no analizan esta mutación en sus estudios (Calvez *et al.*, 2002; García-Lerma *et al.*, 2002; Blanco *et al.*, 2006a). Sin embargo otros autores han indicado el efecto positivo de esta mutación sobre la sensibilidad a estavudina (Whitcomb *et al.*, 2003), ya que su presencia tiende a disminuir el impacto de las NAM sobre la resistencia a d4T (Lafeuillade y Tardy, 2003).

Por último, al igual que observamos para didanosina, las reglas de interpretación de la ANRS también definen resistencia a estavudina cuando se da la presencia del **complejo 151 de multirresistencia** o de la **inserción 69**. Únicamente tres y un paciente del total de la población en tratamiento con estavudina presentaron dichas mutaciones, respectivamente.

Globalmente, los algoritmos desarrollados para los ITIANs coinciden bastante con las reglas de la ANRS, que son nuestra referencia en la práctica clínica. En relación a las TAMs (M41L, D67N, K70R, L210W, T215Y/F y K219Q/E), las mutaciones **M41L** y **T215Y** las recogemos todos para tenofovir, didanosina y estavudina. Ellos consideran siempre la variante T215F además de la T215Y, no obstante, nosotros observamos que el efecto siempre venía dado por la variante T215Y. Las mutaciones **D67N** y **L210W** nosotros las consideramos para los tres fármacos y ellos no las consideran para didanosina. Sin embargo, en el estudio diNAM las relacionan con la resistencia a este fármaco, ya que consideran el total de TAMs (Blanco *et al.*, 2006b). La Sociedad Internacional del SIDA (IAS) las engloba entre las mutaciones de resistencia de todos los ITIANs. Con respecto a la mutación **K219QE** que aparece en las reglas de la ANRS para didanosina y estavudina, nosotros sólo la tuvimos en cuenta en el score de interpretación de tenofovir cuando se analizó la respuesta virológica a los seis meses y además, el criterio de selección de

mutaciones era 5%. La mutación **K70R** ellos la recogen, con efecto positivo sobre la respuesta virológica para didanosina, al igual que nosotros. Aparte, la consideran con efecto negativo en el score de estavudina, mientras que nosotros no la presentamos para este fármaco. De esta manera, se puede observar que en general incluimos en los distintos scores las TAMs de la ruta 1, que afectan en mayor medida a la respuesta virológica y aparecen más discordancias en relación a las TAMs de la ruta 2, mutaciones menos trascendentes. En relación a las NAMs **E44D** y **V118I**, que nosotros incluimos en los scores de los tres fármacos, ellos únicamente consideran la E44D para tenofovir. La mutación **M184V/I**, con efecto positivo sobre la respuesta, nosotros la consideramos para todos los fármacos mientras que ellos sólo en el score de didanosina. El IAS la presenta como una mutación que se selecciona en presencia de lamivudina o emtricitabina pero que además puede afectar a la sensibilidad de otros análogos como son abacavir, didanosina, zidovudina, estavudina o tenofovir (Gallant, 2005). Otras mutaciones que ellos tienen en cuenta, como son la K65R, la inserción 69, la L74V o la Q151M, nosotros no las incluimos debido a su baja prevalencia en nuestra población.

**Lopinavir** es un fármaco que se utiliza siempre farmacológicamente potenciado con ritonavir, que inhibe su metabolismo obteniéndose así altas concentraciones de lopinavir y, por tanto, una fuerte supresión de la replicación del virus.

Presenta una alta barrera genética, es decir, son necesarias muchas mutaciones para generar una reducción significativa en la sensibilidad al mismo. Generalmente en la mayoría de pacientes con alta experiencia con antirretrovirales, la resistencia a lopinavir/ritonavir se manifiesta únicamente tras la acumulación de múltiples mutaciones de resistencia en la proteasa (Friend *et al.*, 2004).

Para hablar de pérdida de eficacia de lopinavir/ritonavir definimos la regla predictora de respuesta a los tres meses  $10\text{FIRV}+46\text{IL}+54\text{VMLT}+77\text{I}+82\text{AFTS}+84\text{V} = 5$  o  $10\text{FIRV}+46\text{IL}+54\text{VMLT}+77\text{I}+82\text{AFTS}+84\text{V}-30\text{N} = 5$  si considerábamos como criterio de selección de mutaciones una prevalencia  $\geq 5\%$ . Al considerar la respuesta a los seis meses se añadían a nuestro score la mutación L90M y, restando, las mutaciones L63P y N88DS. Si además considerábamos las mutaciones presentes en más de un 5% añadíamos la mutación K20M/R aparte de la L90, L63P y N88D/S la mutación D30N, con efecto positivo. A los seis meses siempre el criterio era que en conjunto todas las mutaciones sumasen al menos 4.

Comparamos nuestros resultados con las reglas de interpretación de la ANRS que definen resistencia a este fármaco cuando se da la condición  $L10\text{FIRV}+K20\text{MR}+L24\text{I}+L33\text{F}+M46\text{IL}+I50\text{V}+F53\text{L}+I54\text{MLTV}+L63\text{P}+A71\text{ILVT}+V82\text{AFST}$

+I84V+L90M  $\geq$ 8. Desarrollan este algoritmo basándose en un estudio realizado por Calvez y colaboradores, que concluyen que mutaciones en las posiciones 10, 20, 46 y 54 del gen de la proteasa parecen estar muy relacionadas con fracaso virológico a lopinavir/ritonavir (Calvez *et al.*, 2001). También consideran un trabajo de otro grupo francés en el que definen como mutaciones predoctoras de menor respuesta virológica a este fármaco la L10FIRV, K20M/R/I, L33F, M46I/L, I54L/T/M/V/A/S, 82A/F/T/S y L90M (Chantret *et al.*, 2002). Igualmente, se basan en otros trabajos que incluyen las mutaciones en las posiciones 24, 53, 63, 71 y 84 (Kempf *et al.*, 2001), así como la mutación I50V (Masquelier *et al.*, 2002).

Nuestro score recoge mutaciones de gran peso sobre la respuesta virológica que igualmente recogen todas las reglas y estudios tenidos en cuenta: **10, 46, 54, 82, 84** e incluso la **90** cuando consideramos la respuesta virológica a los seis meses.

Además, incluimos la mutación V77I, que la ANRS no recoge en su algoritmo de interpretación. Al contrario, en su regla incluyen las mutaciones L24I, L33F, I50V, F53L o A71I/L/V/T, que nosotros no consideramos ya que todas ellas, excepto ésta última, presentaban una prevalencia muy baja, todas estaban presentes en menos de un 5% de los pacientes. Con respecto a la mutación **L63P** nosotros la incluimos en nuestro score cuando analizamos la respuesta virológica a los seis meses, sin embargo, en nuestro caso esta mutación mostró un efecto positivo sobre el descenso de carga viral.

No obstante, mutaciones potencialmente relevantes como **I47A/V** o **V32I** no pudieron ser consideradas por su baja prevalencia en nuestra población. La I47V es una mutación primaria para lopinavir (Gallant, 2005), que resulta a partir de un único cambio de nucleótido. La I47A requiere dos cambios y, por tanto, puede surgir tras la I47V, aunque también se puede seleccionar sin pasos intermedios (de Mendoza *et al.*, 2006). Ésta supone un alto nivel de resistencia a lopinavir y, a su vez, confiere resistencia cruzada a amprenavir o fosamprenavir. Las reglas de interpretación de la ANRS, basándose en un estudio de Friend y colaboradores, (Friend *et al.*, 2004) definen resistencia a este fármaco cuando se da la presencia simultánea de las mutaciones I47A/V y V32I. La mutación V32I es la única mutación de la proteasa asociada con la I47A. Por sí sola apenas tiene impacto sobre la sensibilidad a la mayoría de los inhibidores de la proteasa, sin embargo, en combinación con otras mutaciones en la proteasa contribuye a la aparición de resistencia. Las nuevas reglas de la ANRS de 2006 excluyen esta mutación del algoritmo de interpretación.

La mutación **D30N** entra en el modelo con efecto positivo sobre la respuesta virológica, lo cual es esperable dado que se trata de una mutación que limita la capacidad

replicativa lo que conlleva la presencia de una menor carga viral. Se trata de una mutación que se asocia con el uso de nelfinavir y, de hecho, de los pacientes que la tienen y se conoce su tratamiento anterior todos habían tomado dicho fármaco. La mutación **N88DS**, que suele aparecer junto a la D30N, presenta el mismo efecto positivo.

**Fosamprenavir/ritonavir** es un nuevo inhibidor de la proteasa que ha demostrado ser un fármaco eficaz en pacientes naïve y tratados. Hasta ahora había pocos datos de resistencia al mismo, la mayoría extrapolados de amprenavir y obtenidos en general de estudios con series de pocos pacientes.

El algoritmo de interpretación que desarrollamos para definir la respuesta a fosamprenavir/ritonavir fue 10+20+33+46+53+54+82+84+90. Incluye las mutaciones **10**, **54**, **82** y **84** recogidas en las reglas de la ANRS de 2005 y 2006 y en diversos trabajos realizados tanto para el estudio de la resistencia a amprenavir como a fosamprenavir (Descamps *et al.*, 2001; Marcelin *et al.*, 2003; Pellegrin *et al.*, 2005; Masquelier *et al.*, 2006). En relación a las mutaciones **33** y **90**, las reglas referidas, también las consideran para definir resistencia a fosamprenavir, excepto la versión de 2005 de las reglas de la ANRS. Esta versión previa difiere bastante de la última de 2006 con respecto a determinadas mutaciones menores: en 2005 incluyen la 20, 35, 41 y 63, mientras que en 2006 aparecen la 36I y la 62V. Ambas versiones coinciden en definir resistencia cuando aparecen juntas las mutaciones V32I y I47A o con la presencia de la mutación I50V, criterios que ya recogían en 2002 y 2003 y que no recogemos más autores, en nuestro caso debido a su baja prevalencia en nuestra población. Por último, coincidimos con los resultados de Pellegrin y Masquelier al incluir la mutación 46, que ya el equipo de Descamps había considerado para definir la resistencia a amprenavir.

En el estudio Zephir el grupo francés de Pellegrin y colaboradores analizan, al igual que nosotros, el impacto de las mutaciones basales en el gen de la proteasa sobre la respuesta virológica a fosamprenavir/ritonavir en pacientes con experiencia con antirretrovirales (n=121 frente a 203 en nuestro trabajo). Consideran también las mutaciones definidas por el IAS y la ANRS y además desarrollan el score tanto teniendo en cuenta ciertos polimorfismos (I13V, L19IQV, K55R, L89M) como sin considerarlos. Obtienen los mismos resultados en ambos casos, es decir, añadir dichos polimorfismos no mejora la sensibilidad o especificidad del score e incluso en algunos casos aporta más confusión (Pellegrin *et al.*, 2005).

Es difícil concluir cuál es el mejor algoritmo de interpretación de resistencias a un fármaco y el objetivo para el futuro ha de ser conseguir uno único, el mejor predictor de respuesta virológica.

En cualquier caso, ningún algoritmo puede aplicarse sin evaluar cuidadosamente los distintos condicionantes del fracaso terapéutico. De hecho, en la práctica clínica diaria, nos encontramos ante pacientes en los que es difícil aplicar una norma genérica, ante un mismo tratamiento de inicio en fracaso virológico y con similares mutaciones de resistencia, la elección del régimen de rescate debe hacerse según las particularidades del paciente (Miralles, 2006).

El fracaso, por tanto, no sólo se debe a la presencia de mutaciones de resistencia, influyen también **otras variables**, como la potencia del régimen terapéutico, la adherencia, la farmacocinética, la presencia de variantes minoritarias, los reservorios resistentes o la presencia de resistencia celular.

Por tanto, es necesario realizar un análisis en el que se estudie el efecto de los *scores* sobre la respuesta virológica en presencia de otros factores que también influyen en esta respuesta. Para ello, realizamos el análisis **multivariante** en el que se incluyeron todas las variables. No obstante, apreciamos que nuestro *score* perdía significación con la globalidad de factores debido a la presencia de una alta colinealidad. Así, si incluíamos en el análisis un *score* desarrollado para algún análogo y a su vez, el número de NAMs, éstas o al menos algunas de ellas, estaban recogidas por la variable *score* y, por tanto, era una variable a eliminar del análisis. Igualmente incluir variables como la presencia o no de AZT, d4T, ddl, etc. en un análisis multivariante en el que se está estudiando el valor predictivo de respuesta de un *score* de algún ITIAN, puede alterar los resultados ya que su presencia puede inducir al desarrollo de algunas de las mutaciones que ya recoge el *score*. Por consiguiente, eliminamos del análisis algunas de estas variables y nos quedamos con aquellas que no estaban tan directamente relacionadas entre sí: *score*, edad, sexo, adherencia, número de fracasos, número de fármacos nuevos o CD4 basales. Nuestros *scores* resultaron ser predictores significativos de respuesta independientemente del efecto de otras variables.

En nuestro caso, la variación de los niveles de ARN en el tiempo se puede explicar por la presencia de determinadas mutaciones que vienen recogidas con una seguridad de entre un 4,8 y un 37,3% ( $R^2=0,048$  y  $0,373$ ) por los *scores*.

En cuanto a la **adherencia**, se trata de un factor que influye en gran medida en la respuesta virológica (DeGruttola *et al.*, 2000; Baxter *et al.*, 2002; Mannheimer *et al.*, 2002; De Luca *et al.*, 2003; Vandamme *et al.*, 2004). De hecho, la falta de adherencia puede

resultar en una respuesta al tratamiento subóptima en ausencia de resistencia. Por ejemplo, para fármacos de baja barrera genética, como pueden ser 3TC, o los no análogos nevirapina o efavirenz, que con la presencia de una sola mutación ya aparece resistencia a los mismos, si se observa fracaso virológico y no aparecen mutaciones se debe pensar en no adherencia, el paciente puede que no esté tomando el tratamiento. Igualmente, la presencia un virus *wild-type*, es decir, sin mutaciones de resistencia, en un paciente multitratado nos puede orientar hacia una mala adherencia.

En nuestra serie, el porcentaje de datos perdidos de adherencia, variable recogida como menor o mayor al 80%, fue de un 24,4% del total de la población. De hecho, debido a este porcentaje de datos perdidos la influencia de la adherencia sobre la respuesta virológica resultó incluso no ser significativa en algunos casos. Al considerarla en el análisis multivariante, ésta no le quitó peso al score desarrollado, como predictor de respuesta.

Para el estudio de fosamprenavir/ritonavir, que se usó otra base de datos, todos los pacientes presentaban el dato de adherencia, recogido como mayor o igual al 95%, entre 76 y 94% y menor o igual al 75%. En el análisis multivariante resultó ser una de las variables con un efecto más fuerte sobre la respuesta virológica ( $p= 0,013$ ), sin embargo, no le quitó significación al score desarrollado, que se mantuvo como un predictor de respuesta ( $p= 0,002$ ).

Una forma más exacta de valorar la adherencia es midiendo los **niveles de fármacos antirretrovirales en sangre**, para comprobar así de manera más fiable que el paciente realmente toma el tratamiento y los fármacos realmente se están absorbiendo. De hecho, la tendencia para el futuro es considerar los resultados del estudio de resistencia junto a datos de niveles farmacológicos. Sin embargo, aún es una práctica difícil de llevar a cabo en muchos hospitales, dado que, por un lado, para su determinación se usan técnicas que requieren un personal muy especializado y, por otro lado, actualmente no están bien definidos todos los parámetros farmacocinéticas para los distintos fármacos antirretrovirales.

La presencia de **variantes virales minoritarias** con mutaciones asociadas a resistencia también es una variable que puede influir sobre la respuesta virológica (Van Laethem *et al.*, 2002). Se trata de variantes que se pueden generar por transmisión de cepas resistentes que, en ausencia de presión farmacológica, revierten a *wild-type*, al no tener buena capacidad replicativa. Se está planteando su estudio en distintos centros para ayudar a entender el fracaso virológico al tratamiento antirretroviral.

Con los scores desarrollados pretendemos explicar la falta de respuesta virológica en presencia de determinadas mutaciones de resistencia. Sin embargo, estas mutaciones no se detectan en el estudio genotípico realizado de rutina, éste no detecta las poblaciones virales que representen menos del 20% del total de la población viral y que, sin embargo, están presentes en poblaciones del virus presentes en el paciente infectado, en una pequeña proporción. Actualmente se están desarrollando técnicas más sensibles para su determinación y, si se consigue detectar estas poblaciones minoritarias portadoras de mutaciones, el informe genotípico va a incluir más cambios. Por tanto, en función de este número real de mutaciones se valorará el score y así se informará al clínico cómo se estima que sea la respuesta al tratamiento.

Actualmente no existen algoritmos de interpretación derivados de la respuesta clínica para todos los fármacos y los que existen, no están suficientemente validados. Con este trabajo hemos pretendido colaborar en esta tarea. No obstante, los actuales algoritmos de interpretación sólo consideran el efecto de un subgrupo de mutaciones que son las que tienen el efecto más fuerte sobre la sensibilidad y el mejor documentado. Sin embargo, existen complejos y muy diversos patrones de mutaciones de resistencia. Para su estudio, proyectos como el Response Database Initiative (**RDI**), que cuentan con datos de centros muy diversos de Estados Unidos, Canadá, Australia, Italia o España proponen el uso de herramientas bioinformáticas para realizar el análisis de la relación genotipo-respuesta terapéutica, que es difícil de realizar con la estadística estándar. La técnica que más emplean son los **neural networks** que consisten en un tipo de inteligencia artificial utilizada para predicción de fenotipos de resistencia a partir de genotipos (Beerenwinkel *et al.*, 2005).

El objetivo de este grupo y otros parecidos (**ARCA**, Antiretroviral Resistance Cohort Análisis; **Eurogene**, de carácter europeo; **RIS**, Red de Investigación de Sida, española; o **CORAO**, Cohorte de Resistencias de Andalucía Oriental) es realizar estudios de algoritmos de interpretación genotípica en poblaciones con un gran número de pacientes. Se proponen centralizar en una completa base de datos, información clínica y genotípica obtenida de un elevado número de unidades clínicas y laboratorios implicados en el tratamiento y monitorización de la infección VIH. Proporcionan además el soporte técnico y análisis estadísticos necesarios para el desarrollo de modelos matemáticos para realizar la predicción de respuesta al tratamiento.

La RIS es una estructura coordinada y organizada para la investigación del VIH/SIDA, financiada por el Ministerio de Sanidad y Consumo. Tiene definidos unos proyectos sobre los que existen numerosos datos en la literatura, pero no una respuesta definitiva y, para los cuales, sólo el trabajo en red permite conseguir. Entre estos proyectos

está definir una cohorte numerosa de pacientes seropositivos que permita valorar la eficacia de nuevos protocolos terapéuticos, así como realizar estudios de resistencias. Para contribuir al desarrollo de estas líneas de investigación los datos se almacenarán en un Centro de Datos integrado por epidemiólogos, estadísticos e informáticos.

Una posibilidad de modelos matemáticos son las *fuzzy rules* (De Luca *et al.*, 2004) que se usan para definir la resistencia a los antirretrovirales considerando que las cepas virales no tienen que pertenecer a un grupo exacto de nivel de resistencia sino que éste puede ser gradual, definido por unos rangos.



## 5.2. Vigilancia epidemiológica de subtipos no-B

### 5.2.1. Prevalencia de subtipos no-B y CRFs

La vigilancia epidemiológica de la infección por VIH y SIDA tiene como objetivo cuantificar la magnitud de la epidemia y definir las características de la población afectada. La epidemia de VIH/SIDA ha evolucionado de diferente forma e intensidad en distintas áreas geográficas del mundo, en función de factores sociodemográficos, culturales, económicos y políticos de cada zona (Rius et al., 2004).

Con la realización de este trabajo hemos tratado de contribuir a un mejor conocimiento de la distribución de la epidemia, así como definir las características de la población afectada en Andalucía Oriental. De esta forma, aportamos información para la vigilancia epidemiológica a nivel nacional de la situación actual en una región que destaca por su incremento de población no española en los últimos años. En enero de 2007 más de tres cuartas partes (77,01%) de la población inmigrante legal residente en España se agrupaba en seis comunidades autónomas (Cataluña, Madrid, Comunidad Valenciana, Andalucía, Canarias y Murcia) (Rumí, 2007). Del total de inmigrantes asentados en Andalucía, las tres provincias recogidas en nuestro estudio (Almería, Granada y Jaen, en orden decreciente) agrupaban cerca del 40%. El origen de esta población extranjera en estas provincias era África, Europa Comunitaria y Sudamérica fundamentalmente (Rumí, 2007). Los pacientes inmigrantes estudiados en nuestra serie procedían principalmente de África, seguido de Sudamérica y Europa del Este.

A nivel internacional, nuestro país se encuentra entre los países con más casos de VIH/SIDA de Europa (UNAIDS, 2006). En España, al igual que en el resto de Europa Occidental, Norteamérica y Australia, predomina la infección por subtipos B de VIH-1, variante que únicamente representa alrededor del 12% de los virus causantes de la pandemia a nivel mundial (Osmanov et al., 2002).

Este hecho lo hemos podido verificar en nuestra población, al encontrar que el 97,6% de los pacientes españoles estaba infectado por subtipos B. Al considerar el global de los pacientes de procedencia occidental, encontramos las mismas cifras de infección por este subtipo, al igual que muestran otros autores (Peeters et al., 2003; Wainberg, 2004).

El reciente incremento del número de inmigrantes en nuestro país, sin embargo, está facilitando una mayor prevalencia de subtipos no-B, cuya presencia se concentra mayoritariamente en esta población (Toro y Soriano, 2006). En nuestra serie, el 8,1% de las infecciones estaban causadas por subtipos no-B, cifras semejantes a las mostradas en los últimos años por otros grupos de estudio nacionales. Concretamente estudios llevados

a cabo en Galicia, Madrid, Cataluña, Comunidad Valenciana y Canarias han presentado prevalencias del 11,3%, 12,5-16%, 11,6%, 11,5% y 22,4%, respectivamente (Lospitao et al., 2005; Toro et al., 2006). Otros países de la Unión Europea, como son Italia (9,1%), Portugal o Bélgica (>15%) muestran igualmente cifras significativas de infecciones por subtipos no-B (Mascolini, 2005).

Además del subtipo B, en España se han comunicado casos de infección por VIH de todos los subtipos (Ramírez de Arellano et al., 2006), varias formas recombinantes (CRF01AE, CRF02\_AG, CRF05\_DF, CRF12\_BF y CRF14\_BG entre ellas) y múltiples URFs, incluso en población no inmigrante (Rivas et al., 2006). En nuestro estudio se encontraron agentes pertenecientes a 5 subtipos distintos (A, B, C, F y G), 4 CRFs (CRF01AE, CRF02\_AG, CRF11\_cpx y CRF12\_BF) y algunos casos de URFs.

Con respecto al país de origen de los pacientes de nuestro trabajo infectados por subtipos B, aparte del alto porcentaje de españoles comentado anteriormente, encontramos 7 casos procedentes de otros países de la Europa comunitaria: Francia, Holanda, Italia, Portugal y Reino Unido, así como un caso de Norteamérica, hecho ampliamente recogido en la literatura (Thomson et al., 2002b; McCutchan, 2003). Registramos también 7 casos de infección por subtipo B originarios de Sudamérica (Argentina, Brasil, Colombia y Chile), países con una elevada prevalencia de este subtipo (Bongertz et al., 2000; Requejo, 2006). También hubo 3 casos en pacientes procedentes de República Dominicana y Puerto Rico.

Otro hecho a resaltar de nuestros resultados es la presencia de dos pacientes procedentes de Guinea Ecuatorial y Nigeria infectados por subtipo B, que se detectaron en 1999 y fueron subtipados por HMA. El grupo de riesgo en ambos casos fue heterosexual, pero se desconoce el lugar de adquisición de la infección (España o país de origen).

Los subtipos no-B y formas recombinantes encontradas en nuestra población de estudio fueron por orden decreciente de frecuencia CRF02\_AG, CRF01\_AE, subtipos G, A, C, F, CRF12\_BF y CRF11\_cpx. Estos resultados concuerdan con los datos presentados por Ramírez y colaboradores, que indicaban que los subtipos C, A, CRF01AE y CRF02AG representan el 77% de las infecciones mundiales (Ramírez de Arellano et al., 2006). Otros autores españoles han descrito igualmente el predominio del subtipo G y el CRF02\_AG entre los subtipos no-B hallados en nuestro país, encontrados éstos sobre todo en pacientes provenientes de África Occidental y Central (Holguin et al., 2002; Lospitao et al., 2005).

En nuestra zona no hallamos ningún caso de infección por la forma recombinante CRF05\_DF, la cual ha sido descrita en otras comunidades españolas (Casado et al.,

2003). Tampoco encontramos ningún paciente infectado por la variante CRF14\_BG, descrita en Galicia, donde circula con incidencia creciente (Thomson et al., 2001) y también hallada en otros países de la Europa Comunitaria (Harris et al., 2005).

Entre los pacientes extranjeros de nuestra serie procedentes de países en vías de desarrollo, encontramos que hasta el 75,9% estaban infectados por diversos subtipos no-B y CRFs. El origen geográfico de nuestros pacientes infectados por subtipos no-B fue variado, siendo la procedencia más frecuente la africana, al igual que en otros estudios europeos (Esteves et al., 2002). Destacaron en cuanto a países de origen más frecuentes, Guinea-Bissau, Nigeria y Senegal con un 11,7%, 10% y 10%, respectivamente. Del total de pacientes africanos de nuestra serie únicamente el 5,9% procedían de Marruecos, siendo el resto originarios de África Occidental. Estos resultados coinciden con los datos publicados por el programa de SIDA de las Naciones Unidas, donde se afirmaba que el 70% de los casos de VIH/SIDA en el mundo se encontraban en África subsahariana (Rius et al., 2004; UNAIDS, 2006).

Al analizar la procedencia concreta de cada subtipo y forma recombinante encontramos una destacable similitud con los hallazgos publicados en la literatura. Los casos de infección por subtipo A de origen conocido, procedían de Guinea-Bissau, Mali y Senegal, coincidiendo con la distribución geográfica registrada para este subtipo en África Occidental (Peeters et al., 2003; Wainberg, 2004; Arien et al., 2005). Éstos y otros autores han comunicado la distribución del subtipo G y la forma recombinante CRF02\_AG en África Occidental, siendo esta última la forma genética más prevalente en la zona (Thomson et al., 2002b). Entre los pacientes de nuestra serie, aquellos infectados por subtipo G procedían mayoritariamente de Nigeria (país con la mayor prevalencia de este subtipo) (Thomson et al., 2002b), Guinea-Bissau y Sierra Leona. Los infectados por CRF02\_AG eran originarios de Guinea-Bissau, Nigeria, Gambia, Ghana, Mali y Senegal. Además de este origen africano, pudimos encontrar un paciente infectado por CRF02\_AG procedente de Ecuador. Éste no es un país en el que predomine esta variante, aunque sí se han descrito algunos casos desde su primer hallazgo en 2003 (Carrion et al., 2003), no obstante, desconocemos si la infección pudo producirse en nuestro país.

El CRF01\_AE circula principalmente por el Sudeste asiático, aunque se originó probablemente en África Central, donde es posible encontrarlo, aunque no como forma predominante (Thomson et al., 2002b). Se han descrito algunos casos de infección por esta variante en Camerún (Arien et al., 2005), dos de nuestros pacientes infectados por CRF01\_AE procedían de África Occidental, concretamente Ghana y Guinea-Bissau. Además de esa procedencia africana, encontramos 4 pacientes de nuestra serie infectados por esta variante, originarios de Rusia. En esta región el subtipo A es el predominante,

junto con la forma recombinante CRF03\_AB. Los cuatro casos eran mujeres heterosexuales cuyo origen de la infección era desconocido.

El subtipo F es predominante en Rumania según se describe en la bibliografía (Thomson et al., 2002b), hecho que comprobamos con un caso por subtipo F de nuestra serie procedente de este país. Además encontramos otro caso de infección por este subtipo en un paciente procedente de Marruecos, país en que se han descrito pocos casos de infección por el mismo (Elharti et al., 2002). Los primeros casos de infección por esta variante en España, fueron comunicados en dos pacientes argentinos residentes en Madrid en 2002 (Holguin et al., 2002).

El paciente que hallamos en nuestra población infectado por CRF12\_BF, procedía de Argentina. Se trata de una forma ampliamente distribuida en dicho país, como se muestra en diversos trabajos (Thomson et al., 2000; Thomson et al., 2002a). Las cepas de subtipo C de nuestra población se aislaron en los dos miembros de una pareja procedente de Rumania y en un español homosexual, del que se desconoce datos acerca de su pareja que puedan aportar información sobre la adquisición de este subtipo. Este subtipo se encuentra mayoritariamente en el sur y este del continente africano (Thomson et al., 2002b; Perrin et al., 2003).

En nuestra serie encontramos cinco casos de infección por URF, uno de ellos procedente de Cuba, coincidiendo con lo recogido en la literatura (Cuevas et al., 2002).

Dado que la recombinación se da por la infección simultánea por dos o más cepas genéticamente diferentes que cocirculan en la zona, si comprobamos que en nuestra región están presentes los subtipos A, B, C, F, G, CRF01\_AE, CRF02\_AG, CRF11\_cpx y CRF\_12BF, en cualquier momento se podrían generar en nuestra área otras CRFs portadores de esos fragmentos. En nuestro estudio no se ha registrado ningún caso de cambio de subtipo de un mismo paciente con el paso del tiempo.

En cuanto a la presencia de infección por VIH-2 o por los grupos N y O del VIH-1, en España únicamente hay descritos 128 casos por VIH-2, 5 casos por VIH-1 grupo O y ninguno por grupo N (Holguin et al., 2005). En nuestra serie no hemos detectado ningún caso a pesar del alto porcentaje de pacientes inmigrantes estudiados procedentes de África Occidental, donde se localizan fundamentalmente los casos asociados al VIH-2. No obstante, la mayor prevalencia de VIH-2 fuera de África está en Portugal, país fronterizo con nosotros, donde el 4% de la población seropositiva está infectada por el VIH-2 (Vandamme et al., 2004).

La baja prevalencia de estas variantes podría deberse a la menor capacidad de replicación y transmisión (100 veces menos) que presentan VIH-2 y VIH-1 grupo O,

respecto al VIH-1 grupo M, según ha podido ser establecido en modelos in vitro (VIH-1 grupo M > VIH-2 > VIH-1 grupo O), coincidiendo con el orden de prevalencia en la epidemia humana (Arien et al., 2005).

El diagnóstico, cuantificación y secuenciación de las muestras de nuestros pacientes se llevaron a cabo con técnicas adecuadas para el estudio de esta gran diversidad genética del VIH. Así, cabe destacar que los métodos serológicos empleados en el diagnóstico de nuestros pacientes eran métodos capaces de detectar tanto los VIH-1 de los grupos M y O, como VIH-2. Igualmente, la determinación de las cargas virales en nuestra serie permitió la detección de todos los subtipos. Se llevó a cabo mediante la versión 1.5 de Cobas Amplicor (Roche), que es una versión mejorada frente a la versión anterior 1.0, que no detectaba o infravaloraba la cuantificación de algunos subtipos. Dicha versión original estaba diseñada en base a las secuencias de subtipo B de VIH-1, mientras que en la nueva versión automatizada se modificaron los primers, basados en una secuencia consenso de subtipo no-B (Holguin et al., 2001). La versión 1.5 amplifica la región *gag* (Jenny-Avital y Beatrice, 2001), que es más conservada, siendo así capaz de detectar más subtipos, como han mostrado diversos estudios (Damond et al., 1999; Michael et al., 1999; Swanson et al., 2001; Harris et al., 2005). Por último, en la secuenciación de nuestras muestras se utilizaron también nuevos primers tanto para la RT-PCR como para la CLIP o reacción de secuenciación. Para esta última se emplearon los primers actualizados P2 y no los PR, que funcionaban bien con muestras de subtipos B y D, mientras que los P2 hibridaban mejor con el resto de subtipos (Jagodzinski et al., 2003).

La definición del subtipo infectante o el reconocimiento de los virus recombinantes se mejora al analizar múltiples regiones del genoma pero la determinación precisa requiere el análisis del genoma completo (Harris et al., 2005). La secuencia de la región *env*, desde 1992, ha sido la utilizada para clasificar los distintos subtipos y CRFs del VIH (Quiñones-Mateu y Arts, 1999), aunque el estudio de secuencias del gen *pol* para valorar las resistencias a los fármacos antirretrovirales ha sido catalogada como una herramienta válida también para la caracterización de subtipos y CRFs (Lospitao et al., 2005).

La mayoría de los subtipos estudiados en nuestra población se determinaron a partir del análisis del gen *pol* (proteasa y transcriptasa inversa), que al ser insertadas y analizadas en la base de datos de Stanford aportaban la información del subtipo infectante. Únicamente el primer año de nuestro estudio, el subtipado se realizó a partir de un fragmento de *env* en el genoma de VIH (HMA). En nuestro trabajo presentamos varios casos de cepas que denominamos no tipables (NT), ya que la técnica de HMA utilizada no permitió clasificarlas en ningún subtipo con las cepas de referencia a las que se enfrentaron (Álvarez, 2002). Cuatro de los cinco casos designados como URF fueron

identificados en 1999 como subtipo A (mediante HMA del gen *env*) y a posteriori por secuenciación del gen *pol* fueron B

En la práctica clínica diaria generalmente no se analizan fragmentos largos del genoma debido al alto coste, tiempo y laboriosidad del proceso, de ahí que en muchos casos la frecuencia de CRFs pueda estar subestimada. Además, está muy extendido el uso de técnicas de subtipado rápido, lo que conlleva igualmente la subestimación de cepas recombinantes. Por otro lado, en la mayoría de centros el subtipado no forma parte de la rutina asistencial, de manera que los estudios de prevalencia de subtipos no-B no están extendidos ni actualizados en todas las comunidades.

Al analizar la distribución interanual de los subtipos encontrados en nuestra población, observamos que los subtipos no-B aparecieron fundamentalmente en 1999 y, posteriormente en 2005 y 2006. En primer lugar, en 1999 se llevó a cabo un estudio retrospectivo diseñado para analizar subtipos no-B. Se recogieron, por tanto, un alto número de muestras de pacientes inmigrantes atendidos en distintos centros de la provincia de Almería y de ahí la alta prevalencia de estos subtipos. En los dos últimos años del estudio, encontramos un alto porcentaje de subtipos no-B, hecho que coincide con el comienzo de un estudio prospectivo de resistencias primarias en pacientes naïve/nuevos diagnósticos, que está permitiendo detectar la introducción de nuevos subtipos no-B en la población. De este grupo el 30% son no-españoles, de los cuales el 83% están infectados por subtipos no-B.

Del total de pacientes infectados por VIH en el mundo el 45,7% son mujeres y 7,6% niños (UNAIDS, 2006). Entre los datos generales de nuestros pacientes pudimos comprobar que el 27,6% eran mujeres, similar al 20% expresado en otros estudios nacionales (Rius et al., 2004), mientras que entre los pacientes infectados por subtipos no-B, fundamentalmente extranjeros, esa proporción se elevaba hasta el 42,9%, dato concordante con lo expresado anteriormente (Ramos et al., 2005).

Desde el principio de la pandemia parecen existir dos patrones epidemiológicos en cuanto a la adquisición de la infección por VIH-1; uno observado en Europa occidental, Norteamérica y Australia causado por la extensión de la infección por vía homosexual, bisexual o parenteral (UDVP), y otro en África y Asia que parece estar más relacionado con la transmisión heterosexual (Herring et al., 2003; Rius et al., 2004). La transmisión por vía parenteral en Occidente se debe fundamentalmente al intercambio de jeringuillas entre personas UDVP y, en menor medida, a transfusiones de sangre contaminada, ya que este fenómeno actualmente está muy controlado (Herring et al., 2003). Los resultados de nuestro estudio mostraban las vías parenteral (UDVP) y heterosexual como principales

vías de transmisión del VIH. La primera era especialmente importante entre españoles, mientras que la segunda era el factor de riesgo asociado a todos los pacientes africanos estudiados, como también han comentado otros autores (Rius et al., 2004; Ramos et al., 2005). Hemos comprobado, como decían otros autores (Herring et al., 2003; Rius et al., 2004; Ramos et al., 2005), que la transmisión por vía parenteral no es habitual en los pacientes africanos. Entre los pacientes sudamericanos estudiados había casos asociados a prácticas homosexuales y heterosexuales, al igual que comentaban otros autores con más casos estudiados, que referían un 46% y 35% asociado a estos dos factores de riesgo, respectivamente, en esta población (Ramos et al., 2005). Los pacientes estudiados de Europa del Este habían adquirido la infección vía heterosexual, aunque la vía primordial en este grupo suele ser la asociada al uso de drogas por vía parenteral (Rius et al., 2004).

El conocimiento de estos factores de riesgo es importante para poder actuar sobre los diferentes grupos de población en la prevención de la infección, especialmente en los últimos años en los que debido al optimismo producido por la efectividad del TARGA ha aumentado la incidencia de enfermedades de transmisión sexual (Scheer et al., 2001).

### 5.2.2. Polimorfismos en el gen de la proteasa de subtipos no-B

Las reglas de interpretación de la resistencia a inhibidores de la proteasa, están definidas en base al subtipo B. En los últimos años numerosos estudios han mostrado que determinados cambios en el gen de la proteasa recogidos como mutaciones de resistencia en estas reglas, son en realidad polimorfismos naturales específicos de subtipos no-B.

Entre los **cambios recogidos por distintas reglas** de interpretación identificados como posibles polimorfismos se encuentran las mutaciones **L10V** (Yerly *et al.*, 2001), **I13V** (MacRae y Loveday, 2005; Vandamme *et al.*, 2005), **G16E** (MacRae y Loveday, 2005), **K20I** (Montes *et al.*, 2004; Tebit *et al.*, 2006), **K20M** (Petroni *et al.*, 2006), **K20R** (MacRae y Loveday, 2005; van de Vijver *et al.*, 2005; Vandamme *et al.*, 2005; Kantor, 2006), **E35D** (Marcelin *et al.*, 2003), **M36I** (Montes *et al.*, 2004; MacRae y Loveday, 2005; van de Vijver *et al.*, 2005; Vandamme *et al.*, 2005; Kantor, 2006; Tebit *et al.*, 2006), **R41K** (Marcelin *et al.*, 2003; MacRae y Loveday, 2005), **K43T** (Kantor *et al.*, 2005), **D60E** (MacRae y Loveday, 2005), **H69K** (MacRae y Loveday, 2005; Vandamme *et al.*, 2005), **V82I** (Kantor y Katzenstein, 2003), **V82A** (Holguin *et al.*, 2004), **L89IV** (Abecasis *et al.*, 2005; Kantor, 2006), **L89M** (Calazans *et al.*, 2005), **I93L** (Handema *et al.*, 2003; MacRae y Loveday, 2005).

Al comparar en nuestra población la prevalencia de estos polimorfismos entre subtipos B y no-B encontramos que todos los cambios comentados, excepto las mutaciones V82A e I93L, aparecían con una frecuencia significativamente mayor en subtipos no-B. La mutación I93L no aparece en el algoritmo de interpretación de resistencia a IPs usado en nuestro estudio (ANRS, 2006), sin embargo, la V82A sí aparece en el algoritmo de interpretación de saquinavir/ritonavir y lopinavir/ritonavir.

Al analizar nuestros resultados pudimos observar la mayor prevalencia en **subtipos no-B naïve** a IPs de los cambios en el gen de la proteasa **L10V**, **G16E**, **K20M** y **K20R**. Que esta mayor prevalencia se dé en pacientes nunca expuestos a tratamiento con estos fármacos apoya el planteamiento de que se trate de cambios naturales en estos subtipos y no consecuencia de selección por el tratamiento antirretroviral. Al observar a continuación la frecuencia de estos mismos cambios en pacientes previamente tratados con IPs pudimos apreciar que dichos cambios seguían apareciendo más frecuentemente en no-B que en B a pesar de que no se observaba una diferencia estadísticamente significativa.

Los cambios **I13V**, **K20I**, **E35D**, **M36I**, **H69K** y **L89M** fueron significativamente más prevalentes en **subtipos no-B** tanto en pacientes **naïve** como en **pretratados**. Su presencia es por tanto, independiente de que haya habido o no tratamiento. El hecho de



que en naïve ya se observen indicaría, que se pueda tratar de polimorfismos específicos de estos subtipos y, aunque haya tratamiento estos cambios se mantienen, intrínsecos al subtipo.

Por último, los cambios **K43T**, **I47A**, **I54M**, **L76V** aparecían con una prevalencia significativamente mayor en pacientes infectados por **subtipos no-B pretratados**, por tanto, al no observarse esta diferencia en pacientes naïve se puede comprobar que no son polimorfismos propios de subtipo. En la literatura no aparecen como tal, sino que, por el contrario están recogidos como mutaciones de resistencia; así, por ejemplo, la mutación K43T está recogida como mutación menor de resistencia a TPVr en la última actualización de mutaciones de resistencia del IAS (Johnson *et al.*, 2006), la I47A aparece como mutación relevante en la resistencia a LPVr, cuya mera presencia ya implica resistencia a este fármaco (ANRS, 2006; Johnson *et al.*, 2006). Igualmente, las mutaciones I54M y L76V están incluidas como dos mutaciones mayores en la resistencia a darunavir/ritonavir. Shafer y colaboradores indican la presencia de las mutaciones K43T, I54M, L76V en pacientes pretratados y su ausencia en naïve, lo que apoyaría la idea de que no se trate de polimorfismos. No obstante, difieren de nuestros resultados ya que en general no encuentran estas mutaciones más frecuentemente en subtipos no-B: la K43T la hallan en un alto porcentaje en subtipo B, aunque también en F, muestran datos de la mayor prevalencia de la I54M en subtipos B y D (este último es en realidad una variante del subtipo B) y la L76V aparece con una prevalencia semejante en todos los subtipos, algo más alta en subtipo A (Shafer *et al.*, 2007).

Algunos autores han propuesto como posibles polimorfismos ciertos **cambios** en el gen de la proteasa **no incluidos en las reglas** de interpretación. Así, por ejemplo, Mac Rae y colaboradores mostraron como polimorfismos característicos de subtipos no-B las posiciones **T12S**, **L19IT**, **N37S**, **Q61E**, **K70R**, **T74S** y **L89M** (Handema *et al.*, 2003; MacRae y Loveday, 2005). En nuestra población sólo se estudió el cambio L89M, que mostró una frecuencia significativamente mayor en subtipos no-B.

Además de los cambios comentados, en nuestra serie encontramos la mutación **I13L**, con una frecuencia significativamente mayor en subtipos no-B, dato **no recogido en las reglas ni en la literatura**.

Cuando comparamos en general en pacientes naïve a IPs la **frecuencia de mutaciones** de resistencia presentes en pacientes infectados por subtipo no-B y B encontramos que el polimorfismo más frecuente en **subtipos no-B** fue M36I, coincidiendo con otras series (Holguin *et al.*, 2002). En orden decreciente los polimorfismos más frecuentes encontrados en nuestra población fueron los siguientes: **M36I** (96,9%),

L89VMIT (89,2%), R41K (86,2%), H69K (75,5%), K20I (58,5%), I13V (55,4%), E35D (49,2%), L63P (24,6%), V82I (23,1%), G16E (23,1%), I93L (18,5%) y L10I/V (12,3%). El grupo español de Holguín y colaboradores (2002) comunicaron las siguientes cifras: **M36I** (100%), K20I/R (77,2%), L63P (40,3%), V82I (17,5%), L10S/I/V (14%) y V77I (3,5%); por otro lado, otros autores hallaron los siguientes porcentajes: **M36I** (83%), L63P(17%), L10I/V/R(13%), K20R(10%), V77I(2%), A71T(0,5%) (Pieniazek *et al.*, 2000). Estos dos grupos no estudiaron algunos de los polimorfismos que nosotros comentamos en nuestros resultados como L89VMIT, R41K, H69K, I13V, E35D, G16E o I93L y, consecuentemente, no coincidieron con las mutaciones que siguieron en frecuencia a la M36I de nuestra serie. Considerando esta apreciación, los resultados hallados en nuestra serie son paralelos a los expresados por ambos grupos. Holguin y colaboradores estudiaron un elevado número de subtipos G, muy asociados a la mutación K20I, de ahí el alto porcentaje de esta mutación encontrado en su estudio. Pieniazek y colaboradores, sin embargo, incluyeron un predominio de subtipos A y CRF01\_AE. A la luz de estos datos, el cambio M36I puede ser catalogado como el marcador más específico de subtipos no-B, como ya refirieron otros autores (Fonjungo *et al.*, 2002).

Para **subtipos B** nuestros datos coincidieron con los resultados de esos dos grupos, apareciendo la mutación **L63P** como la más frecuente (58,2-64%) en los tres trabajos (Holguin *et al.*, 2002). En nuestra serie aparecía tanto en naïve como pretratados. En nuestra población además de esta mutación, los cambios **L10I**, **I62V**, **A71T** y **L90M** aparecieron con una frecuencia significativamente mayor en subtipos B, al igual que describen otros autores (Montes *et al.*, 2004; MacRae y Loveday, 2005). (Kantor y Katzenstein, 2004) La mayor frecuencia en el subtipo B de las mutaciones I62V y A71T se dio en naïve a IPs. Por último, la diferencia en prevalencia de las mutaciones L10I y L90M la encontramos para pacientes pretratados.

Algunos de los polimorfismos descritos se han asociado con **subtipos concretos**. No obstante, a pesar de que efectivamente cada subtipo difiere genéticamente del resto de subtipos, hay poca información disponible para poder determinar la frecuencia de mutaciones para cada subtipo. Así por ejemplo el número medio de secuencias de pacientes tratados por subtipo es sólo aproximadamente un 2-4% del total de secuencias de pacientes tratados infectados por subtipo B (Rhee *et al.*, 2006). Igualmente, en nuestro trabajo contábamos con un tamaño de muestra pequeño para poder encontrar diferencias en las secuencias de los distintos subtipos no-B, sin embargo, tratamos de analizar en la medida posible lo comentado al respecto por distintos autores en nuestra serie.

Así, algunos autores indican que el cambio **K20I** está relacionado específicamente con el subtipo G y CRF02\_AG y podría considerarse un marcador genético de estas

variantes (Holguin *et al.*, 2004; Montes *et al.*, 2004). En nuestra serie hemos podido comprobar este hecho al aparecer esta mutación en el 90,9 y 92,6% de los subtipos G y CRF02\_AG, respectivamente.

El cambio **E35D** lo encontramos más específicamente asociado a los subtipos F, a los casos infectados por CRF11\_cpx, seguido de la forma recombinante CRF01\_AE, datos similares a los mostrados por el grupo internacional de trabajo en subtipos no-B (Shafer *et al.*, 2007), que además muestran la alta prevalencia de este polimorfismo en subtipo A. Este hecho no pudo ser comprobado en nuestro estudio, dado que los casos de infección por este subtipo en nuestra población no contaban con estudio de mutaciones de resistencia.

Algunos autores han relacionado el cambio **M36I**, considerado un marcador genético de todos los subtipos no-B, con algunos subtipos concretos; Hsu y colaboradores encuentran esta mutación en los 35 pacientes (100%) naïve infectados por **CRF01\_AE** de su estudio (Hsu *et al.*, 2005) y Kantor y colaboradores afirman que aparece de manera universal en **subtipo C** (Kantor y Katzenstein, 2004).

En relación con el cambio **H69K**, nuestros datos muestran una alta prevalencia del mismo en los subtipos C, G, CRF01\_AE, CRF02\_AG y CRF11\_cpx, al igual que muestra la bibliografía (Shafer *et al.*, 2007).

La mutación **V82I** aparece en más de un 50% de pacientes naïve infectados por **subtipo G** según algunos estudios (Kantor y Katzenstein, 2003). Holguin y colaboradores (2002) también encuentran esta mutación en un 17,5% de los pacientes infectados por subtipos no-B, todos ellos subtipo G. En nuestra población el polimorfismo V82I fue detectado en un 81,8% de los pacientes infectados por subtipo G.

El cambio **L89M** es característico de todos los subtipos no-B, hecho que hemos corroborado en nuestro estudio. Según algunos autores la presencia de esta mutación favorece de modo preferente la selección en estos subtipos de la mutación L90M, asociada con resistencia a nelfinavir (Calazans *et al.*, 2005). Se ha comprobado que pacientes en fracaso con este fármaco infectados por subtipos C, G y CRF01\_AE presentan más frecuentemente la mutación L90M que la D30N (Kantor y Katzenstein, 2003; Holguin *et al.*, 2004). En el subtipo B el nelfinavir selecciona principalmente la mutación D30N, mientras que en los subtipos no-B el cambio L89M podría generar una barrera genética superior para la selección de la D30N (Mascolini, 2005). La mutación **M89I/V** se ha propuesto como una posible mutación propia de los subtipos C, F y G y se ha descrito su presencia probablemente asociada con otros cambios en la proteasa (Abecasis *et al.*, 2005; Kantor, 2006).

Por último, la mutación **I93L** se ha relacionado fundamentalmente con el subtipo C (Shafer *et al.*, 2007), hecho que hemos podido comprobar en nuestra población, ya que los 4 casos estudiados de subtipo C presentaban este cambio.

Algunos autores han comunicado que no hay diferencia en la frecuencia o distribución de mutaciones entre pacientes infectados por **subtipos** no-B puros y aquellos infectados con cepas **recombinantes** (Kantor y Katzenstein, 2004). En nuestra serie el reducido tamaño de muestra (n=88) no nos permitió comprobar este hecho, al igual que les sucede a otros autores (Montes *et al.*, 2004).

Para presentar una respuesta reducida o falta de respuesta total a un determinado fármaco se requiere la presencia de un número de mutaciones, que marcan las reglas de interpretación (ANRS, 2006). Este número de mutaciones requeridas para el desarrollo de resistencia es lo que se conoce como barrera genética. Debido a la gran diversidad genética entre los subtipos de VIH, cada subtipo en particular puede presentar diferentes barreras genéticas de resistencia. La presencia de un determinado número de polimorfismos en el gen de la proteasa en los subtipos no-B *wild-type* puede influir en la barrera genética de resistencia. En nuestro trabajo comparamos la barrera genética entre subtipo B y subtipos no-B utilizando para ello los datos de las secuencias obtenidas de pacientes naïve. Debido a las diferencias encontradas en la prevalencia de polimorfismos en el gen de la proteasa entre los subtipos, observamos, al igual que otros autores (van de Vijver *et al.*, 2006), que la resistencia a IPs podía verse favorecida en los subtipos no-B al considerar las reglas desarrolladas para subtipos B. Al igual que en otros trabajos (Vandamme *et al.*, 2005), pudimos observar cómo determinados subtipos que presentaban polimorfismos en el gen de la proteasa tendrían una **menor barrera genética** según los criterios de la ANRS desarrollados en base a subtipos B. De forma natural los subtipos no-B presentan algunos de los cambios incluidos en las reglas y, por tanto, necesitan acumular menos mutaciones para hacerse resistentes.

Todos los pacientes naïve infectados por **subtipos no-B** presentaron al menos un polimorfismo en el gen de la proteasa, de manera análoga a lo expresado por otros investigadores (Holguin *et al.*, 2002; Mascolini, 2005). En nuestra serie se detectaron **3 o más polimorfismos** en el 98,5% de los pacientes, mientras que Holguin y colaboradores (2002) únicamente lo hallaron en el 52,6% de sus pacientes. Esta diferencia es debida a que estos autores no incluyeron en su análisis los cambios en las posiciones 13, 35, 41, 69 y 89 de la proteasa, que pudimos comprobar que estaban presentes en un alto porcentaje de nuestros pacientes infectados por subtipos no-B. Por el contrario, nuestros subtipos no-B apenas presentaron mutaciones mayores en el gen de la proteasa; D30N (0%), M46I/L (7,7%), I47A (0%), G48V (0%), I50V/L (0%), V82A/F/S/T (1,5%), I84A/V (1,5%), N88D/S

(1,5%) y L90M (3,1%). Estos resultados son semejantes a los mostrados por otros autores (Holguin *et al.*, 2002). Por esta razón, la actividad de fármacos como indinavir y nelfinavir, que se hacen fácilmente resistentes por presentar una sola de estas mutaciones, no se vería tan afectada por la presencia natural de polimorfismos.

Comprobamos que, para todos los fármacos estudiados, el número de mutaciones marcado por el *score* para desarrollar resistencia se alcanzaría más fácilmente en el caso de infecciones causadas por subtipos no-B, hecho especialmente destacable para tipranavir. Hasta un 98,5% de los pacientes naïve a IPs infectados por subtipos no-B presentaron al menos 1 de las 8 mutaciones requeridas para el desarrollo de resistencia a tipranavir/ritonavir, un 65,2% hasta 3 de dichas mutaciones y un 21,2% 4 mutaciones. Estos últimos pacientes, presentarían de manera natural una posible resistencia a tipranavir según las reglas de la ANRS.

En general, no está claro si la presencia de polimorfismos reduce la **actividad** de los IPs o si se trata simplemente de una evolución diferente en el desarrollo de mutaciones en los distintos subtipos (Kantor *et al.*, 2005; Mascolini, 2005; Holguin *et al.*, 2006). Considerando las reglas actuales definiríamos una actividad para los distintos IPs que ha sido realmente determinada en base a estudios realizados fundamentalmente con cepas de subtipo B. A la luz de nuestros resultados y la bibliografía revisada, podemos afirmar que es necesario, por tanto, el desarrollo de algoritmos de interpretación de resistencia específicos para subtipos no-B. Habrá que ver el impacto real de la presencia de estos polimorfismos *in vitro* e *in vivo* y desarrollar nuevos algoritmos de interpretación considerando los datos de respuesta clínica y virológica de los subtipos no-B. Las diferencias genéticas entre subtipos pueden ser críticas para el manejo clínico de pacientes de regiones en las que predominan las infecciones causadas por subtipos no-B. Debido a la emergencia de subtipos no-B en nuestro medio como consecuencia de la inmigración, comprobamos esta necesidad de revisión de las reglas de interpretación. Cada vez más en los países desarrollados las decisiones terapéuticas se realizan en base a los resultados de estas reglas, hecho que puede influir en las terapias de inicio y rescate de subtipos no-B. Además, para pacientes de países en vías de desarrollo, en los que existe un claro predominio de estos subtipos, el conocimiento profundo de estos agentes puede resultar particularmente beneficioso.

Para llevar esto a cabo es necesaria una colaboración internacional y, de esta manera, disponer de la máxima información posible relacionada con la infección por subtipos no-B, como han comentado otros autores (Baxter *et al.*, 2006).



## **6. CONCLUSIONES**





1. En todos los scores de interpretación de resistencia a ITIANs incluimos las TAMs de la ruta 1. La variante incluida de la posición 215 del gen de la transcriptasa inversa fue en todos los casos la T215Y, ya que esta variante era siempre la relacionada con el efecto sobre la respuesta. La TAM K70R, de la ruta 2, aparece únicamente en el score de interpretación de didanosina, con efecto favorable sobre la respuesta virológica.
2. La mutación M184VI estaba incluida en todos nuestros scores de ITIANs, presentando un efecto favorable sobre la respuesta virológica a tenofovir, didanosina y estavudina.
3. Para los IPs estudiados hubo concordancia con las reglas publicadas en relación a las mutaciones mayores L10F/I/R/V, I54M/L/T/V, V82A/F/S/T, I84V y L90M. Con respecto a otras mutaciones en posiciones adicionales en el gen de la proteasa encontramos más discrepancias entre nuestros scores y los publicados, lo que es reflejo de la distinta prevalencia local.
4. Nuestros scores fueron definidos tras la realización de un análisis multivariante en el que se estudió su efecto sobre la respuesta virológica en presencia de otros factores que también influyen en ella. Resultaron ser predictores significativos de menor respuesta independientemente del efecto de otras variables.
5. En nuestra población predomina la infección por el subtipo B de VIH-1 y sólo el 8,1% de las infecciones están causadas por subtipos no-B, aunque en los últimos años se ha observado un incremento significativo en la incidencia de estos subtipos.



6. En nuestro estudio se encontraron diez variantes distintas de subtipos no-B, siendo CRF02\_AG, CRF01\_AE y el subtipo G las formas predominantes.
  
7. La procedencia geográfica más frecuente de los pacientes infectados por subtipos no-B fue África destacando Guinea-Bissau, Nigeria y Senegal como principales países de origen. La procedencia geográfica más frecuente de los pacientes infectados por subtipos B fue España y otros países de la Europa comunitaria.
  
8. Los cambios en el gen de la proteasa L10V, I13V, G16E, K20I, K20M, K20R, E35D, M36I, R41K, K43T, D60E, H69K, V82I, V82A, L89M e I93L son polimorfismos naturales específicos de subtipos no-B.
  
9. Los polimorfismos más frecuentes en subtipos no-B fueron M36I, seguido de H69K y L89M, característicos de todos los subtipos no-B. Los polimorfismos K20I y V82I se pueden considerar como marcadores específicos de subtipos G y CRF02\_AG o subtipo G, respectivamente.
  
10. De forma natural, los subtipos no-B de nuestro estudio presentan cambios en el gen de la proteasa incluidos en las reglas de interpretación genotípica desarrolladas en base a subtipos B. La presencia de un determinado número de polimorfismos naturales en el gen de la proteasa en estos subtipos puede disminuir la barrera genética de resistencia a IPs, necesitando acumular menos mutaciones para adquirir resistencia.



11. Los subtipos no-B estudiados apenas presentaron mutaciones mayores en el gen de la proteasa. Todos los pacientes naïve infectados por subtipos no-B presentaron al menos un polimorfismo en el gen de la proteasa. En nuestra serie se detectaron 3 o más polimorfismos en un alto porcentaje de los pacientes, hecho especialmente relevante para tipranavir.
  
12. Es necesario el desarrollo de algoritmos de interpretación de resistencia específicos para subtipos no-B, considerando los datos de respuesta clínica y virológica de estos subtipos para poder comprobar si la presencia de polimorfismos reduce la actividad de los IPs.



## **7. BIBLIOGRAFÍA**





- Abecasis, A. B., Deforche, K., Snoeck, J., Bacheler, L. T., McKenna, P., Carvalho, A. P., Gomes, P., Camacho, R. J., Vandamme, A. M. (2005). Protease mutation M89I/V is linked to therapy failure in patients infected with the HIV-1 non-B subtypes C, F or G. *Aids*; 19(16): 1799-1806.
- Aghokeng, A. F., Ewane, L., Awazi, B., Nanfack, A., Delaporte, E., Peeters, M., Zekeng, L. (2004). Evaluation of Four Simple/Rapid Assays and Two Fourth-Generation ELISAs for the Identification of HIV Infection on a Serum Panel Representing the HIV-1 Group M Genetic Diversity in Cameroon. *J Acquir Immune Defic Syndr*; 37(5): 1632-1640.
- Alaeus, A., Lidman, K., Sonnerborg, A., Albert, J. (1997). Subtype-specific problems with quantification of plasma HIV-1 RNA. *Aids*; 11(7): 859-865.
- Alcamí, J. (2004). Avances en la inmunopatología de la infección por el VIH. *Enferm Infecc Microbiol Clin*; 22 (8): 486-496.
- Álvarez, M. (2002). Nuevos subtipos del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) en Andalucía Oriental. Prevalencia de mutaciones de resistencia y su relación con la eficacia del tratamiento antirretroviral (Tesis Doctoral). *Departamento Microbiología*. Granada, Universidad de Granada.
- Álvarez, M., Garcia, F., Martinez, N. M., Hernandez Quero, J., Louwagie, J., De Brauwer, A., Maroto, M. C. (2004). Retrospective analysis of antiretroviral HIV treatment success based on medical history or guided by the reverse hybridisation LiPA HIV genotyping system. *J Med Virol*; 73(2): 151-157.
- Allen, T. M., Altfeld, M. (2003). HIV-1 superinfection. *J Allergy Clin Immunol*; 112(5): 829-835.
- ANRS (2005). HIV-1 genotypic drug resistance interpretation's algorithms. French ANRS (National Agency for AIDS Research). <http://www.hivfrenchresistance.org>.
- ANRS (2006). HIV-1 genotypic drug resistance interpretation's algorithms. French ANRS (National Agency for AIDS Research). <http://www.hivfrenchresistance.org>.
- Antela, A. (2006a). Eficacia clínica de tipranavir. *Enferm Infecc Microbiol Clin, Monogr*, 5(2): 5-9.
- Antela, A. (2006b). Hacia la simplificación del tratamiento antirretroviral. Papel de abacavir y lamivudina. *Enferm Infecc Microbiol Clin, Monogr*, 5(1): 38-42.
- Antela, A., Moreno, S., Casado, J. (2004). Abacavir. En: J. Guardiola y V. Soriano (eds.). *Tratamiento de la infección por VIH-Sida. Fármacos y combinaciones*. Barcelona, Publicaciones Permanyer: 63-76.
- Antinori, A., Trotta, M., Nasta, P., Bini, T., Bonora, S., Castagna, A., Quirino, T., Landonio, S. M., S., Tozzi, V., Zaccarelli, M., Di Perri, G., Andreoni, M., Perno, C., Carosi, G. (2005). *Type-1 Thymidine-associated mutations (TAMs) but not K65R mutation play a role in determining virological failure to combined rescue therapy with tenofovir and stavudine*. 12th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections., Boston, Massachusetts.
- Arien, K. K., Abraha, A., Quinones-Mateu, M. E., Kestens, L., Vanham, G., Arts, E. J. (2005). The replicative fitness of primary human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) group M, HIV-1 group O, and HIV-2 isolates. *J Virol*; 79(14): 8979-8990.
- Arnedo, M., Pumarola, T. (2005). Resistencia al fosamprenavir. Significado clínico. En: J. M. Gatell, J. Mensa y L. Zamora (eds.). *Fosamprenavir. Una prodroga con mejor biodisponibilidad*. Sabadell, Ediciones Antares: 129-173.
- Arrizabalaga, J., Camino, X., Iribarren, J. A., Rodríguez, F. J. (2004). Mecanismo de acción, sensibilidad y resistencias de enfuvirtida. *Enferm Infecc Microbiol Clin*; 3(1): 7-11.
- Ayoub, A., Mauciere, P., Martin, P. M., Cunin, P., Mfoupouendoun, J., Njinku, B., Souquieres, S., Simon, F. (2001). HIV-1 group O infection in Cameroon, 1986 to 1998. *Emerg Infect Dis*; 7(3): 466-467.
- Badri, S. M., Adeyemi, O. M., Max, B. E., Zagorski, B. M., Barker, D. E. (2003). How does expert advice impact genotypic resistance testing in clinical practice? *Clin Infect Dis*; 37(5): 708-713.
- Baltimore, D. (1970). Viral RNA dependent DNA polymerase. *Nature*; 226: 1211-1213.
- Barlow, K. L., Green, J., Clewley, J. P. (2000). Viral genome characterisation by the heteroduplex mobility and heteroduplex tracking assays. *Rev Med Virol*; 10(5): 321-335.
- Barré-Sinoussi, F., Cherman, J. C., Rey, F., Nugeyre, M. T., Chamaret, S., Gruest, J., Dauguet, C., Axler-Blin, C., Brun-Vézinet, F., Rouzioux, C., Rozenbaum, W., Montagnier, L. (1983). Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). *Science*; 220: 868-871.

- Barreiro, P., De Mendoza, C. (2006). Aspectos básicos y clínicos de la resistencia a lamivudina y abacavir. Posibilidades de secuenciación de análogos de los nucleósidos/nucleótidos. *Enferm Infecc Microbiol Clin, Monogr.*; 5(1): 30-37.
- Barreiro, P., Soriano, V. (2004). Nevirapina. En: J. Guardiola y V. Soriano (eds.). *Tratamiento de la infección por VIH-Sida. Fármacos y combinaciones*. Barcelona, Publicaciones Permanyer: 89-104.
- Baxter, J. D., Merigan, T. C., Wentworth, D. N., Neaton, J. D., Hoover, M. L., Hoetelmans, R. M., Piscitelli, S. C., Verbiest, W. H., Mayers, D. L. (2002). Both baseline HIV-1 drug resistance and antiretroviral drug levels are associated with short-term virologic responses to salvage therapy. *Aids*; 16(8): 1131-1138.
- Baxter, J. D., Schapiro, J. M., Boucher, C. A., Kohlbrenner, V. M., Hall, D. B., Scherer, J. R., Mayers, D. L. (2006). Genotypic changes in human immunodeficiency virus type 1 protease associated with reduced susceptibility and virologic response to the protease inhibitor tipranavir. *J Virol*; 80(21): 10794-10801.
- Beerenwinkel, N., Sing, T., Lengauer, T., Rahnenfuhrer, J., Roomp, K., Savenkov, I., Fischer, R., Hoffmann, D., Selbig, J., Korn, K., Walter, H., Berg, T., Braun, P., Fatkenheuer, G., Oette, M., Rockstroh, J., Kupfer, B., Kaiser, R., Daumer, M. (2005). Computational methods for the design of effective therapies against drug resistant HIV strains. *Bioinformatics*; 21(21): 3943-3950.
- Bermejo, M., Martín-Serrano, J., Oberlin, E., Pedraza, M. A. (1998). Activation of blood T lymphocytes down-regulates CXCR4 expression and interferes with propagation of X4 HIV strains. *European Journal Immunology*; 28: 3192-3204.
- Blanco, J., Biglia, A., Arnedo, M., de Lazzari, E., Mallolas, J., Martínez, E., Lonca, M., Laguno, M., Larrosse, M., Leon, A., Milinkovic, A., García, F., Miro, J., Arnaiz, J., Pumarola, T., Gatell, J. (2005). Relation between the antiretroviral activity of didanosine (ddI) and the number of reverse transcriptase (RT) mutations: DINAM study. *Antivir Ther*; 10(Suppl 1): S26.
- Blanco, J., Teniente, E., Mallolas, J., Martínez, E., Lonca, M., Laguno, M., Larrousse, M., Leon, A., Milinkovic, A., Pumarola, T., Gatell, J. (2006a). Relation between antiretroviral activity of stavudine (d4T) and the number of reverse transcriptase (RT) mutations: ZENAM study. 15th International HIV Drug Resistance Workshop, Sitges, España.
- Blanco, J. L., Biglia, A., De Lazzari, E., Mallolas, J., Martinez, E., Pumarola, T., Larrousse, M., Milinkovic, A., Leon, A., Lonca, M., Laguno, M., Gatell, J. M. (2006b). Antiretroviral activity of didanosine in patients with different clusters of reverse transcriptase mutations. *Aids*; 20(14): 1891-1892.
- Bocket, L., Yazdanpanah, Y., Ajana, F., Gerard, Y., Viget, N., Goffard, A., Alcaraz, I., Wattre, P., Mouton, Y. (2004). Thymidine analogue mutations in antiretroviral-naïve HIV-1 patients on triple therapy including either zidovudine or stavudine. *J Antimicrob Chemother*; 53(1): 89-94.
- Bongertz, V., Bou-Habib, D. C., Brigido, L. F., Caseiro, M., Chequer, P. J., Couto-Fernandez, J. C., Ferreira, P. C., Galvao-Castro, B., Greco, D., Guimaraes, M. L., Linhares de Carvalho, M. I., Morgado, M. G., Oliveira, C. A., Osmanov, S., Ramos, C. A., Rossini, M., Sabino, E., Tanuri, A., Ueda, M. (2000). HIV-1 diversity in Brazil: genetic, biologic, and immunologic characterization of HIV-1 strains in three potential HIV vaccine evaluation sites. Brazilian Network for HIV Isolation and Characterization. *J Acquir Immune Defic Syndr*; 23(2): 184-193.
- Bonjoch, A., Clotet, B. (2004). Enfuvirtida. En: J. Guardiola y V. Soriano (eds.). *Tratamiento de la infección por VIH-Sida. Fármacos y combinaciones*. Barcelona, Publicaciones Permanyer: 223-238.
- Boulme, R., Halfon, P., Diaz, R., Dugas, O., Schmit, J. (2001). Comparative evaluation between five automated resistance interpretation algorithms *Antivir Ther* 6(Suppl 1): 121.
- Boyer, P. L., Sarafianos, S. G., Arnold, E., Hughes, S. H. (2002). The M184V mutation reduces the selective excision of zidovudine 5'-monophosphate (AZTMP) by the reverse transcriptase of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol*; 76(7): 3248-3256.
- Braun, J., Plantier, J. C., Hellot, M. F., Tuailon, E., Gueudin, M., Damond, F., Malmsten, A., Corrigan, G. E., Simon, F. (2003). A new quantitative HIV load assay based on plasma

- virion reverse transcriptase activity for the different types, groups and subtypes. *Aids*; 17(3): 331-336.
- Briones, C.** (2005a). Genética en virología. En: V. Soriano y J. González-Lahoz (eds.). *VI Curso de Biología Molecular para Clínicos*. Barcelona, Publicaciones Permanyer: 1-14.
- Briones, C.** (2005b). Virología Humana. En: V. Soriano y J. González-Lahoz (eds.). *VI Curso de Biología Molecular para Clínicos*. Barcelona, Publicaciones Permanyer: 15-30.
- Brun-Vezinet, F., Costagliola, D., Khaled, M. A., Calvez, V., Clavel, F., Clotet, B., Haubrich, R., Kempf, D., King, M., Kuritzkes, D., Lanier, R., Miller, M., Miller, V., Phillips, A., Pillay, D., Schapiro, J., Scott, J., Shafer, R., Zazzi, M., Zolopa, A., DeGruttola, V.** (2004). Clinically validated genotype analysis: guiding principles and statistical concerns. *Antivir Ther*, 9(4): 465-478.
- Brun-Vezinet, F., Descamps, D., Ruffault, A., Masquelier, B., Calvez, V., Peytavin, G., Telles, F., Morand-Joubert, L., Meynard, J. L., Vray, M., Costagliola, D.** (2003). Clinically relevant interpretation of genotype for resistance to abacavir. *Aids*; 17(12): 1795-1802.
- Cabrera, C., Clotet, B.** (2006). Tests de resistencia genotípica en pacientes con fracaso terapéutico. *Enferm Infecc Microbiol Clin*; 24(4): 219-221.
- Cabrera, C., Cozzi-Lepri, A., Phillips, A. N., Loveday, C., Kirk, O., Ait-Khaled, M., Reiss, P., Kjaer, J., Ledergerber, B., Lundgren, J. D., Clotet, B., Ruiz, L.** (2004). Baseline resistance and virological outcome in patients with virological failure who start a regimen containing abacavir: EuroSIDA study. *Antivir Ther*, 9(5): 787-800.
- Calazans, A., Brindeiro, R., Brindeiro, P., Verli, H., Arruda, M. B., Gonzalez, L. M., Guimaraes, J. A., Diaz, R. S., Antunes, O. A., Tanuri, A.** (2005). Low accumulation of L90M in protease from subtype F HIV-1 with resistance to protease inhibitors is caused by the L89M polymorphism. *J Infect Dis*; 191(11): 1961-1970.
- Calvez, V., Cohen-Codar, I., Marcelin, A., Descamps, D., Talamet, C., Ritter, J., Segondy, M., Peigue-Lafeuille, H., Brun-Vezinet, F., Guillevic, E., Isaacson, J., Rode, R., Bernstein, B., Sun, E., Kempf, D., Chauvin, J.** (2001). Identification of individual mutations in HIV protease associated with virological response to lopinavir/ritonavir therapy. *Antivir Ther*, 6: S1.
- Calvez, V., Costagliola, D., Descamps, D., Yvon, A., Collin, G., Cecile, A., Delaugerre, C., Damond, F., Marcelin, A. G., Matheron, S., Simon, A., Valantin, M. A., Katlama, C., Brun-Vezinet, F.** (2002). Impact of stavudine phenotype and thymidine analogues mutations on viral response to stavudine plus lamivudine in ALTIS 2 ANRS trial. *Antivir Ther*, 7(3): 211-218.
- Capdepont, S., Aurillac-Lavignolle, V., Faure, M., Dupon, M., Morlat, P., Ragnaud, J. M., Chene, G., Fleury, H., Masquelier, B.** (2006). An additive/subtractive genotypic score as a determinant of the virological response to didanosine in HIV-1 infected patients. *J Clin Virol*; 36(1): 36-42.
- Carlos, S., Chueca, N., Álvarez, M., García, F.** (2006). Resistencias del VIH. *JANO*(1604): 63-67.
- Carrion, G., Hierholzer, J., Montano, S., Alava, A., Perez, J., Guevara, A., Laguna-Torres, V., Mosquera, C., Russell, K., Chauca, G., Kochel, T., Birx, D. L., Sanchez, J. L., Carr, J. K.** (2003). Circulating recombinant form CRF02\_AG in South America. *AIDS Res Hum Retroviruses*; 19(4): 329-332.
- Casado, G., Thomson, M. M., Delgado, E., Sierra, M., Vazquez-De Parga, E., Perez-Alvarez, L., Ocampo, A., Najera, R.** (2003). Near full-length genome characterization of an HIV type 1 CRF05\_DF virus from Spain. *AIDS Res Hum Retroviruses*; 19(8): 719-725.
- Casado, J.** (2006). Uso secuencial de análogos de los nucleósidos. Claves para el éxito a largo plazo. *Enferm Infecc Microbiol Clin, Monogr*; 5(4): 39-44.
- Castilla, J., Lorenzo, J., Moreno-Iribas, C., Zulaika, D.** (2006). ¿Hacia dónde evoluciona la epidemia del VIH y SIDA en España? *JANO*(1604): 39-46.
- Cilveti-Sánchez, U., Arenere Mendoza, M., Navarro Aznárez, H., Rabanaque Hernández, M., Allende-Bandrés, M., Mendaza Beltrán, M.** (2005). Estudio de la efectividad, supervivencia y seguridad de las terapias antirretrovirales de inicio en pacientes VIH+. *Farm Hosp*; 29: 323-330.
- Clavel, F., Guetard, D., Brun-Vézinet, F., Chamaret, S., Rey, M. A., Santos-Ferreira, M. O., Laurent, A. G., Daughet, C., Katlama, C., Rouzioux, C.** (1986). Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science*; 223: 343-346.
- Clavel, F., Hance, A. J.** (2004). HIV drug resistance. *N Engl J Med*; 350(10): 1023-1035.

- Clavel, F., Pomerantz, R. J. (2002). AIDS 2002. Virology: overview. *Aids*; 16 Suppl 4: S1-2.
- Connor, R. I., Sheridan, K. E., Ceradini, D., Choe, S., Landau, N. R. (1997). Change in co-receptor use correlates with disease progression in HIV-1 infected individuals. *Journal of experimental medicine*; 185: 621-628.
- Costagliola, D., Cozzi-Lepri, A., Assoumou, K., Cheng, B. (2006). Initiatives for developing and comparing genotype interpretation systems: an updated analysis of validation of existing rules-based algorithm for abacavir and ddI evaluated on virological response. *Antiviral Therapy*, 11: S94.
- Cozzi-Lepri, A., Ruiz, L., Loveday, C., Phillips, A. N., Clotet, B., Reiss, P., Ledergerber, B., Holkmann, C., Staszewski, S., Lundgren, J. D. (2005). Thymidine analogue mutation profiles: factors associated with acquiring specific profiles and their impact on the virological response to therapy. *Antivir Ther*, 10(7): 791-802.
- Cuevas, M. T., Ruibal, I., Villahermosa, M. L., Diaz, H., Delgado, E., Parga, E. V., Perez-Alvarez, L., de Armas, M. B., Cuevas, L., Medrano, L., Noa, E., Osmanov, S., Najera, R., Thomson, M. M. (2002). High HIV-1 genetic diversity in Cuba. *Aids*; 16(12): 1643-1653.
- Chantret, M., Chapplain, J., Kerryguy, N., Guist'hau, O., Gicquel, J., Arvieux, C., Michelet, C., Ruffault, A. (2002). Comparison of different lopinavir/ritonavir resistance algorithms. *Antivir Ther*, 7: S93.
- Dalmau-Juanola, D. (2006). Farmacocinética y desarrollo de tipranavir. *Enferm Infecc Microbiol Clin, Monogr*, 5(2): 2-4.
- Dalmau, D. (2004). Amprenavir. En: J. Guardiola y V. Soriano (eds.). *Tratamiento de la infección por VIH-Sida. Fármacos y combinaciones*. Barcelona, Publicaciones Permanyer: 187-202.
- Damond, F., Apetrei, C., Descamps, D., Brun-Vezinet, F., Simon, F. (1999). HIV-1 subtypes and plasma RNA quantification. *Aids*; 13(2): 286-288.
- Davison, D., Medinas, R., Mosier, S., Bowling, T., Delmedico, M. (2006). New fusion inhibitor peptides, TRI-999 and TRI-1144, are potent inhibitors of enfuvirtide and T-1249 resistant isolates. XVI International AIDS Conference. Toronto, Canada.
- De Luca, A., Cingolani, A., Di Giambenedetto, S., Trotta, M. P., Baldini, F., Rizzo, M. G., Bertoli, A., Liuzzi, G., Narciso, P., Murri, R., Ammassari, A., Perno, C. F., Antinori, A. (2003). Variable prediction of antiretroviral treatment outcome by different systems for interpreting genotypic human immunodeficiency virus type 1 drug resistance. *J Infect Dis*; 187(12): 1934-1943.
- De Luca, A., Perno, C. F. (2003). Impact of different HIV resistance interpretation by distinct systems on clinical utility of resistance testing. *Curr Opin Infect Dis*; 16(6): 573-580.
- De Luca, A., Vendittelli, M., Baldini, F., Di Giambenedetto, S., Trotta, M. P., Cingolani, A., Bacarelli, A., Gori, C., Perno, C. F., Antinori, A., Ulivi, G. (2004). Construction, training and clinical validation of an interpretation system for genotypic HIV-1 drug resistance based on fuzzy rules revised by virological outcomes. *Antivir Ther*, 9(4): 583-593.
- de Mendoza, C., Gallego, O., Soriano, V. (2002). Mechanisms of resistance to antiretroviral drugs--clinical implications. *AIDS Rev*, 4(2): 64-82.
- de Mendoza, C., Rodriguez, C., Colomina, J., Tuset, C., Garcia, F., Eiros, J. M., Corral, A., Leiva, P., Agüero, J., Torre-Cisneros, J., Pedreira, J., Viciano, I., del Romero, J., Saez, A., Ortiz de Lejarazu, R., Soriano, V. (2005). Resistance to nonnucleoside reverse-transcriptase inhibitors and prevalence of HIV type 1 non-B subtypes are increasing among persons with recent infection in Spain. *Clin Infect Dis*; 41(9): 1350-1354.
- de Mendoza, C., Soriano, V. (2004). Resistencia del VIH a los antirretrovirales. En: J. M. Guardiola y V. Soriano (eds.). *Tratamiento de la infección VIH-SIDA. Fármacos y combinaciones*. Barcelona, Permanyer: 261-277.
- de Mendoza, C., Valer, L., Bachelier, L., Pattery, T., Corral, A., Soriano, V. (2006). Prevalence of the HIV-1 protease mutation I47A in clinical practice and association with lopinavir resistance. *Aids*; 20(7): 1071-1074.
- DeGruttola, V., Dix, L., D'Aquila, R., Holder, D., Phillips, A., Ait-Khaled, M., Baxter, J., Clevenbergh, P., Hammer, S., Harrigan, R., Katzenstein, D., Lanier, R., Miller, M., Para, M., Yerly, S., Zolopa, A., Murray, J., Patick, A., Miller, V., Castillo, S., Pedneault, L., Mellors, J. (2000). The relation between baseline HIV drug resistance

- and response to antiretroviral therapy: re-analysis of retrospective and prospective studies using a standardized data analysis plan. *Antivir Ther*, 5(1): 41-48.
- Delgado, R., Regueiro, B. J.** (2005). El futuro en la infección por VIH: terapia génica y ARN de interferencia. *Enferm Infecc Microbiol Clin*; 23(Supl.2): 68-75.
- Descamps, D., Masquelier, B., Marnier, J. P., Calvez, V., Ruffault, A., Telles, F., Goetschel, A., P.M., G., Brun-Vézinet, F., Costagliola, D.** (2001). A genotypic sensitivity score for amprenavir based on genotype at baseline and virological response. *Antiviral Therapy*; 6 (Suppl.1): 103.
- DHHS** (2006). DHHS Treatment Guidelines Updated: October 2006. U.S. Department of Health and Human Services (DHHS) Panel on Antiretroviral Guidelines for Adults and Adolescents - A working group of the Office of AIDS Research Advisory Council (OARAC).
- Diallo, K., Gotte, M., Wainberg, M. A.** (2003). Molecular impact of the M184V mutation in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *Antimicrob Agents Chemother*; 47(11): 3377-3383.
- Elharti, E., Zidouh, A., Mengad, R., Bennani, O., Elaouad, R.** (2002). Monitoring HIV through sentinel surveillance in Morocco. *East Mediterr Health J*; 8(1): 141-149.
- Erali, M., Page, S., Reimer, L. G., Hillyard, D. R.** (2001). Human immunodeficiency virus type 1 drug resistance testing: a comparison of three sequence-based methods. *J Clin Microbiol*; 39(6): 2157-2165.
- Esteves, A., Parreira, R., Venenno, T., Franco, M., Piedade, J., Germano De Sousa, J., Canas-Ferreira, W. F.** (2002). Molecular epidemiology of HIV type 1 infection in Portugal: high prevalence of non-B subtypes. *AIDS Res Hum Retroviruses*; 18(5): 313-325.
- Fang, G., Weiser, B., Kuiken, C., Philpott, S. M., Rowland-Jones, S., Plummer, F., Kimani, J., Shi, B., Kaul, R., Bwayo, J., Anzala, O., Burger, H.** (2004). Recombination following superinfection by HIV-1. *Aids*; 18(2): 153-159.
- Ferrer, E., Olmo, M., Podzamczer, D.** (2004). Efavirenz. En: J. Guardiola y V. Soriano (eds.). *Tratamiento de la infección por VIH-Sida. Fármacos y combinaciones*. Barcelona, Publicaciones Permanyer: 105-124.
- Flandre, P., Alcais, A., Descamps, D., Morand-Joubert, L., Joly, V.** (2004). Estimating and comparing reduction in HIV-1 RNA in clinical trials using methods for interval censored data. *J Acquir Immune Defic Syndr*; 35(3): 286-292.
- Flandre, P., Durier, C., Descamps, D., Launay, O., Joly, V.** (2002). On the use of magnitude of reduction in HIV-1 RNA in clinical trials: statistical analysis and potential biases. *J Acquir Immune Defic Syndr*; 30(1): 59-64.
- Flandre, P., Marcelin, A. G., Pavie, J., Shmidely, N., Wirden, M., Lada, O., Bernard, M. C., Molina, J. M., Calvez, V.** (2005). Comparison of tests and procedures to build clinically relevant genotypic scores: application to the Jaguar study. *Antivir Ther*; 10(4): 479-487.
- Fleury, H., Recordon-Pinson, P., Caumont, A., Faure, M., Roques, P., Plantier, J. C., Couturier, E., Dormont, D., Masquelier, B., Simon, F.** (2003). HIV type 1 diversity in France, 1999-2001: molecular characterization of non-B HIV type 1 subtypes and potential impact on susceptibility to antiretroviral drugs. *AIDS Res Hum Retroviruses*; 19(1): 41-47.
- Fonjungo, P. N., Mpoudi, E. N., Torimiro, J. N., Alemnji, G. A., Eno, L. T., Lyonga, E. J., Nkengasong, J. N., Lal, R. B., Rayfield, M., Kalish, M. L., Folks, T. M., Pieniazek, D.** (2002). Human immunodeficiency virus type 1 group m protease in cameroon: genetic diversity and protease inhibitor mutational features. *J Clin Microbiol*; 40(3): 837-845.
- Fontaine, E., Riva, C., Peeters, M., Schmit, J. C., Delaporte, E., Van Laethem, K., Van Vaerenbergh, K., Snoeck, J., Van Wijngaerden, E., De Clercq, E., Van Ranst, M., Vandamme, A. M.** (2001). Evaluation of two commercial kits for the detection of genotypic drug resistance on a panel of HIV type 1 subtypes A through J. *J Acquir Immune Defic Syndr*; 28(3): 254-258.
- Fortuny, C.** (2006). Tipranavir: un nuevo inhibidor de la proteasa para el tratamiento de la infección por el VIH pediátrica. *Enferm Infecc Microbiol Clin, Monogr*; 5(2): 10-14.
- Friend, J., Parkin, N., Liegler, T., Martin, J. N., Deeks, S. G.** (2004). Isolated lopinavir resistance after virological rebound of a ritonavir/lopinavir-based regimen. *Aids*; 18(14): 1965-1966.
- Gallant, J. E.** (2005). Antiretroviral drug resistance and resistance testing. *Top HIV Med*; 13(5): 138-142.

- Gallant, J. E., DeJesus, E., Arribas, J. R., Pozniak, A. L., Gazzard, B., Campo, R. E., Lu, B., McColl, D., Chuck, S., Enejosa, J., Toole, J. J., Cheng, A. K. (2006). Tenofovir DF, emtricitabine, and efavirenz vs. zidovudine, lamivudine, and efavirenz for HIV. *N Engl J Med*; 354(3): 251-260.
- Gallo, R. C., Sarin, P. S., Gelmann, E. P., Robert-Guroff, M., Richardson, E., Kalyanaraman, V. S., Mann, D., Sidhu, G. D., Stahl, R. E., Zolla-Pazner, S., Leibowitch, J., Popovic, M. (1983). Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*; 220(4599): 865-867.
- García-Deltoro, M. (2006). Resistencia a tipranavir. *Enferm Infecc Microbiol Clin, Monogr*; 5(2): 22-28.
- García-Lerma, G., Gutierrez, M., Mas, A., Bravo, R., Aguilera, O., Soriano, V. (1996). Descripción de los dos primeros casos de infección por VIH-1 grupo O en España. *Med Clin (Barc)*; 107: 418-421.
- García-Lerma, G., MacInnes, H., Nidtha, S., Bennett, D., Weinstock, H., Heneine, W. (2002). In vitro selection of the T215Y and K65R mutations by stavudine and demonstration of high-level resistance to stavudine. *Antivir Ther*; 7: S28.
- García, F., Aguilera, A. (2005). Pruebas de resistencia. En: V. Soriano (eds.). *Resistencias a los antirretrovirales 2005*. Barcelona, Publicaciones Permanyer: 35-46.
- García, F., Palomares, J. C., Martínez, N. M., Alvarez, M., Suarez, S., Garcia, F., Rodriguez, J. M., Quero, J. H., del Carmen Maroto, M. (2003). Study of different systems for interpreting results of genotypic antiretroviral drug resistance tests. *Antivir Ther*, 8(3): 251-252.
- García, J., Sánchez-Palomino, S., González, N., Pérez-Olmeda, M., Alcamí, J. (2005). Ensayos con virus recombinantes. En: V. Soriano y J. González-Lahoz (eds.). *VI Curso de Biología Molecular para Clínicos*. Barcelona, Publicaciones Permanyer: 115-132.
- Gascón, J. (2003). Enfermedades infecciosas e inmigración. *Enferm Infecc Microbiol Clin*; 21(10): 535-539.
- Geretti, A. M. (2006). HIV-1 subtypes: epidemiology and significance for HIV management. *Curr Opin Infect Dis*; 19(1): 1-7.
- Gilbert, P. B., McKeague, I. W., Eisen, G., Mullins, C., Gueye, N. A., Mboup, S., Kanki, P. J. (2003). Comparison of HIV-1 and HIV-2 infectivity from a prospective cohort study in Senegal. *Stat Med*; 22(4): 573-593.
- González, J. (2004). Inhibidores de la fusión: un nuevo concepto y una nueva familia de antirretrovirales hecha realidad. *Enferm Infecc Microbiol Clin, Monogr*; 3(1): 1.
- Gottlieb, G. S., Nickle, D. C., Jensen, M. A., Wong, K. G., Grobler, J., Li, F., Liu, S. L., Rademeyer, C., Learn, G. H., Karim, S. S., Williamson, C., Corey, L., Margolick, J. B., Mullins, J. I. (2004). Dual HIV-1 infection associated with rapid disease progression. *Lancet*; 363(9409): 619-622.
- Greene, W. C. (1991). The molecular biology of human immunodeficiency virus type 1 infection. *N Engl J Med*; 324(5): 308-317.
- Guardiola, J., Domingo, P., Ris, J. (2004). Lamivudina. En: J. Guardiola y V. Soriano (eds.). *Tratamiento de la infección por VIH-Sida. Fármacos y combinaciones*. Barcelona, Publicaciones Permanyer: 33-42.
- Hahn, B. H., Shaw, G. M., De Cock, K. M., Sharp, P. M. (2000). AIDS as a zoonosis: scientific and public health implications. *Science*; 287(5453): 607-614.
- Hammer, S. M., Saag, M. S., Schechter, M., Montaner, J. S., Schooley, R. T., Jacobsen, D. M., Thompson, M. A., Carpenter, C. C., Fischl, M. A., Gazzard, B. G., Gatell, J. M., Hirsch, M. S., Katzenstein, D. A., Richman, D. D., Vella, S., Yeni, P. G., Volberding, P. A. (2006). Treatment for adult HIV infection: 2006 recommendations of the International AIDS Society-USA panel. *Jama*; 296(7): 827-843.
- Handema, R., Terunuma, H., Kasolo, F., Kasai, H., Sichone, M., Yamashita, A., Deng, X., Mulundu, G., Ichiyama, K., Munkanta, M., Yokota, T., Wakasugi, N., Tezuka, F., Yamamoto, N., Ito, M. (2003). Prevalence of drug-resistance-associated mutations in antiretroviral drug-naive Zambians infected with subtype C HIV-1. *AIDS Res Hum Retroviruses*; 19(2): 151-160.
- Harris, B., von Truchsess, I., Schatzl, H. M., Devare, S. G., Hackett, J., Jr. (2005). Genomic characterization of a novel HIV type 1 B/G intersubtype recombinant strain from an injecting drug user in Germany. *AIDS Res Hum Retroviruses*; 21(7): 654-660.
- Haupts, S., Ledergerber, B., Boni, J., Schupbach, J., Kronenberg, A., Opravil, M., Flepp, M., Speck, R. F., Grube, C., Rentsch, K., Weber, R., Gunthard, H. F. (2003). Impact

- of genotypic resistance testing on selection of salvage regimen in clinical practice. *Antivir Ther*; 8(5): 443-454.
- Herring, B. L., Ge, Y. C., Wang, B., Ratnamohan, M., Zheng, F., Cunningham, A. L., Saksena, N. K., Dwyer, D. E. (2003). Segregation of human immunodeficiency virus type 1 subtypes by risk factor in Australia. *J Clin Microbiol*; 41(10): 4600-4604.
- Holguin, A. (2005). Subtipos del VIH. En: V. Soriano y J. González-Lahoz (eds.). *VI Curso de Biología Molecular para Clínicos*. Barcelona, P. Permanyer: 133-150.
- Holguin, A., Alvarez, A., Soriano, V. (2002). High prevalence of HIV-1 subtype G and natural polymorphisms at the protease gene among HIV-infected immigrants in Madrid. *Aids*; 16(8): 1163-1170.
- Holguin, A., Alvarez, A., Soriano, V. (2005). Heterogeneous nature of HIV-1 recombinants spreading in Spain. *J Med Virol*; 75(3): 374-380.
- Holguin, A., Aracil, B., Alvarez, A., Barros, C., Soriano, V. (2001). Prevalence of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) non-B subtypes in foreigners living in Madrid, Spain, and comparison of the performances of the AMPLICOR HIV-1 MONITOR version 1.0 and the new automated version 1.5. *J Clin Microbiol*; 39(5): 1850-1854.
- Holguin, A., de Mendoza, C., Soriano, V. (1999). Comparison of three different commercial methods for measuring plasma viraemia in patients infected with non-B HIV-1 subtypes. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*; 18(4): 256-259.
- Holguin, A., Hertogs, K., Soriano, V. (2003). Performance of drug resistance assays in testing HIV-1 non-B subtypes. *Clin Microbiol Infect*; 9(4): 323-326.
- Holguin, A., Paxinos, E., Hertogs, K., Womac, C., Soriano, V. (2004). Impact of frequent natural polymorphisms at the protease gene on the in vitro susceptibility to protease inhibitors in HIV-1 non-B subtypes. *J Clin Virol*; 31(3): 215-220.
- Holguin, A., Ramirez de Arellano, E., Rivas, P., Soriano, V. (2006). Efficacy of antiretroviral therapy in individuals infected with HIV-1 non-B subtypes. *AIDS Rev*; 8(2): 98-107.
- Hsu, L. Y., Subramaniam, R., Bachelier, L., Paton, N. I. (2005). Characterization of mutations in CRF01\_AE virus isolates from antiretroviral treatment-naive and -experienced patients in Singapore. *J Acquir Immune Defic Syndr*; 38(1): 5-13.
- ICTVdatabase (2006). 00.061. Retroviridae. *ICTVdb - The Universal Virus Database, version 4*. C. Büchen-Osmond. Nueva York (EEUU), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/>.
- Iribarren, J. A., Labarga, P., Rubio, R., Berenguer, J., Miro, J. M., Antela, A., Gonzalez, J., Moreno, S., Arrizabalaga, J., Chamorro, L., Clotet, B., Gatell, J. M., Lopez-Aldeguer, J., Martinez, E., Polo, R., Tuset, M., Viciano, P., Santamaria, J. M., Kindelan, J. M., Ribera, E., Segura, F. (2004). Recomendaciones de GESIDA/Plan Nacional sobre el Sida respecto al tratamiento antirretroviral en pacientes adultos infectados por el VIH. *Enferm Infecc Microbiol Clin*; 22(10): 564-642.
- Jagodzinski, L. L., Cooley, J. D., Weber, M., Michael, N. L. (2003). Performance characteristics of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) genotyping systems in sequence-based analysis of subtypes other than HIV-1 subtype B. *J Clin Microbiol*; 41(3): 998-1003.
- Jagodzinski, L. L., Wiggins, D. L., McManis, J. L., Emery, S., Overbaugh, J., Robb, M., Bodrug, S., Michael, N. L. (2000). Use of calibrated viral load standards for group M subtypes of human immunodeficiency virus type 1 to assess the performance of viral RNA quantitation tests. *J Clin Microbiol*; 38(3): 1247-1249.
- Jenny-Avital, E. R., Beatrice, S. T. (2001). Erroneously low or undetectable plasma human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) ribonucleic acid load, determined by polymerase chain reaction, in West African and American patients with non-B subtype HIV-1 infection. *Clin Infect Dis*; 32(8): 1227-1230.
- Johnson, V. A., Brun-Vezinet, F., Clotet, B., Conway, B., Kuritzkes, D. R., Pillay, D., Schapiro, J., Telenti, A., Richman, D. (2005a). Update of the Drug Resistance Mutations in HIV-1: 2005. *Top HIV Med*; 13(1): 51-57.
- Johnson, V. A., Brun-Vezinet, F., Clotet, B., Conway, B., Kuritzkes, D. R., Pillay, D., Schapiro, J. M., Telenti, A., Richman, D. D. (2005b). Update of the drug resistance mutations in HIV-1: Fall 2005. *Top HIV Med*; 13(4): 125-131.
- Johnson, V. A., Brun-Vezinet, F., Clotet, B., Kuritzkes, D. R., Pillay, D., Schapiro, J. M., Richman, D. D. (2006). Update of the Drug Resistance Mutations in HIV-1: Fall 2006. *Top HIV Med*; 14(3): 125-130.



- Joly, V., Flandre, P., Meiffredy, V., Brun-Vezinet, F., Gastaut, J. A., Goujard, C., Remy, G., Descamps, D., Ruffault, A., Certain, A., Aboulker, J. P., Yeni, P. (2002). Efficacy of zidovudine compared to stavudine, both in combination with lamivudine and indinavir, in human immunodeficiency virus-infected nucleoside-experienced patients with no prior exposure to lamivudine, stavudine, or protease inhibitors (novavir trial). *Antimicrob Agents Chemother*, 46(6): 1906-1913.
- Jonassen, T., Stene-Johansen, K., Berg, E. (1997). Sequence analysis of HIV-1 group O from Norwegian patients infected in the 1960s. *Virology*, 231: 43-47.
- Jordan, R., Gold, L., Cummins, C., Hyde, C. (2002). Systematic review and meta-analysis of evidence for increasing numbers of drugs in antiretroviral combination therapy. *BMJ*; 324(7340): 757.
- Kagan, R., Ross, L., Winters, M., Merigan, T., Heseltine, P., Lewinski, M. (2005). Adefovir-associated HIV-1 RT mutation K70E in the age of tenofovir. *Antivir Ther*, 10: S103.
- Kantor, R. (2006). Impact of HIV-1 pol diversity on drug resistance and its clinical implications. *Curr Opin Infect Dis*; 19(6): 594-606.
- Kantor, R., Katzenstein, D. (2003). Polymorphism in HIV-1 non-subtype B protease and reverse transcriptase and its potential impact on drug susceptibility and drug resistance evolution. *AIDS Rev*, 5(1): 25-35.
- Kantor, R., Katzenstein, D. (2004). Drug resistance in non-subtype B HIV-1. *J Clin Virol*; 29(3): 152-159.
- Kantor, R., Katzenstein, D. A., Efron, B., Carvalho, A. P., Wynhoven, B., Cane, P., Clarke, J., Sirivichayakul, S., Soares, M. A., Snoeck, J., Pillay, C., Rudich, H., Rodrigues, R., Holguin, A., Ariyoshi, K., Bouzas, M. B., Cahn, P., Sugiura, W., Soriano, V., Brigido, L. F., Grossman, Z., Morris, L., Vandamme, A. M., Tanuri, A., Phanuphak, P., Weber, J. N., Pillay, D., Harrigan, P. R., Camacho, R., Schapiro, J. M., Shafer, R. W. (2005). Impact of HIV-1 subtype and antiretroviral therapy on protease and reverse transcriptase genotype: results of a global collaboration. *PLoS Med*; 2(4): e112.
- Kellam, P., Larder, B. A. (1994). Recombinant virus assay: a rapid, phenotypic assay for assessment of drug susceptibility of human immunodeficiency virus type 1 isolates. *Antimicrob Agents Chemother*; 38(1): 23-30.
- Kempf, D. J., Isaacson, J. D., King, M. S., Brun, S. C., Sylte, J., Richards, B., Bernstein, B., Rode, R., Sun, E. (2002). Analysis of the virological response with respect to baseline viral phenotype and genotype in protease inhibitor-experienced HIV-1-infected patients receiving lopinavir/ritonavir therapy. *Antivir Ther*; 7(3): 165-174.
- Kempf, D. J., Isaacson, J. D., King, M. S., Brun, S. C., Xu, Y., Real, K., Bernstein, B. M., Japour, A. J., Sun, E., Rode, R. A. (2001). Identification of genotypic changes in human immunodeficiency virus protease that correlate with reduced susceptibility to the protease inhibitor lopinavir among viral isolates from protease inhibitor-experienced patients. *J Virol*; 75(16): 7462-7469.
- Kijak, G. H., Rubio, A. E., Pampuro, S. E., Zala, C., Cahn, P., Galli, R., Montaner, J. S., Salomon, H. (2003). Discrepant results in the interpretation of HIV-1 drug-resistance genotypic data among widely used algorithms. *HIV Med*; 4(1): 72-78.
- Koelsch, K. K., Smith, D. M., Little, S. J., Ignacio, C. C., Macaranas, T. R., Brown, A. J., Petropoulos, C. J., Richman, D. D., Wong, J. K. (2003). Clade B HIV-1 superinfection with wild-type virus after primary infection with drug-resistant clade B virus. *Aids*; 17(7): F11-16.
- Korber, B., Muldoon, M., Theiler, J., Gao, F., Gupta, R., Lapedes, A., Hahn, B. H., Wolinsky, S., Bhattacharya, T. (2000). Timing the ancestor of the HIV-1 pandemic strains. *Science*; 288(5472): 1789-1796.
- Labarga, P. (2004). Enfuvirtida: estructura, farmacocinética e interacciones. *Enferm Infecc Microbiol Clin*; 3(1): 2-6.
- Lafeuillade, A., Tardy, J. C. (2003). Stavudine in the face of cross-resistance between HIV-1 nucleoside reverse transcriptase inhibitors: a review. *AIDS Rev*, 5(2): 80-86.
- Lanier, E. R., Ait-Khaled, M., Scott, J., Stone, C., Melby, T., Sturge, G., St Clair, M., Steel, H., Hetherington, S., Pearce, G., Spreen, W., Lafon, S. (2004). Antiviral efficacy of abacavir in antiretroviral therapy-experienced adults harbouring HIV-1 with specific patterns of resistance to nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Antivir Ther*, 9(1): 37-45.
- Lipsitch, M., Samore, M. H. (2002). Antimicrobial use and antimicrobial resistance: a population perspective. *Emerg Infect Dis*; 8(4): 347-354.

- Liu, T. F., Shafer, R. W. (2006). Web resources for HIV type 1 genotypic-resistance test interpretation. *Clin Infect Dis*; 42(11): 1608-1618.
- López-Aldeguer, J., Aguirrebengoa, K., Arribas, J. R., Esté, J. A., Kindelán, J. M. (2005). Nuevas dianas y nuevos fármacos en el tratamiento de la infección por el VIH. *Enferm Infecc Microbiol Clin*; 23 (Supl. 2): 25-32.
- Lorenzo, A., González, J. (2004). Enfuvirtida en la práctica clínica: principales cuestiones y respuestas. *Enferm Infecc Microbiol Clin, Monogr*, 3(1): 23-28.
- Los Alamos, N. L. (2007). The Circulating Recombinant Forms (CRFs), U.S. Department of Energy's National Nuclear Security Administration. [www.hiv.lanl.gov](http://www.hiv.lanl.gov).
- Lospitao, E., Alvarez, A., Soriano, V., Holguin, A. (2005). HIV-1 subtypes in Spain: a retrospective analysis from 1995 to 2003. *HIV Med*; 6(5): 313-320.
- Luna, J. D. (2004a). Análisis multivariante. En: A. Martín y J. D. Luna (eds.). *Bioestadística para las Ciencias de la Salud*. Madrid, Ediciones Norma-Capitel: 177-189.
- Luna, J. D. (2004b). Tests con dos muestras. En: A. Martín y J. D. Luna (eds.). *Bioestadística para las Ciencias de la Salud*. Madrid, Ediciones Norma-Capitel: 245-246.
- MacArthur, R. D. (2004). An updated guide to genotype interpretation. *AIDS Read*; 14(5): 256-266.
- MacRae, E., Loveday, C. (2005). High prevalence of HIV-1 non-B subtype recombinants and diverse polymorphic profiles in a UK clinical cohort - implications for future resistance analysis. Québec (Canadá), XIV International HIV Drug Resistance Workshop: Basic Principles and Clinical Implications. Abstr. 134.
- Maes, B., Schrooten, Y., Snoeck, J., Derdelinckx, I., Van Ranst, M., Vandamme, A. M., Van Laethem, K. (2004). Performance of ViroSeq HIV-1 Genotyping System in routine practice at a Belgian clinical laboratory. *J Virol Methods*; 119(1): 45-49.
- Maggiolo, F., Callegaro, A., Ripamonti, D., Nemis, S., Aceerbis, A., Goglio, A., Suter, F. (2005). In vivo determination of stavudine activity in the presence of TAMs. Boston, Massachusetts, CROI 2005. Abstract 706.
- Manigart, O., Cournaud, V., Sanou, O., Valea, D., Nagot, N., Meda, N., Delaporte, E., Peeters, M., Van de Perre, P. (2004). HIV-1 superinfections in a cohort of commercial sex workers in Burkina Faso as assessed by an autologous heteroduplex mobility procedure. *Aids*; 18(12): 1645-1651.
- Mannheimer, S., Friedland, G., Matts, J., Child, C., Chesney, M. (2002). The consistency of adherence to antiretroviral therapy predicts biologic outcomes for human immunodeficiency virus-infected persons in clinical trials. *Clin Infect Dis*; 34(8): 1115-1121.
- Marcelin, A., Flandre, P., Pavie, J., Schmidely, N., Wirden, M., Lada, O., Chiche, D., Bernerd, M., Molina, J., Calvez, V. (2004a). New genotypic score comprising mutations impacting negatively and positively the virological response to didanosine in treatment-experienced patients from the randomized didanosine add on Jaguar study. *Antivir Ther*; 9: S146.
- Marcelin, A. G., Dalban, C., Peytavin, G., Lamotte, C., Agher, R., Delaugerre, C., Wirden, M., Conan, F., Dantin, S., Katlama, C., Costagliola, D., Calvez, V. (2004b). Clinically relevant interpretation of genotype and relationship to plasma drug concentrations for resistance to saquinavir-ritonavir in human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitor-experienced patients. *Antimicrob Agents Chemother*, 48(12): 4687-4692.
- Marcelin, A. G., Delaugerre, C., Wirden, M., Viegas, P., Simon, A., Katlama, C., Calvez, V. (2004c). Thymidine analogue reverse transcriptase inhibitors resistance mutations profiles and association to other nucleoside reverse transcriptase inhibitors resistance mutations observed in the context of virological failure. *J Med Virol*; 72(1): 162-165.
- Marcelin, A. G., Flandre, P., Pavie, J., Schmidely, N., Wirden, M., Lada, O., Chiche, D., Molina, J. M., Calvez, V. (2005). Clinically relevant genotype interpretation of resistance to didanosine. *Antimicrob Agents Chemother*, 49(5): 1739-1744.
- Marcelin, A. G., Lamotte, C., Delaugerre, C., Ktorza, N., Ait Mohand, H., Cacace, R., Bonmarchand, M., Wirden, M., Simon, A., Bossi, P., Bricaire, F., Costagliola, D., Katlama, C., Peytavin, G., Calvez, V. (2003). Genotypic inhibitory quotient as predictor of virological response to ritonavir-amprenavir in human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitor-experienced patients. *Antimicrob Agents Chemother*, 47(2): 594-600.
- Margot, N. A., Isaacson, E., McGowan, I., Cheng, A. K., Schooley, R. T., Miller, M. D. (2002). Genotypic and phenotypic analyses of HIV-1 in antiretroviral-experienced patients treated with tenofovir DF. *Aids*; 16(9): 1227-1235.

- Marschner, I. C., Betensky, R. A., DeGruttola, V., Hammer, S. M., Kuritzkes, D. R. (1999). Clinical trials using HIV-1 RNA-based primary endpoints: statistical analysis and potential biases. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol*; 20(3): 220-227.
- Martín-Carbonero, L., Soriano, V., González-Lahoz, J. (2004). Estavudina. En: J. Guardiola y V. Soriano (eds.). *Tratamiento de la infección por VIH-Sida. Fármacos y combinaciones*. Barcelona, Publicaciones Permanyer: 55-62.
- Mascolini, M. (2005). HIV Subtype Diversity in Drug Resistance. The 20 Faces of HIV. 3rd European HIV Drug Resistance Workshop. Atenas (Grecia), National AIDS Treatment Advocacy Project. [http://www.natap.org/2005/Euro/euro\\_5.htm](http://www.natap.org/2005/Euro/euro_5.htm).
- Masquelier, B., Assoumou, K., Descamps, D., Bocket, L., Cottalorda, J., Ruffault, A., Marcelin, A. (2006). Genotypic determinants of the virological response to fosamprenavir/ritonavir in protease inhibitors-experienced patients. *Antivir Ther*, 11: S101.
- Masquelier, B., Breilh, D., Neau, D., Lawson-Ayayi, S., Lavignolle, V., Ragnaud, J. M., Dupon, M., Morlat, P., Dabis, F., Fleury, H. (2002). Human immunodeficiency virus type 1 genotypic and pharmacokinetic determinants of the virological response to lopinavir-ritonavir-containing therapy in protease inhibitor-experienced patients. *Antimicrob Agents Chemother*, 46(9): 2926-2932.
- Masquelier, B., Tamalet, C., Montes, B., Descamps, D., Peytavin, G., Bocket, L., Wirden, M., Izopet, J., Schneider, V., Ferre, V., Ruffault, A., Palmer, P., Trylesinski, A., Miller, M., Brun-Vezinet, F., Costagliola, D. (2004). Genotypic determinants of the virological response to tenofovir disoproxil fumarate in nucleoside reverse transcriptase inhibitor-experienced patients. *Antivir Ther*, 9(3): 315-323.
- McCutchan, F. E. (2003). Global distribution of HIV-1 subtypes and recombinants, International AIDS vaccine initiative. <http://www.iavireport.org/>.
- Melby, T., Sista, P., Nelson, E., Dossier, S., Mink, M., Greenberg, M. (2002). Virological characterization of patients through 48 weeks in T-20-205 who acquired T-20 (enfuvirtide)-resistance-associated mutations during prior short-term enfuvirtide monotherapy. *Antivir Ther* 2002; 7: S56-57.
- Meloni, S. T., Kim, B., Sankale, J. L., Hamel, D. J., Tovanabuttra, S., Mboup, S., McCutchan, F. E., Kanki, P. J. (2004). Distinct human immunodeficiency virus type 1 subtype A virus circulating in West Africa: sub-subtype A3. *J Virol*; 78(22): 12438-12445.
- Michael, N. L., Herman, S. A., Kwok, S., Dreyer, K., Wang, J., Christopherson, C., Spadaro, J. P., Young, K. K., Polonis, V., McCutchan, F. E., Carr, J., Mascola, J. R., Jagodzinski, L. L., Robb, M. L. (1999). Development of calibrated viral load standards for group M subtypes of human immunodeficiency virus type 1 and performance of an improved AMPLICOR HIV-1 MONITOR test with isolates of diverse subtypes. *J Clin Microbiol*; 37(8): 2557-2563.
- Miller, M., Zhong, L., Chen, S., Margot, N., Wulfsohn, M. (2002). Multivariate analyses of antiviral response to tenofovir DF therapy in antiretroviral-experienced patients. *Antivir Ther*, 7: S12.
- Miller, M. D., Margot, N., Lu, B., Zhong, L., Chen, S. S., Cheng, A., Wulfsohn, M. (2004). Genotypic and phenotypic predictors of the magnitude of response to tenofovir disoproxil fumarate treatment in antiretroviral-experienced patients. *J Infect Dis*; 189(5): 837-846.
- Miller, V., Cozzi-Lepri, A., Hertogs, K., Gute, P., Larder, B., Bloor, S., Klauke, S., Rabenau, H., Phillips, A., Staszewski, S. (2000). HIV drug susceptibility and treatment response to mega-HAART regimen in patients from the Frankfurt HIV cohort. *Antivir Ther*, 5(1): 49-55.
- Miralles, C. (2006). Tratamiento antirretroviral en pacientes con fracaso virológico previo. *Enferm Infecc Microbiol Clin, Monogr*; 5(2): 37-46.
- Miró, J. M., Sued, O., Plana, M., Pumarola, T., Gallart, T. (2004). Avances en el diagnóstico y tratamiento de la infección aguda por el VIH-1. *Enferm Infecc Microbiol Clin*; 22(10): 643-659.
- Molina, J. M., Marcelin, A. G., Pavie, J., Heripret, L., De Boever, C. M., Troccaz, M., Leleu, G., Calvez, V. (2005). Didanosine in HIV-1-infected patients experiencing failure of antiretroviral therapy: a randomized placebo-controlled trial. *J Infect Dis*; 191(6): 840-847.

- Montes, B., Vergne, L., Peeters, M., Reynes, J., Delaporte, E., Segondy, M. (2004). Comparison of drug resistance mutations and their interpretation in patients infected with non-B HIV-1 variants and matched patients infected with HIV-1 subtype B. *J Acquir Immune Defic Syndr*; 35(4): 329-336.
- Murphy, G., Belda, F. J., Pau, C. P., Clewley, J. P., Parry, J. V. (1999). Discrimination of subtype B and non-subtype B strains of human immunodeficiency virus type 1 by serotyping: correlation with genotyping. *J Clin Microbiol*; 37(5): 1356-1360.
- Naeger, L. K., Struble, K. A. (2006). Effect of baseline protease genotype and phenotype on HIV response to atazanavir/ritonavir in treatment-experienced patients. *Aids*; 20(6): 847-853.
- Nájera, R. (2001). El virus que vino de África. *JANO*(61): 35-43.
- Nijhuis, M., Schuurman, R., de Jong, D., Erickson, J., Gustchina, E., Albert, J., Schipper, P., Gulnik, S., Boucher, C. A. (1999). Increased fitness of drug resistant HIV-1 protease as a result of acquisition of compensatory mutations during suboptimal therapy. *Aids*; 13(17): 2349-2359.
- Novak, R. M., Chen, L., MacArthur, R. D., Baxter, J. D., Huppler Hullsiek, K., Peng, G., Xiang, Y., Henely, C., Schmetter, B., Uy, J., van den Berg-Wolf, M., Kozal, M. (2005). Prevalence of antiretroviral drug resistance mutations in chronically HIV-infected, treatment-naive patients: implications for routine resistance screening before initiation of antiretroviral therapy. *Clin Infect Dis*; 40(3): 468-474.
- O'Brien, W. A., Hartigan, P. M., Martin, D., Esinhart, J., Hill, A., Benoit, S., Rubin, M., Simberkoff, M. S., Hamilton, J. D. (1996). Changes in plasma HIV-1 RNA and CD4+ lymphocyte counts and the risk of progression to AIDS. Veterans Affairs Cooperative Study Group on AIDS. *N Engl J Med*; 334(7): 426-431.
- Oette, M., Kaiser, R., Daumer, M., Petch, R., Fatkenheuer, G., Carls, H., Rockstroh, J. K., Schmalzer, D., Stechel, J., Feldt, T., Pfister, H., Haussinger, D. (2006). Primary HIV drug resistance and efficacy of first-line antiretroviral therapy guided by resistance testing. *J Acquir Immune Defic Syndr*; 41(5): 573-581.
- Ortega, E. (2005). Didanosina. En: J. Guardiola y V. Soriano (eds.). *Tratamiento de la infección por VIH-Sida. Fármacos y combinaciones*. Barcelona, Publicaciones Permanyer: 21-32.
- Osmanov, S., Pattou, C., Walker, N., Schwardlander, B., Esparza, J. (2002). Estimated global distribution and regional spread of HIV-1 genetic subtypes in the year 2000. *J Acquir Immune Defic Syndr*; 29(2): 184-190.
- Parikh, U. M., Barnas, D. C., Faruki, H., Mellors, J. W. (2006). Antagonism between the HIV-1 reverse-transcriptase mutation K65R and thymidine-analogue mutations at the genomic level. *J Infect Dis*; 194(5): 651-660.
- Peeters, M., Courgnaud, V., Abela, B., Auzel, P., Pourrut, X., Bibollet-Ruche, F., Loul, S., Liegeois, F., Butel, C., Koulagna, D., Mpoudi-Ngole, E., Shaw, G. M., Hahn, B. H., Delaporte, E. (2002). Risk to human health from a plethora of simian immunodeficiency viruses in primate bushmeat. *Emerg Infect Dis*; 8(5): 451-457.
- Peeters, M., Toure-Kane, C., Nkengasong, J. N. (2003). Genetic diversity of HIV in Africa: impact on diagnosis, treatment, vaccine development and trials. *Aids*; 17(18): 2547-2560.
- Pellegrin, I., Coureau, G., Neau, D., Lacoste, D., Lazaro, E., Fleury, H., MH., S., Dabis, F., Pellegrin, J., Breilh, D. (2005). Impact of baseline protease drug mutations on virological response to fosamprenavir/ritonavir-based regimens in antiretroviral-experienced patients (Zephir study). *Antivir Ther*; 10: S33.
- Pérez-Eliás, M. (2005). Utilización de las pruebas de resistencia en la clínica. En: V. Soriano (eds.). *Resistencias a los antirretrovirales 2005*. Barcelona, Publicaciones Permanyer: 47-60.
- Perrin, L., Kaiser, L., Yerly, S. (2003). Travel and the spread of HIV-1 genetic variants. *Lancet Infect Dis*; 3(1): 22-27.
- Peters, S., Munoz, M., Yerly, S., Sanchez-Merino, V., Lopez-Galindez, C., Perrin, L., Larder, B., Cmarko, D., Fakan, S., Meylan, P., Telenti, A. (2001). Resistance to nucleoside analog reverse transcriptase inhibitors mediated by human immunodeficiency virus type 1 p6 protein. *J Virol*; 75(20): 9644-9653.
- Petroni, A., Deluchi, G., Pryluka, D., Rotryng, F., Bortolozzi, R., Lopardo, G., Bouzas, M. B., Zapiola, I., Garone, D., Rodriguez, C., Chioconni, E., Lazaro, M. E., Murano, F., Maranzana, A., Oliva, S. M., Aparicio, M., Beltran, M., Benetucci, J. A. (2006). Update on primary HIV-1 resistance in Argentina: emergence of mutations conferring

- high-level resistance to nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors in drug-naive patients. *J Acquir Immune Defic Syndr*; 42(4): 506-510.
- Pieniasek, D., Rayfield, M., Hu, D. J., Nkengasong, J., Wiktor, S. Z., Downing, R., Biryahwaho, B., Mastro, T., Tanuri, A., Soriano, V., Lal, R., Dondero, T.** (2000). Protease sequences from HIV-1 group M subtypes A-H reveal distinct amino acid mutation patterns associated with protease resistance in protease inhibitor-naive individuals worldwide. HIV Variant Working Group. *Aids*; 14(11): 1489-1495.
- Pilcher, C. D., Eron, J. J., Jr., Galvin, S., Gay, C., Cohen, M. S.** (2004). Acute HIV revisited: new opportunities for treatment and prevention. *J Clin Invest*; 113(7): 937-945.
- Plantier, J. C., Dachraoui, R., Lemee, V., Gueudin, M., Borsa-Lebas, F., Caron, F., Simon, F.** (2005). HIV-1 resistance genotyping on dried serum spots. *Aids*; 19(4): 391-397.
- Pumarola, T.** (2005). Conceptos básicos. En: V. Soriano (eds.). *Resistencia a los antirretrovirales 2005*. Barcelona, Publicaciones Permanyer: 3-10.
- Quiñones-Mateu, M. E., Arts, E. J.** (1999). Recombination in HIV-1: Update and Implications. *AIDS Rev*; 1: 89-100.
- Quiros-Roldan, E., Bertelli, D., Signorini, S., Airoidi, M., Torti, C., Moretti, F., Carosi, G.** (2001). HIV-1 multi-dideoxynucleoside resistance mutation (Q151M): prevalence, associated resistance mutations and response to antiretroviral salvage treatment. *Microbios*; 106(414): 137-145.
- Ramírez de Arellano, E., Benito, J. M., López, M., Carbonero, L., Soriano, V., Holguín, A.** (2006). Respuesta virológica e inmunológica al TARGA en pacientes VIH-1+ naive infectados por subtipos B vs no-B. Valencia (España), XII Congreso Sociedad Española de Microbiología y Enfermedades Infecciosas. Abstr. 428.
- Ramos, J. M., Gutierrez, F., Padilla, S., Masia, M., Escolano, C.** (2005). Clinical and epidemiological characteristics of human immunodeficiency virus infection in foreigners residing in Elche, Spain (1998-2003). *Enferm Infecc Microbiol Clin*; 23(8): 469-473.
- Ravinetto, R., Villa, L.** (2006). Desigualdades en la accesibilidad a los medicamentos esenciales. *FMC*; 13(1): 33-44.
- Re, M. C., Bon, I., Monari, P., Borderi, M., Gibellini, D., Schiavone, P., Vitone, F., Chiodo, F., La Placa, M.** (2003). Mutation patterns of the reverse transcriptase genes in HIV-1 infected patients receiving combinations of nucleoside and non nucleoside inhibitors. *Int J Antimicrob Agents*; 22(4): 388-394.
- Requejo, H. I.** (2006). Worldwide molecular epidemiology of HIV. *Rev Saude Publica*; 40(2): 331-345.
- Rhee, S. Y., Kantor, R., Katzenstein, D. A., Camacho, R., Morris, L., Sirivichayakul, S., Jorgensen, L., Brigido, L. F., Schapiro, J. M., Shafer, R. W.** (2006). HIV-1 pol mutation frequency by subtype and treatment experience: extension of the HIVseq program to seven non-B subtypes. *Aids*; 20(5): 643-651.
- Ribera, E., López-Cortés, L. F., Soriano, V., Casado, J. L., Mallolas, J.** (2005). Monitorización terapéutica y cociente inhibitorio de los fármacos antirretrovirales: ¿son aplicables a nuestra realidad? *Enferm Infecc Microbiol Clin*; 23 (Supl. 2): 41-54.
- Ribera, E., Ocaña, I., Falcó, V.** (2004). Zidovudina. En: J. Guardiola y V. Soriano (eds.). *Tratamiento de la infección por VIH-Sida. Fármacos y combinaciones*. Barcelona, Publicaciones Permanyer: 5-19.
- Richman, D. D.** (2004). Benefits and limitations of testing for resistance to HIV drugs. *J Antimicrob Chemother*; 53(4): 555-557.
- Riera-Jaume, M., Peñaranda-Vera, M., Ribas-Blanco, M., Murillas-Angoiti, J., Campins, A., Salas-Aparicio, A., Leyes-García, M., Pareja-Bezarez, A., Pérez, J., Villalonga-Pieras, C.** (2006). Utilización en la práctica clínica de los tests de resistencia genotípica al VIH-1. Factores predictivos de mala evolución virológica en tratamientos de rescate. *Enferm Infecc Microbiol Clin*; 24(4): 225-231.
- Rius, C., Binefa, G., Casabona, J.** (2004). Epidemiología de la infección por el VIH/SIDA y su relación con otras infecciones de transmisión sexual. Perspectivas de futuro. *Enferm Infecc Microbiol Clin*; 22(7): 419-429.
- Rivas, P., Holguín, A., Ramírez de Arellano, E., Muñoz-Almagro, C., Delgado, R., Ortiz de Lejarazu, R., Soriano, V.** (2006). Tratamiento antirretroviral según tipos y subtipos del virus de la inmunodeficiencia humana. *Enferm Infecc Microbiol Clin*; 24 Suppl. 2: 29-33.
- Rivero, A., Camacho, A., Gallo, M.** (2004). Emtricitabina. En: J. Guardiola y V. Soriano (eds.). *Tratamiento de la infección por VIH-Sida. Fármacos y combinaciones*. Barcelona, Publicaciones Permanyer: 43-54.

- Robertson, D. L., Anderson, J. P., Bradac, J. A., Carr, J. K., Foley, B., Funkhouser, R. K., Gao, F., Hahn, B. H., Kalish, M. L., Kuiken, C., Learn, G. H., Leitner, T., McCutchan, F., Osmanov, S., Peeters, M., Pieniazek, D., Salminen, M., Sharp, P. M., Wolinsky, S., Korber, B. (2000). HIV-1 nomenclature proposal. *Science*; 288(5463): 55-56.
- Roca, B. (2003). Nuevos antirretrovirales y combinaciones. *Jano*; 65: 59-62.
- Rodés, B. (2005). Amplificación de ácidos nucleicos, secuenciación y análisis filogenético. En: V. Soriano y J. González-Lahoz (eds.). *VI Curso de Biología Molecular para Clínicos*. Barcelona, Publicaciones Permanyer: 41-68.
- Ross, L., Parkin, N., Chappey, C., Fisher, R., Clair, M. S., Bates, M., Tisdale, M., Lanier, E. R. (2004). Phenotypic impact of HIV reverse transcriptase M184I/V mutations in combination with single thymidine analog mutations on nucleoside reverse transcriptase inhibitor resistance. *Aids*; 18(12): 1691-1696.
- Ross, L., Scarsella, A., Raffanti, S., Henry, K., Becker, S., Fisher, R., Liao, Q., Hirani, A., Graham, N., St Clair, M., Hernandez, J. (2001). Thymidine analog and multinucleoside resistance mutations are associated with decreased phenotypic susceptibility to stavudine in HIV type 1 isolated from zidovudine-naive patients experiencing viremia on stavudine-containing regimens. *AIDS Res Hum Retroviruses*; 17(12): 1107-1115.
- Rubio, R., Berenguer, J., Miró, J., Iribarren, J., González, J., Guerra, L., Moreno, S., Arrizabalaga, J., Clotet, B., Gatell, J., Laguna, F., Martínez, E., Parras, F., Santamaría, J., Tuset, M., Viciano, P. (2002). Recomendaciones de GESIDA/Plan Nacional sobre el Sida respecto al tratamiento antirretroviral en pacientes adultos infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana en el año 2002. *Enferm Infecc Microbiol Clin*; 20(6): 244-303.
- Rubio, R., Tamargo, L., Moreno, V., Costa, J. (2004). Saquinavir. En: J. Guardiola y V. Soriano (eds.). *Tratamiento de la infección por VIH-Sida. Fármacos y combinaciones*. Barcelona, Publicaciones Permanyer: 125-144.
- Ruíz, L. (2005). Mecanismos de resistencia. En: V. Soriano (eds.). *Resistencias a los antirretrovirales 2005*. Barcelona, Publicaciones Permanyer: 11-24.
- Rumí, C. (2007). Boletín Estadístico de Extranjería e Inmigración. Observatorio Permanente de la Inmigración. Secretaría de Estado de Inmigración y Emigración. Ministerio de Trabajo y Asuntos Sociales. <http://extranjeros.mtas.es>.
- Sanchez, M. S. (2006). HIV Drug-resistant Strains as Epidemiologic Sentinels. *Emerg Infect Dis*; 12(2): 191-197.
- Saracino, A., Monno, L., Scudeller, L., Cibelli, D. C., Tartaglia, A., Punzi, G., Torti, C., Lo Caputo, S., Mazzotta, F., Scotto, G., Carosi, G., Angarano, G. (2006). Impact of unreported HIV-1 reverse transcriptase mutations on phenotypic resistance to nucleoside and non-nucleoside inhibitors. *J Med Virol*; 78(1): 9-17.
- Sax, P. E., Islam, R., Walensky, R. P., Losina, E., Weinstein, M. C., Goldie, S. J., Sadownik, S. N., Freedberg, K. A. (2005). Should resistance testing be performed for treatment-naive HIV-infected patients? A cost-effectiveness analysis. *Clin Infect Dis*; 41(9): 1316-1323.
- Scheer, S., Chu, P. L., Klausner, J. D., Katz, M. H., Schwarcz, S. K. (2001). Effect of highly active antiretroviral therapy on diagnoses of sexually transmitted diseases in people with AIDS. *Lancet*; 357(9254): 432-435.
- Schüpbach, J. (2003). Human Immunodeficiency Viruses. En: P. R. Murray, E. J. Baron, J. H. Jorgensen, M. A. Pfaller y R. H. Tenover (eds.). *Manual of Clinical Microbiology*. Washington, ASM Press: 1253-1281.
- Shafer, R. W. (2003). Genotypic Testing for HIV-1 Drug Resistance. Stanford University. HIV Drug Resistance Database. <http://hivdb.stanford.edu/modules/lookUpFiles/pdf/GenotypicResistance.pdf>.
- Shafer, R. W., Rhee, S. Y., Liu, T., Kiuchi, M. (2007). Mutation Prevalence According to Subtype and Treatment. Stanford University. HIV Drug Resistance Database. <http://hivdb.stanford.edu/cgi-bin/MutPrevBySubtypeRx.cgi>.
- Shulman, N. S., Machekano, R. A., Shafer, R. W., Winters, M. A., Zolopa, A. R., Liou, S. H., Hughes, M., Katzenstein, D. A. (2001). Genotypic correlates of a virologic response to stavudine after zidovudine monotherapy. *J Acquir Immune Defic Syndr*; 27(4): 377-380.
- Sluis-Cremer, N., Argoti Torres, P., Grzybowski, J., Parikh, U., Mellors, J. (2006). *Molecular mechanism of tenofovir, abacavir, and lamivudine resistance by the K70E mutation in HIV-1 reverse transcriptase*. 13th Conference on Retroviruses Opportunistic Infections., Denver, Colorado (EEUU).



- Smith, D. M., Wong, J. K., Hightower, G. K., Ignacio, C. C., Koelsch, K. K., Petropoulos, C. J., Richman, D. D., Little, S. J. (2005). HIV drug resistance acquired through superinfection. *Aids*; 19(12): 1251-1256.
- Snoeck, J., Kantor, R., Shafer, R. W., Van Laethem, K., Deforche, K., Carvalho, A. P., Wynhoven, B., Soares, M. A., Cane, P., Clarke, J., Pillay, C., Sirivichayakul, S., Ariyoshi, K., Holguin, A., Rudich, H., Rodrigues, R., Bouzas, M. B., Brun-Vezinet, F., Reid, C., Cahn, P., Brighido, L. F., Grossman, Z., Soriano, V., Sugiura, W., Phanuphak, P., Morris, L., Weber, J., Pillay, D., Tanuri, A., Harrigan, R. P., Camacho, R., Schapiro, J. M., Katzenstein, D., Vandamme, A. M. (2006). Discordances between interpretation algorithms for genotypic resistance to protease and reverse transcriptase inhibitors of human immunodeficiency virus are subtype dependent. *Antimicrob Agents Chemother*, 50(2): 694-701.
- Soriano, V., de Mendoza, C. (2002a). Genetic mechanisms of resistance to NRTI and NNRTI. *HIV Clin Trials*; 3(3): 237-248.
- Soriano, V., de Mendoza, C. (2002b). Genetic mechanisms of resistance to protease inhibitors and entry inhibitors. *HIV Clin Trials*; 3(3): 249-257.
- Sproat, M., Pozniak, A. L., Peeters, M., Winters, B., Hoetelmans, R., Graham, N. M., Gazzard, B. G. (2005). The influence of the M184V mutation in HIV-1 reverse transcriptase on the virological outcome of highly active antiretroviral therapy regimens with or without didanosine. *Antivir Ther*, 10(2): 357-361.
- Stone, C., Ait-Khaled, M., Craig, C., Tisdale, M. (2002). HIV-1 reverse transcriptase mutations identified by in vitro selection with tenofovir (TDF) +/- abacavir and tenofovir +/- lamivudine. *Antivir Ther*, 7: S37.
- Sturmer, M., Doerr, H. W., Staszewski, S., Preiser, W. (2003). Comparison of nine resistance interpretation systems for HIV-1 genotyping. *Antivir Ther*, 8(3): 239-244.
- Sued, O., Blanco, J. L., J.M., M. (2005). Espectro y mecanismo de acción del fosamprenavir. En: J. M. Gatell, J. Mensa y L. Zamora (eds.). *Fosamprenavir. Una prodroga con mejor biodisponibilidad*. Sabadell, Ediciones Antares: 81-95.
- Swanson, P., Soriano, V., Devare, S. G., Hackett, J., Jr. (2001). Comparative performance of three viral load assays on human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) isolates representing group M (subtypes A to G) and group O: LCx HIV RNA quantitative, AMPLICOR HIV-1 MONITOR version 1.5, and Quantiplex HIV-1 RNA version 3.0. *J Clin Microbiol*; 39(3): 862-870.
- Tatt, I. D., Barlow, K. L., Nicoll, A., Clewley, J. P. (2001). The public health significance of HIV-1 subtypes. *Aids*; 15 Suppl 5: S59-71.
- Tebit, D. M., Ganame, J., Sathiandee, K., Nagabila, Y., Coulibaly, B., Krausslich, H. G. (2006). Diversity of HIV in rural Burkina Faso. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 43(2): 144-152.
- Temin, H. M., Mizutani, S. (1970). RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature*; 226: 1211-1213.
- Thomson, M. M., Delgado, E., Herrero, I., Villahermosa, M. L., Vazquez-de Parga, E., Cuevas, M. T., Carmona, R., Medrano, L., Perez-Alvarez, L., Cuevas, L., Najera, R. (2002a). Diversity of mosaic structures and common ancestry of human immunodeficiency virus type 1 BF intersubtype recombinant viruses from Argentina revealed by analysis of near full-length genome sequences. *J Gen Virol*; 83(Pt 1): 107-119.
- Thomson, M. M., Delgado, E., Manjon, N., Ocampo, A., Villahermosa, M. L., Marino, A., Herrero, I., Cuevas, M. T., Vazquez-de Parga, E., Perez-Alvarez, L., Medrano, L., Taboada, J. A., Najera, R. (2001). HIV-1 genetic diversity in Galicia Spain: BG intersubtype recombinant viruses circulating among injecting drug users. *Aids*; 15(4): 509-516.
- Thomson, M. M., Perez-Alvarez, L., Najera, R. (2002b). Molecular epidemiology of HIV-1 genetic forms and its significance for vaccine development and therapy. *Lancet Infect Dis*; 2(8): 461-471.
- Thomson, M. M., Villahermosa, M. L., Vazquez-de-Parga, E., Cuevas, M. T., Delgado, E., Manjon, N., Medrano, L., Perez-Alvarez, L., Contreras, G., Carrillo, M. G., Salomon, H., Najera, R. (2000). Widespread circulation of a B/F intersubtype recombinant form among HIV-1-infected individuals in Buenos Aires, Argentina. *Aids*; 14(7): 897-899.
- Toro, C., Jimenez, V., Rodriguez, C., Del Romero, J., Rodes, B., Holguin, A., Alvarez, P., Garcia-Campello, M., Gomez-Hernando, C., Guelar, A., Sheldon, J., de Mendoza,

- C., Simon, A., Soriano, V. (2006). Molecular and epidemiological characteristics of blood-borne virus infections among recent immigrants in Spain. *J Med Virol*; 78(12): 1599-1608.
- Toro, C., Soriano, V. (2006). Infections due to HIV-2 and HTLV-1/2 in Spain. *Enferm Infecc Microbiol Clin*; 24(8): 481-482.
- Torti, C., Quiros-Roldan, E., Keulen, W., Scudeller, L., Lo Caputo, S., Boucher, C., Castelli, F., Mazzotta, F., Pierotti, P., Been-Tiktak, A. M., Buccoliero, G., De Gennaro, M., Carosi, G., Tinelli, C. (2003). Comparison between rules-based human immunodeficiency virus type 1 genotype interpretations and real or virtual phenotype: concordance analysis and correlation with clinical outcome in heavily treated patients. *J Infect Dis*; 188(2): 194-201.
- Tural, C., Ruiz, L., Holtzer, C., Schapiro, J., Viciano, P., Gonzalez, J., Domingo, P., Boucher, C., Rey-Joly, C., Clotet, B. (2002). Clinical utility of HIV-1 genotyping and expert advice: the Havana trial. *Aids*; 16(2): 209-218.
- UNAIDS (2006). AIDS Epidemic Update: December 2006. WHO Working Group on Global HIV/AIDS and STD Surveillance. Report on the global HIV/AIDS epidemic. Ginebra (Suiza), UNAIDS. Organización Mundial de la Salud.
- Valencia-Ortega, M., Moreno-Celda, V., González-Lahoz, J. (2004). Tenofovir. En: J. Guardiola y V. Soriano (eds.). *Tratamiento de la infección por VIH-Sida. Fármacos y combinaciones*. Barcelona, Publicaciones Permanyer: 77-88.
- Valer, L. (2005). Resistencia a los antirretrovirales. En: V. Soriano y J. González-Lahoz (eds.). *VI Curso de Biología Molecular para Clínicos*. Barcelona, Publicaciones Permanyer: 95-115.
- Valer, L., de Mendoza, C., Soriano, V. (2003). Superinfección por el virus de la inmunodeficiencia humana: implicaciones clínicas y biológicas. *Med Clin (Barc)*; 121(5): 192-196.
- van de Vijver, D., Wensing, A., Angarano, G., Asjo, B., Balotta, C., Boeri, E., Camacho, R., Chaix, M. L., Costagliola, D., Op de Coul, E., de Luca, A., Maljkovic, I. (2005). Differences in the frequency of minor substitutions between HIV-1 subtypes and their potential impact on the genetic barrier for resistance to protease inhibitors. Québec (Canadá), XIV International HIV Drug Resistance Workshop: Basic Principles and Clinical Implications. Abstr. 132.
- van de Vijver, D. A., Wensing, A. M., Angarano, G., Asjo, B., Balotta, C., Boeri, E., Camacho, R., Chaix, M. L., Costagliola, D., De Luca, A., Derdelinckx, I., Grossman, Z., Hamouda, O., Hatzakis, A., Hemmer, R., Hoepelman, A., Horban, A., Korn, K., Kucherer, C., Leitner, T., Loveday, C., MacRae, E., Maljkovic, I., de Mendoza, C., Meyer, L., Nielsen, C., Op de Coul, E. L., Ormaasen, V., Paraskevis, D., Perrin, L., Puchhammer-Stockl, E., Ruiz, L., Salminen, M., Schmit, J. C., Schneider, F., Schuurman, R., Soriano, V., Stanczak, G., Stanojevic, M., Vandamme, A. M., Van Laethem, K., Violin, M., Wilbe, K., Yerly, S., Zazzi, M., Boucher, C. A. (2006). The calculated genetic barrier for antiretroviral drug resistance substitutions is largely similar for different HIV-1 subtypes. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 41(3): 352-360.
- Van Laethem, K., De Luca, A., Antinori, A., Cingolani, A., Perna, C. F., Vandamme, A. M. (2002). A genotypic drug resistance interpretation algorithm that significantly predicts therapy response in HIV-1-infected patients. *Antivir Ther*, 7(2): 123-129.
- Vandamme, A. M., Deforche, K., Van Laethem, K., Camacho, R. (2005). HIV-1 subtype A1, C, F y G strains have a higher tipranavir mutation score than subtype B strains. Québec (Canadá), XIV International HIV Drug Resistance Workshop: Basic Principles and Clinical Implications. Abstr. 139.
- Vandamme, A. M., Sonnerborg, A., Ait-Khaled, M., Albert, J., Asjo, B., Bacheler, L., Banhegyi, D., Boucher, C., Brun-Vezinet, F., Camacho, R., Clevenbergh, P., Clumeck, N., Dedes, N., De Luca, A., Doerr, H. W., Faudon, J. L., Gatti, G., Gerstoft, J., Hall, W. W., Hatzakis, A., Hellmann, N., Horban, A., Lundgren, J. D., Kempf, D., Miller, M., Miller, V., Myers, T. W., Nielsen, C., Opravil, M., Palmisano, L., Perno, C. F., Phillips, A., Pillay, D., Pumarola, T., Ruiz, L., Salminen, M., Schapiro, J., Schmidt, B., Schmit, J. C., Schuurman, R., Shulse, E., Soriano, V., Staszewski, S., Vella, S., Youle, M., Ziermann, R., Perrin, L. (2004). Updated European recommendations for the clinical use of HIV drug resistance testing. *Antivir Ther*, 9(6): 829-848.



- Vanden Haesevelde, M., Decourt, J. L., De Leys, R. J., Vanderborght, B., van der Groen, G., van Heuverswijn, H., Saman, E. (1994). Genomic cloning and complete sequence analysis of a highly divergent African human immunodeficiency virus isolate. *J Virol*; 68(3): 1586-1596.
- Vergne, L., Snoeck, J., Aghokeng, A., Maes, B., Valea, D., Delaporte, E., Vandamme, A. M., Peeters, M., Van Laethem, K. (2006). Genotypic drug resistance interpretation algorithms display high levels of discordance when applied to non-B strains from HIV-1 naive and treated patients. *FEMS Immunol Med Microbiol*; 46(1): 53-62.
- Viani, R. M., Peralta, L., Aldrovandi, G., Kapogiannis, B. G., Mitchell, R., Spector, S. A., Lie, Y. S., Weidler, J. M., Bates, M. P., Liu, N., Wilson, C. M. (2006). Prevalence of primary HIV-1 drug resistance among recently infected adolescents: a multicenter adolescent medicine trials network for HIV/AIDS interventions study. *J Infect Dis*; 194(11): 1505-1509.
- Vora, S., Marcelin, A. G., Gunthard, H. F., Flandre, P., Hirsch, H. H., Masquelier, B., Zinkernagel, A., Peytavin, G., Calvez, V., Perrin, L., Yerly, S. (2006). Clinical validation of atazanavir/ritonavir genotypic resistance score in protease inhibitor-experienced patients. *Aids*; 20(1): 35-40.
- Wainberg, M. A. (2003). HIV resistance to nevirapine and other non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *J Acquir Immune Defic Syndr*; 34 Suppl 1: S2-7.
- Wainberg, M. A. (2004). HIV-1 subtype distribution and the problem of drug resistance. *Aids*; 18 Suppl 3: S63-68.
- Wainberg, M. A., Turner, D. (2004). Resistance issues with new nucleoside/nucleotide backbone options. *J Acquir Immune Defic Syndr*; 37 Suppl 1: S36-43.
- Wang, D., Larder, B. (2003). Enhanced prediction of lopinavir resistance from genotype by use of artificial neural networks. *J Infect Dis*; 188(5): 653-660.
- Waters, J., Margot, N., McColl, D., Zhong, L., Miller, M. (2006). *K65R, L74V and Thymidine Analog Mutations in HIV-1 RT Associated with Reduced Response to Tenofovir DF in ART-experienced Patients*. 13th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections., Denver, Colorado (EEUU). Abstr. 633.
- Weinstock, H. S., Zaidi, I., Heneine, W., Bennett, D., Garcia-Lerma, J. G., Douglas, J. M., Jr., LaLota, M., Dickinson, G., Schwarcz, S., Torian, L., Wendell, D., Paul, S., Goza, G. A., Ruiz, J., Boyett, B., Kaplan, J. E. (2004). The epidemiology of antiretroviral drug resistance among drug-naive HIV-1-infected persons in 10 US cities. *J Infect Dis*; 189(12): 2174-2180.
- Whitcomb, J. M., Parkin, N. T., Chappey, C., Hellmann, N. S., Petropoulos, C. J. (2003). Broad nucleoside reverse-transcriptase inhibitor cross-resistance in human immunodeficiency virus type 1 clinical isolates. *J Infect Dis*; 188(7): 992-1000.
- Wolf, K., Walter, H., Beerenwinkel, N., Keulen, W., Kaiser, R., Hoffmann, D., Lengauer, T., Selbig, J., Vandamme, A. M., Korn, K., Schmidt, B. (2003). Tenofovir resistance and re-sensitization. *Antimicrob Agents Chemother*; 47(11): 3478-3484.
- Yahi, N., Fantini, J., Henry, M., Tourres, C., Tamalet, C. (2005). Structural analysis of reverse transcriptase mutations at codon 215 explains the predominance of T215Y over T215F in HIV-1 variants selected under antiretroviral therapy. *J Biomed Sci*; 12(5): 701-710.
- Yahi, N., Tamalet, C., Tourres, C., Tivoli, N., Fantini, J. (2000). Mutation L210W of HIV-1 reverse transcriptase in patients receiving combination therapy. Incidence, association with other mutations, and effects on the structure of mutated reverse transcriptase. *J Biomed Sci*; 7(6): 507-513.
- Yerly, S., Quadri, R., Negro, F., Barbe, K. P., Cheseaux, J. J., Burgisser, P., Siegrist, C. A., Perrin, L. (2001). Nosocomial outbreak of multiple bloodborne viral infections. *J Infect Dis*; 184(3): 369-372.
- Zaccarelli, M., Perno, C. F., Forbici, F., Soldani, F., Bonfigli, S., Gori, C., Trotta, M. P., Bellocchi, M. C., Liuzzi, G., D'Arrigo, R., De Longis, P., Boumis, E., Bellagamba, R., Tozzi, V., Narciso, P., Antinori, A. (2004). Q151M-mediated multinucleoside resistance: prevalence, risk factors, and response to salvage therapy. *Clin Infect Dis*; 38(3): 433-437.
- Zazzi, M., Romano, L., Venturi, G., Shafer, R. W., Reid, C., Dal Bello, F., Parolin, C., Palu, G., Valensin, P. E. (2004). Comparative evaluation of three computerized algorithms for prediction of antiretroviral susceptibility from HIV type 1 genotype. *J Antimicrob Chemother*; 53(2): 356-360.

- Zhu, T., Korber, B. T., Nahmias, A. J., Hooper, E., Sharp, P. M., Ho, D. D.** (1998). An African HIV-1 sequence from 1959 and implications for the origin of the epidemic. *Nature*; 391(6667): 594-597.
- Ziermann, R., Celis, L., Derdelinckx, I., Lambert, C., Veeck, J., Rizzo, M. G., Vanderborght, B., Zisis, G., Clumeck, N., Fransen, K., Vaira, D., Hendricks, D., Van Laethem, K., Vandamme, A. M., Schmit, J. C., Knechten, H., De Luca, A., Louwagie, J., Segers, P., De Boeck, K., Pottel, H., De Brauwer, A., Hulstaert, F.** (2004). Virologic therapy response significantly correlates with the number of active drugs as evaluated using a LiPA HIV-1 resistance scoring system. *J Clin Virol*; 31 Suppl 1: S7-15.