

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS

Departamento de Biología Molecular

**ESTUDIO DE CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS
DEL VIH MEDIANTE LA GENERACIÓN Y
DESARROLLO DE VIRUS RECOMBINANTES.
APLICACIÓN AL ESTUDIO DE LA CAPACIDAD
REPLICATIVA DE VIRUS MULTIRRESISTENTES.**

TESIS DOCTORAL

JAVIER GARCÍA PÉREZ

MADRID, 2007

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS

Departamento de Biología Molecular

**ESTUDIO DE CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS
DEL VIH MEDIANTE LA GENERACIÓN Y
DESARROLLO DE VIRUS RECOMBINANTES.
APLICACIÓN AL ESTUDIO DE LA CAPACIDAD
REPLICATIVA DE VIRUS MULTIRRESISTENTES.**

Memoria presentada por Javier García Pérez para optar al grado de
Doctor en Ciencias por la Universidad Autónoma de Madrid.

Madrid, Diciembre de 2007

Trabajo realizado en el Centro Nacional de Microbiología del Instituto de Salud Carlos III, bajo la dirección del Dr. José Alcamí Pertejo. El desarrollo de esta Tesis ha sido posible gracias a la concesión de una beca del ISCIII, y a la financiación concedida por el VI programa marco de la UE (red EUROPRISE) y la Red de Investigación en SIDA (RIS).

ABREVIATURAS	I
RESUMEN EN INGLÉS.....	III
INTRODUCCIÓN.....	1
1. EL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA.....	2
1.1. Clasificación y epidemiología.....	2
1.2. Estructura y organización genómica.....	3
1.3. Ciclo biológico del VIH-1.....	4
2. TRATAMIENTO DE LA INFECCIÓN POR EL VIH.....	7
2.1. Fármacos antirretrovirales.....	7
2.2. Mecanismos de acción.....	8
2.3. Terapia combinada.....	9
3. DESARROLLO DE RESISTENCIA A ANTIRRETROVIRALES.....	11
3.1. Variabilidad y dinámica de replicación viral.....	11
3.2. Mecanismos de resistencia.....	12
3.2.1. Mecanismos de resistencia a ITIAN.....	12
3.2.2. Mecanismos de resistencia a ITINNs.....	14
3.2.3. Mecanismos de resistencia a IPs.....	15
3.3. Sistemas de análisis de resistencia.....	16
3.3.1. Métodos genotípicos.....	16
3.3.2. Métodos fenotípicos.....	17
3.3.2.1. Métodos clásicos de fenotipo.....	19
3.3.2.2. Métodos basados en virus recombinantes.....	19
3.3.3. Fenotipo virtual.....	20
4. CAPACIDAD REPLICATIVA DE VIRUS RESISTENTES A ANTIRRETROVIRALES.....	21
4.1. Fitness y resistencia.....	21
4.2. Sistemas de estudio de la capacidad replicativa.....	22
4.3. Mutaciones de resistencia en pol que provocan una pérdida de capacidad replicativa.	23
OBJETIVOS.....	26
MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
1. CÉLULAS PROCARIÓTICAS.....	29
1.1. Cepas.....	29
1.2. Transformación y medios de cultivo.....	29
2. ÁCIDOS NUCLEICOS.....	29
2.1. Purificación de ADN.....	29
2.1.1. Purificación de ADN plasmídico.....	29
2.1.2. Purificación de fragmentos de ADN.....	29
2.1.3. Purificación de ADN celular.....	30
2.2. Tratamiento con enzimas y clonaje.....	30
2.3. Mutagénesis dirigida.....	30
2.4. Secuenciación.....	31
2.5. Plásmidos.....	31
2.6. Construcción de vectores provirales con genes indicadores.....	32

2.6.1. pNL4-3Luc.....	33
2.6.2. pNL4-3LucIRESnef.	33
2.6.3. pNL4-3Ren.	33
2.6.4. pNL4-3Ren.R-E-.....	34
2.7. Construcción de mutantes.....	34
2.7.1. Modificaciones del vector pNL4-3Ren.	34
2.7.1.1. pNL4-3Nco-Ren.	34
2.7.1.2. Mutantes de delección de pNL4-3Ren (defectivos en pol, PR y RT).....	35
2.7.2. Mutantes puntuales de la RT.	36
2.8. Construcción de vectores provirales recombinantes.	36
2.8.1. Purificación de ARN viral.	36
2.8.2. Amplificación de las secuencias codificantes pol, PR y RT.	37
2.8.3. Clonaje y análisis genético.	37
3. CÉLULAS EUCARIÓTICAS.	38
3.1. Líneas celulares y medios de cultivo.....	38
3.2. Transfección de células eucarióticas con fosfato cálcico.	39
4. PROTEÍNAS.....	40
4.1. Preparación de extractos celulares.	40
4.2. Valoración de la concentración de proteínas.	40
4.3. Western-blot (WB).....	40
5. VIRUS.	41
5.1. Titulación de virus.....	41
5.1.1. Titulación por actividad luciferasa.....	41
5.1.2. Titulación por efecto citopático.	41
5.2. Determinación de la sensibilidad a antirretrovirales.	41
5.2.1. Antirretrovirales.	41
5.2.2. Ensayos de susceptibilidad a antirretrovirales.	42
5.2.3. Análisis del efecto sinérgico/antagónico de combinaciones de NRTIs.	43
5.2.4. Viabilidad celular.	44
5.2.4.1. Ensayo de viabilidad celular por luminiscencia.	44
5.2.4.2. Ensayo clásico de infectividad mediante MTT	44
5.3. Determinación de la capacidad replicativa.	45
5.3.1. Virus recombinantes.....	45
5.3.2. Cinéticas de replicación.....	46
5.3.3. Ensayo de competición.....	46
RESULTADOS.....	48
1. DESARROLLO DE UN MODELO BASADO EN LA GENERACIÓN DE VIRUS RECOMBINANTES EN EL GEN <i>POL</i> PARA EL ESTUDIO FENOTÍPICO DE AISLADOS VIRALES DE PACIENTES CON INFECCIÓN POR EL VIH-1.	49
1.1. Construcción de un virus de ciclo múltiple que exprese un gen indicador.	49
1.2. Estrategia para generar virus recombinantes.	51
1.2.1. Producción de virus recombinantes con las secuencias pol, PR y RT procedentes de plasma de paciente.	52
1.2.2. Análisis de los virus recombinantes.	53
2. APLICACIONES DEL SISTEMA DE EXPRESIÓN DE VIRUS RECOMBINANTES AL ESTUDIO DE DIFERENTES ASPECTOS FENOTÍPICOS DEL VIH.	55

2.1. Resistencia fenotípica a antirretrovirales.....	55
2.1.1. Evaluación del sistema fenotípico de sensibilidad a antirretrovirales.....	57
2.1.2. Estudio de reproducibilidad del ensayo fenotípico.	57
2.2. Estudio de los efectos sinérgicos y antagónicos de combinaciones de dos inhibidores análogos a nucleósidos.	61
2.3. Estudio de la capacidad replicativa de virus resistentes a antirretrovirales.....	64
2.3.1. Capacidad replicativa de virus recombinantes sensibles a antirretrovirales.....	64
2.3.2. Evaluación del ensayo de capacidad replicativa.	64
2.3.3. Capacidad replicativa de virus recombinantes resistentes a antirretrovirales.	65
3. ANÁLISIS LA CAPACIDAD REPLICATIVA DE VIRUS PORTADORES DE LA MUTACIÓN DE RESISTENCIA Q151M DE FORMA AISLADA O EN COMBINACIÓN CON LA MUTACIÓN K65R.	69
3.1. Análisis de la capacidad replicativa de virus portadores de las mutaciones K65R y/o Q151M.	69
3.1.1. Análisis de la capacidad replicativa mediante virus recombinantes	69
3.1.2. Análisis de la capacidad replicativa de los diferentes clones virales mediante cinéticas de replicación y ensayos de competición.....	70
3.2. Evolución de la asociación entre las mutaciones K65R y Q151M.	72
3.2.1. Cambios en la frecuencia de asociación entre K65R y Q151M.	72
3.2.2. Los virus con la mutación Q151L tienen una desventaja replicativa en presencia de la mutación K65R.	73
3.2.3. Efecto de la mutación compensatoria S68G en la replicación de los mutantes Q151L and K65R/Q151L.....	74
3.2.4. Análisis de la susceptibilidad a NRTIs de los clones virales Q151M/L en presencia o ausencia de K65R.	75
DISCUSIÓN	77
1. Desarrollo de un modelo basado en la generación de virus recombinantes en el gen <i>pol</i> para el estudio fenotípico de aislados virales de pacientes con infección por el VIH-1.	78
2. APLICACIONES DEL MODELO DE VIRUS RECOMBINANTES GENERADO.....	81
2.1. Resistencia fenotípica a antirretrovirales.....	81
2.2. Estudio de los efectos sinérgicos y antagónicos de combinaciones de dos inhibidores análogos a nucleósidos/nucleótidos.	82
2.3. Estudio de la capacidad replicativa de virus resistentes a antirretrovirales.....	85
3. Análisis de la capacidad replicativa de virus portadores de la mutación de resistencia Q151M de forma aislada o en combinación con la mutación K65R.	89
CONCLUSIONES	93
BIBLIOGRAFÍA	96
ANEXO	127

ABREVIATURAS

ADN:	Ácido dexoxirribonucleico
ADNc:	Ácido dexoxirribonucleico complementario
ARN:	Ácido ribonucleico
ARNm:	Ácido ribonucleico mensajero
ARNt:	Ácido ribonucleico de transferencia
bp:	Pares de bases
BSA:	Seroalbúmina bovina
CI:	Índice de combinación.
col:	En reseña bibliográfica, colaboradores
CPE:	Efecto citopático
CR	Capacidad replicativa
CVP:	Carga viral plasmática
DTT:	Ditiotreitol
ED 50/75/90:	Dosis efectiva del 50, 75 ó 90% de inhibición
EDTA:	Ácido etilendiaminotetraacético
EMCV:	Virus de encefalomiocarditis murina.
fold:	Número de veces.
IC50:	Concentración que inhibe el 50% de la actividad enzimática
IL:	Interleucina
IN:	Integrasa
IP:	Inhibidor de la proteasa
IRES:	Sitio de reconocimiento interno del ribosoma
IRT	Inhibidor de la transcriptasa inversa
ITIAN:	Inhibidor de la transcriptasa inversa análogo a nucleósido.
ITIANt:	Inhibidor de la transcriptasa inversa análogo a nucleótido.
ITINN:	Inhibidor de la transcriptasa inversa no nucleósidos.
kb:	Kilobase
kD:	Kilodalton
LB:	Luria-Bertani
LTR:	Secuencias repetidas largas
MHC:	Complejo mayor de histocompatibilidad
MOI:	Multiplicidad de infección
NAM:	Mutaciones asociadas con resistencia a análogos de nucleósido
nt:	Nucleótido
PBLs:	Linfocitos de sangre periférica
PBMC:	Células mononucleares de sangre periférica
PBS:	Tampón fosfato salino
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa
PHA:	Fitohemaglutinina
PLAP:	Fosfatasa alcalina de placenta humana
PMA:	Forbol-12-miristato-13- acetato
PR:	Proteasa
RBL:	Tampón de lisis de eritrocitos
RLUs:	Unidades relativas de luz
RRE	Elemento de respuesta a Rev
RT:	Transcriptasa inversa.
SD	Desviación estandar
SIDA:	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
SIV:	Virus de la inmunodeficiencia de simios
STF:	Suero bovino fetal
TAM:	Mutaciones asociadas con resistencia a análogos de timidina
TARGA:	Terapia antiretroviral de gran actividad
VIH-1:	Virus de Inmunodeficiencia Humana tipo 1
WT:	Virus salvaje

NOMENCLATURA DE UNA Y TRES LETRAS PARA LOS AMINOÁCIDOS

A (Ala) Alanina

C (Cys) Cisteína

D (Asp) Ácido aspártico

E (Glu) Ácido glutámico

F (Phe) Fenilalanina

G (Gly) Glicina

H (His) Histidina

I (Ile) Isoleucina

K (Lys) Lisina

L (Leu) Leucina

M (Met) Metionina

N (Asn) Asparagina

P (Pro) Prolina

Q (Gln) Glutamina

R (Arg) Arginina

S (Ser) Serina

T (Thr) Treonina

V (Val) Valina

W (Trp) Triptófano

Y (Tyr) Tirosina

RESUMEN EN INGLÉS

This work focuses on the study of different virulence factors of the Human Immunodeficiency (HIV) and in particular the impact of different mutations in the Reverse Transcriptase (RT) and viral protease (PR) in the resistance to antiretrovirals and the replicative capacity of the virus.

A method to characterize the HIV-1 phenotype has been developed using recombinant viruses that harbour different fragments of the *pol* gene amplified from the viral population of patients and a luciferase marker as reporter gene. These viruses can undergo multiple cycles of replication, which translates in improved sensitivity in the detection of minority variants.

We have applied this experimental model to different clinical situations. First, the system has allowed the development of a phenotypic resistance test in HIV-infected patients. A second application of this technology has been the analysis of the combined effect of two nucleoside inhibitors of the RT on HIV replication. In this part of the work we show that, depending on drug combinations tested, antagonistic and agonistic effects are produced “in vitro” and these data correlate with the failure and success of such combinations “in vivo”.

In the last part of the work this recombinant virus system has been applied to the study of more basic research questions concerning the analysis of viral replicative capacity. Two objectives were addressed: to determine the relative impact of RT and PR resistant mutation on HIV fitness and to analyse the replicative capacity of recombinant viruses carrying the combination of K65R and Q151M mutations in the RT. The results obtained by the generation of recombinant virus generated from HIV-infected patients show that depending on the mutation pattern, a decreased replicative capacity can be attributed to RT or PR mutation or to a combination of both. Finally, we describe that the combination of K65R and Q151M has a strong impact on the replicative capacity of the HIV. Also, our results suggest that the emergence of this pattern of mutations follows a model in which the Q151M is generated as a first step, followed by the K65R mutation, which represents a relevant finding in the evolution of HIV in patients treated with antiretroviral drugs.

In summary, this work describes the generation of a new recombinant virus assay allowing both clinical applications and the study of basic research questions.

INTRODUCCIÓN

1. EL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA.

1.1. Clasificación y epidemiología.

El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) se clasifica dentro de género *Lentivirinae* perteneciente a la familia *Retroviridae*. Esta familia está constituida por virus ARN monocatenarios que necesitan copiar su información a ADN de doble cadena, integrarse en el genoma de la célula infectada y transcribirse utilizando la maquinaria celular, para generar una nueva progenie viral. El VIH infecta células de estirpe macrofágica (Gendelman y col., 1989) y linfocitos CD4 (Psallidopoulos y col., 1989), generando un trastorno grave, progresivo e irreversible de la función inmune, cuya expresión final viene representada por la enfermedad que conocemos como Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA). Bajo este término se agrupan una serie de infecciones oportunistas graves secundarias al déficit inmunitario ocasionado por la infección por el VIH, además de una serie de desórdenes neurológicos y formas inusuales de cancer, como el Sarcoma de Kaposi o los linfomas no Hodgkin (Levy, 1993).

Se han aislado dos retrovirus capaces de producir inmunodeficiencia en seres humanos: VIH-1 (Barré-Sinoussi y col., 1983; Levy y col., 1984; Popovic y col., 1984) y VIH-2 (Clavel y col., 1986), siendo el VIH-1 el más extendido y virulento. El VIH-1 se ha propagado a la especie humana a partir de un salto interespecie del virus de chimpancé SIV_{cpz}, que se ha producido al menos en tres ocasiones generando los tres grupos del VIH-1 (M, N y O) (Gao y col., 1999). El grupo M es el mayoritario y se subdivide en nueve subtipos A-K y distintas formas recombinantes (CRF). El VIH-1 se encontró inicialmente localizado en los países de África Central y Oriental, pero debido a los intensos movimientos migratorios, el VIH ha producido una extensa y grave pandemia.

Según las estimaciones del Programa conjunto de las Naciones Unidas sobre el VIH/SIDA (ONUSIDA) y la Organización Mundial de la Salud (OMS), a finales del año 2006 el número de personas infectadas por el virus ascendía a 39,5 millones. Desde el comienzo de la epidemia, África subsahariana ha sido la región más castigada presentando las dos terceras partes (65%) de los casos de personas infectadas por el VIH. En algunos de estos países la incidencia alcanza el 30% de la población adulta, lo que les ha llevado al borde de la catástrofe demográfica y económica. En los últimos años se han producido prometedores avances en las iniciativas mundiales para abordar la epidemia de SIDA, incluido un mayor acceso a los programas eficaces de tratamiento y prevención. Sin embargo, el número de personas infectadas por el VIH sigue aumentando, 2,6 millones más que en 2004, así como el

de defunciones causadas por SIDA, que se estima en más de 2,9 millones de personas. En el periodo 2004-2006, el incremento más preocupante en el número de casos se registró en Asia oriental, Europa oriental y Asia central, donde el número de infectados por el VIH en 2006 fue una quinta parte (21%) más alto que en 2004. España, a pesar de presentar un marcado descenso de la incidencia de SIDA desde la introducción de los nuevos tratamientos antirretrovirales, sigue siendo uno de los países más afectados en Europa Occidental.

1.2. Estructura y organización genómica.

Los viriones del VIH son partículas esféricas, de 80-110 nm de diámetro, rodeadas de una envuelta lipídica derivada de la membrana de la célula hospedadora. En ella se encuentra expuesta hacia el exterior la glicoproteína de superficie (SU, gp120), anclada al virus por asociación no covalente con la glicoproteína transmembrana (TM, gp41) en forma de trímeros. La parte interna de la membrana vírica está recubierta por la proteína de la matriz (MA, p17), e inmediatamente por debajo una estructura en forma de cono truncado o “core” compuesta por la proteína de la cápside (CA, p24). En su interior se localiza el material genético estabilizado en forma de complejo ribonucleoproteico con la proteína de la nucleocápsida (NC, p7), y los enzimas Proteasa (PR, p11), Transcriptasa Inversa (RT, p66/p51) e Integrasa (IN, p32) necesarios para el ciclo viral. Además, en la partícula viral pueden empaquetarse proteínas accesorias como Nef, Vif y Vpr (Figura 1).

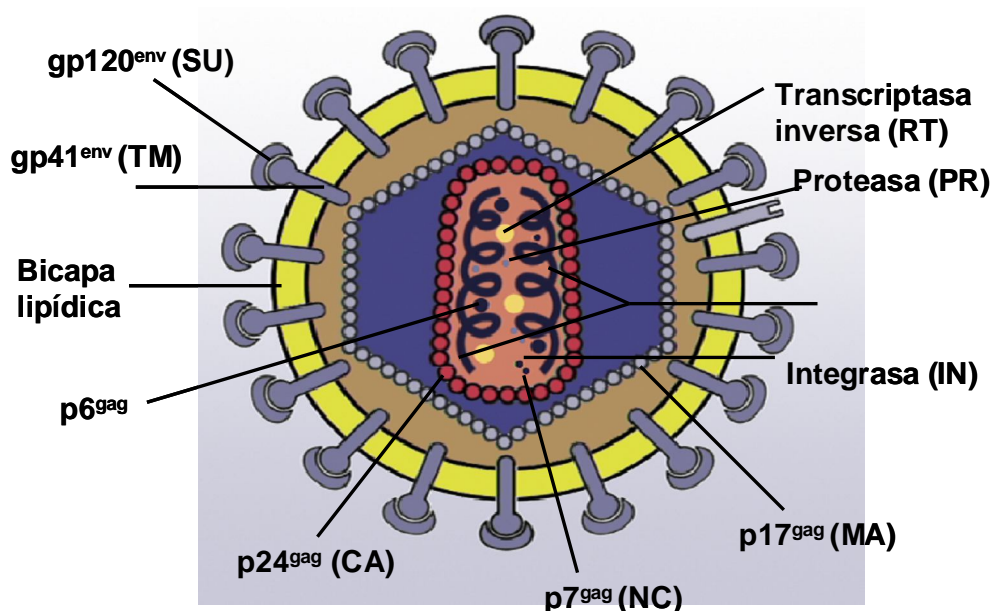


Figura 1. Representación esquemática de la partícula del VIH-1. Mediante flechas se indica la localización de algunas de las proteínas y estructuras del virión.

El genoma del VIH-1 está constituido por dos copias idénticas de ARN de cadena sencilla de aproximadamente 9,8 Kb y de polaridad positiva. En su forma de provirus, el genoma viral se encuentra flanqueado por unas secuencias repetidas largas (LTR) en las que se localizan importantes regiones reguladoras responsables del inicio de la transcripción y de la poliadenilación de los ARNm virales. El VIH-1 está formado por tres genes estructurales: *gag*, que codifica por un precursor poliproteico de 55 kDa que se procesa dando lugar a MA, CA, p2, NC, p1 y p6; *pol*, que codifica por la poliproteína Pol que se procesa dando lugar a las enzimas virales Proteasa (PR), Transcriptasa Inversa (RT) e Integrasa (IN); y *env*, que codifica por la glicoproteína gp160 que se procesa por proteasas celulares dando lugar a las dos proteínas de la envuelta SU (gp120) y TM (gp41). Además, el VIH se encuentra sometido a un estrecho proceso de regulación genética en el que participan seis genes reguladores: *vpu*, *vpr*, *vif*, *nef*, *tat* y *rev* (Figura 2) (Greene, 1991). En la tabla 1, se resumen las funciones de las proteínas codificadas por los distintos genes virales.

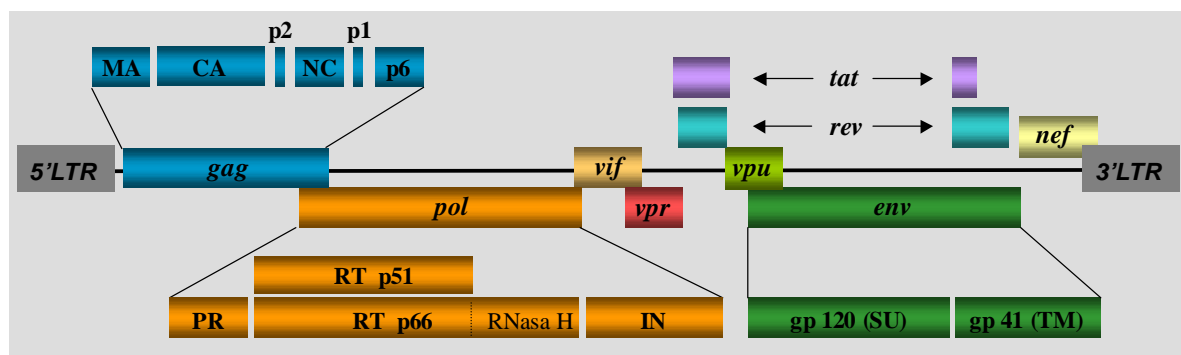


Figura 2. Organización genómica del VIH-1.

1.3. Ciclo biológico del VIH-1.

El ciclo de replicación del VIH-1 se puede dividir en cuatro fases (Figura 3):

Entrada del virus en la célula. La entrada del VIH en la célula diana es un proceso secuencial que se inicia con la interacción de gp120 con su receptor celular específico, la molécula de CD4 (Klatzmann y col., 1984). Esto provoca un cambio conformacional en la proteína viral permitiendo su unión a los receptores de quimiocinas CCR5 o CXCR4, que actúan como correceptores del virus (Feng y col., 1996; Dragic y col., 1996). La unión de gp120 al correceptor provoca un nuevo cambio conformacional en el oligomero gp120/gp41, que tiene como consecuencia la exposición del dominio amino terminal de la glicoproteína TM induciendo la fusión de la membrana viral con la membrana celular (Root y col., 2001).

Tras la fusión de membranas, la cápsida viral se libera y se desensambla parcialmente en el citoplasma celular, liberando el ARN viral que inicia el proceso de transcripción inversa.

Retrotranscripción, transporte e integración. La RT, transportada en el propio virión (Levy, 1993), se asocia al ARN viral y a una molécula de ARNt Lys que funciona como cebador. La retrotranscripción supone un complejo proceso que se realiza en el citoplasma celular mediante el cual la RT genera una doble hebra de ADN que duplica los LTR que se sitúan en ambas extremidades del genoma proviral (Greene, 1991). Una vez sintetizado, el ADN viral es transportado al núcleo con ayuda de las proteínas virales MA y Vpr, que forman parte del complejo de preintegración junto con la IN y determinadas proteínas celulares. Una vez en el núcleo, el ADN viral se integra en el genoma celular mediante la acción de la IN constituyendo la forma proviral del VIH (Gaynor, 1992).

Tabla 1. Genes del VIH y propiedades de las proteínas que codifican.

GEN	PROTEÍNA	FUNCIÓN
<i>env</i>	gp160	Precursor preproteico
	SU (gp120)	Interacción con receptor CD4 y correceptores
	TM (gp41)	Fusión de membranas
<i>gag</i>	p55	Precursor preproteico
	CA (p24)	Proteína de la nucleocápside
	MA (p17)	Proteína de la matriz
	NC (p7)	Ribonucleoproteína
	p6	Ribonucleoproteína, encapsidación viral
<i>pol</i>	Proteasa (p11)	Procesamiento postraducciona de proteínas virales
	Transcriptasa inversa (p66/p51)	Retrotranscripción / Actividad ARNasaH
	Integrasa (p32)	Integración del genoma viral en el ADN del huesped
<i>tat</i>	Tat (p14)	Transactivador / Elongación del ARNm
<i>rev</i>	Rev (p18)	Regulación del transporte y procesamiento del ARNm
<i>nef</i>	Nef (p27)	Regulación negativa de CD4 y MHC de clase I
		Aumento de la infectividad / Incremento de la retrotranscripción
<i>vif</i>	Vif (p23)	Aumenta la infectividad viral (degradación APOBEC)
<i>vpr</i>	Vpr (p15)	Formación y transporte del complejo de preintegración
		Detiene el ciclo celular en fase G2 / Transactivador
<i>vpu</i>	Vpu (p16)	Aumenta la liberación de viriones / Degradación de CD4 en retículo

Transcripción, procesamiento y transporte del ARNm. Una vez integrado, el VIH puede seguir un comportamiento variable: permanecer latente, o experimentar una replicación masiva con el consiguiente efecto citopático sobre la célula infectada. La iniciación de la transcripción no depende de proteínas virales sino de factores celulares, como el factor de transcripción NF- κ B (Alcamí y col., 1995; Chen y col., 1997), que interaccionan con las

secuencias reguladoras localizadas en el LTR viral (Gaynor, 1992). A esta región se asocia el complejo transcripcional primario permitiendo la transcripción mediada por la ARN-polimerasa II. Una vez iniciada la síntesis del ARN viral, la expresión de la proteína viral Tat aumenta la tasa de transcripción y permite la elongación completa del ARNm viral (Cullen, 1993; Karn, 1999). La proteína Rev participa en el procesamiento y transporte del ARNm mediante su unión al elemento de respuesta a Rev (RRE) (Butsch y Boris-Lawrie, 2002). Asimismo, Rev está implicado en el ensamblaje de los ARNm con la maquinaria de síntesis proteica y acelera la síntesis de las proteínas virales por los polisomas (Greene, 1991).

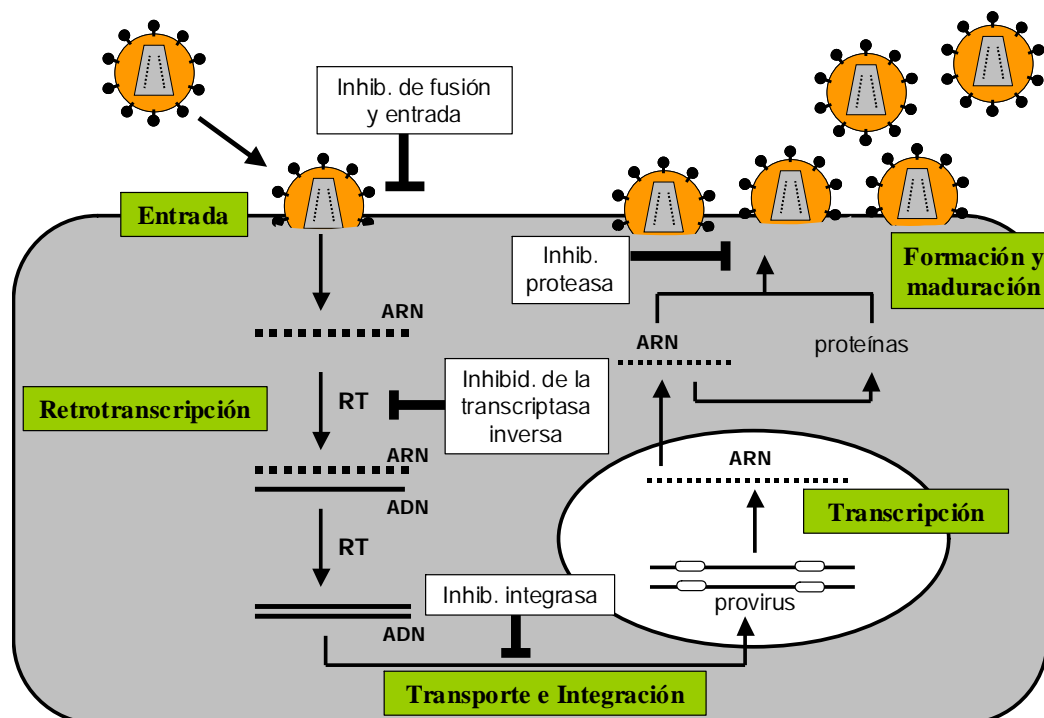


Figura 3. Ciclo biológico del VIH-1. El esquema muestra los pasos principales del ciclo vital del virus indicando las dianas terapéuticas.

Formación y maduración de viriones: Una vez sintetizadas, las proteínas virales sufren modificaciones postraduccionales para constituir las partículas virales maduras. La proteína Env (gp160) recién sintetizada pasa al retículo donde se glicosila y oligomeriza formando una estructura trimérica. La ruptura proteolítica en las subunidades gp120 y gp41 ocurre en el aparato de Golgi mediante una proteasa celular, y finalmente los trímeros son transportados hacia la membrana plasmática donde se produce el ensamblaje del virus. A partir del ARNm que no ha sufrido ningún procesamiento se sintetiza la poliproteína Gag, y mediante un cambio en la fase de lectura la poliproteína Gag-pol. Este hecho se produce con una frecuencia del 5%, por lo que las proteínas de pol están en una proporción 1:20 con respecto a

las de gag (Jacks y col., 1988). Una vez que las poliproteínas Gag y Gag-pol son sintetizadas, se dirigen junto a dos copias del ARN y los iniciadores ARNt a la membrana plasmática donde regulan el proceso de ensamblaje. La Proteasa viral desempeña un papel central en la producción de partículas virales al procesar los precursores proteicos Gag y Gag-pol. La maduración final de los viriones y el ensamblaje correcto de las proteínas virales se produce en el momento final del ciclo infectivo, durante el proceso de gemación de los virus a través de la membrana celular, y permite constituir una partícula viral madura. En este proceso participan otras proteínas virales entre las que destacan Vif y Vpu (Emerman y col., 1998; Cullen, 1998). Ninguna de las dos proteínas es esencial para la replicación viral, pero en su ausencia se produce, una acumulación de proteínas en el citoplasma y una menor producción de viriones en el caso de Vpu, y una disminución de la infectividad entre 100 y 1000 veces en el caso de Vif. Recientemente se ha descrito que la proteína Vif interacciona con una proteína celular, APOBEC (Sheehy y col., 2002), perteneciente a la familia de enzimas de edición de ADN, e impide su incorporación en el virión. Esta proteína representa un mecanismo activo de inmunidad antiviral innata frente a todos los retrovirus y probablemente otras familias virales. Su acción sobre el VIH no se produce en la célula infectada sino interfiriendo el proceso de retrotranscripción en las células que serán infectadas en el siguiente ciclo de propagación (Chun y col., 1997; Marin y col., 2003).

2. TRATAMIENTO DE LA INFECCIÓN POR EL VIH.

2.1. Fármacos antirretrovirales.

Desde la introducción de la Zidovudina (ZDV, AZT) como primer fármaco para el tratamiento de la infección por el VIH en 1987, el desarrollo de nuevos compuestos dirigidos frente a diferentes dianas del ciclo del virus ha sido constante. Se han aprobado hasta el momento un total de 29 fármacos, derivados de 23 principios activos, que se distribuyen en cinco familias: los inhibidores de la transcriptasa inversa, que se subdividen a su vez en análogos a nucleósidos o nucleótidos (ITIAN/Nts) y no análogos a nucleósidos (ITINNs), los inhibidores de la proteasa (IPs), los inhibidores de fusión, los inhibidores de la entrada y los inhibidores de la integrasa (Tabla 2).

2.2. Mecanismos de acción.

Los ITIAN (AZT, d4T, 3TC, ddI, ddC, ABC, FTC) y el ITIANt (TDF) son moléculas similares a los nucleósidos naturales que deben ser fosforilados por quinasas celulares para dar lugar a sus formas activas. Una vez trifosforilados, o bifosforilados en el caso del TDF, compiten con los desoxinucleótidos trifosfatos (dNTPs) en su incorporación a la cadena de ADN sintetizada durante la retrotranscripción, actuando como terminadores de cadena al carecer del grupo hidroxilo en la posición 3' del azúcar.

Los ITINN (NVP, DLV, EFV) son compuestos hidrofóbicos que se unen directamente a un bolsillo hidrofóbico cercano al centro catalítico de la actividad polimerasa de la RT (Kohlstaedt y col., 1992). Esta unión altera el sitio de unión del complejo molde-iniciador dificultando la translocación durante la polimerización (Spence y col., 1995).

Tabla 2. Fármacos antirretrovirales comerciales.

Familias	Antirretrovirales aprobados (Nombre comercial)	
	Fármacos	Combinaciones
ITIAN	Zidovudina, AZT, ZDV (Retrovir)	TDF/FTC (Truvada)
	Estavudina, d4T (Zerit)	ABC/ZDV/3TC (Trizivir)
	Lamivudina, 3TC (EpiVir)	ABC/3TC (Epzicom)
	Didanosina, ddI (Videx)	3TC/ZDV (Combivir)
	Zalcitabina, ddC (Hivid)	
	Abacavir, ABC (Ziagen)	
	Emtricitabina, FTC (Emtriva)	
	Tenofovir, TDF (Viread)	
		EFV/FTC/TDF (Atripla)
ITINN	Efavirenz, EFV (Sustiva)	
	Nevirapina, NVP (Viramune)	
	Delavirdina, DLV (Rescriptor)	
IP	Amprenavir, APV (Agenerase)	LPV/RTV (Kaletra)
	Atazanavir, ATZ (Reyataz)	
	Darunavir, DRV (Prezista)	
	Fosamprenavir, FPV (Lexiva)	
	Indinavir, IDV (Crixivan)	
	Nelfinavir, NFV (Viracep)	
	Ritonavir, RTV (Norvir)	
	Saquinavir, SQV (Invirase)	
	Tipranavir, TPV (Aptivus)	
Inhibidores de fusión	Enfuvirtide, T-20 (Fuzeon)	
Inhibidores de entrada	Maraviroc (Selzentry)*	
Inhibidores de integrasa	Raltegravir (Isentress)*	

* Fármacos que se encuentran en uso expandido.

Los IPs (APV, ATZ, DRV, FPV, IDV, NFV, RTV, SQV, TPV) son moléculas hidrofóbicas que mimetizan los sitios de corte de la poliproteína Gag-Pol. Por tanto, actúan

como inhibidores peptidomiméticos que compiten con los sustratos naturales en su unión al centro activo de la proteasa viral. Los IPs presentan perfiles farmacocinéticos deficientes que hacen muy difícil el mantenimiento de niveles plasmáticos elevados (Acosta, 2002). Dado que la mayoría de los IPs se metabolizan vía complejo del citocromo P450, en la actualidad la mayoría se administran potenciados con dosis subóptimas de Ritonavir, que inhibe la actividad de dicho complejo e incrementa los niveles de fármaco en sangre.

Los inhibidores de fusión (T-20) son péptidos sintéticos que mimetizan e interaccionan con una región conservada de gp41 y bloquean la formación de la estructura necesaria en el proceso de fusión (Eckert y Kim, 2001).

Los inhibidores de la entrada desarrollados hasta el momento se dirigen frente al receptor CCR5. Son moléculas sintéticas de pequeño tamaño que actúan como inhibidores alostéricos modificando la estructura del receptor impidiendo la unión de la glicoproteína viral.

Los fármacos dirigidos frente a la integrasa actúan inhibiendo el proceso conocido como transferencia de banda durante la integración del genoma del VIH-1 al ADN celular.

2.3. Terapia combinada.

La introducción de la terapia antirretroviral de gran actividad (TARGA), basada en la combinación de tres o cuatro fármacos, ha supuesto una reducción considerable de la morbilidad y mortalidad asociadas a la infección por VIH-1 (Palella y col., 1998; Mocroft y col., 2003). El objetivo de la terapia antirretroviral es suprimir al máximo la replicación viral (por debajo de los límites de detección de las técnicas de cuantificación de ARN en plasma) lo más rápido y duraderamente posible, para evitar el deterioro del sistema inmunitario y la progresión a SIDA (Hammer y col., 2006). En este sentido el recuento de linfocitos CD4+ y la carga viral plasmática (CVP), son los parámetros básicos para establecer las decisiones terapéuticas sobre inicio y cambio en el tratamiento, así como para monitorizar su eficacia.

Los niveles de CD4 al inicio de tratamiento son el mejor factor de pronóstico de reconstitución inmune (Kaufmann y col., 2005) y de progresión a SIDA (Egger y col., 2002). La recomendación actual es iniciar el tratamiento, en todos los casos de infección por VIH sintomática independientemente de la cifra de CD4 y de la CVP, y en los casos de infección asintomática con CD4 por debajo de 350 células/ μ l. En los pacientes asintomáticos con CD4 >350 células/ μ l se recomienda diferir el tratamiento, independientemente de la CVP (Panel de expertos de GESIDA y Plan Nacional sobre el Sida, 2007).

Como tratamiento en primera línea se recomienda utilizar la combinación de 2 ITIANs junto con un ITINN o un IP potenciado con dosis subterapéuticas de RTV. Sin embargo, se suele elegir la primera opción, debido a que dichos tratamientos presentan un menor porcentaje de efectos secundarios y una menor interacción entre fármacos (Yeni y col., 2004). La combinación de 3 NRTIs sólo se plantea como alternativa cuando las pautas anteriores no pueden utilizarse por problemas de toxicidad, interacciones con otros medicamentos o complejidad del régimen, ya que han demostrado ser menos eficaces que las pautas con ITINNs (Gulick y col., 2004) o IPs (Staszewski y col., 2001).

El ITINN seleccionado habitualmente es el EFV, debido a la mayor toxicidad hepática y a los cuadros de hipersusceptibilidad de la NVP. Sin embargo, en mujeres embarazadas se recomienda el uso de NVP dado el carácter teratogénico del EFV. Estos fármacos deben utilizarse en combinaciones potentes ya que si no se consigue una supresión completa de la CVP pueden aparecer mutaciones que originan resistencia cruzada a todos los fármacos de esta familia. Los IPs de primera elección son LPV + RTV (LPV/r) y FPV/r, y como alternativa ATV/r o SQV/r. Estas combinaciones de 2 IPs pueden potenciar la toxicidad pero se ve compensado por un marcado incremento en su potencia antiviral.

La mayoría de las terapias tiene como base la combinación de dos ITIAN y las que principalmente se recomiendan son TDF + FTC, ABC + 3TC y AZT + 3TC que además se encuentran coformuladas con dosis fijas para favorecer la adherencia (Tabla 2). Otras alternativas son ddI + FTC, d4T + 3TC y AZT + ddI. Las siguientes combinaciones no se recomiendan: d4T + ddI y TDF + ddI, por toxicidad y menor eficacia; AZT + d4T, por antagonismo; 3TC + FTC y ABC + TDF, por perfil de resistencia similar y, por tanto, menor barrera genética.

Las combinaciones de tres ITIAN han demostrado eficacia virológica e inmunológica en varios estudios, aunque menos que las pautas de 2 ITIAN combinado con IP o ITINN. Con la introducción del TDF aparecieron nuevas posibilidades de triple terapia con ITIANs. Sin embargo algunas combinaciones prometedoras como ABC + 3TC + TDF (Khanlou y col., 2005; Landman y col., 2005; Balestre y col., 2006) o ddI + 3TC + TDF (Jemsek y col., 2004) han mostrado inesperados porcentajes de fallos virológicos.

En tratamientos eficaces con buena adherencia la CVP debe descender rápidamente (1-2 log₁₀/ml) a las 4 semanas y ser indetectable (<50 copias/ml) entre las 8 y 24 semanas dependiendo de las CVP iniciales (Rizzardì y col., 2000). Este descenso inicial se correlaciona con la duración de la respuesta (Raboud y col., 1998). Si por el contrario no se consigue esta caída en la carga viral, o después de alcanzarla vuelve a ser detectable en dos

determinaciones consecutivas, se considera fracaso virológico y se debe cambiar el tratamiento. El fracaso virológico es debido a distintos factores que están relacionados entre sí: la falta de adherencia al tratamiento, la toxicidad farmacológica, la potencia o la interacción entre los diferentes fármacos. La resultante de estos factores es frecuentemente el desarrollo de resistencias farmacológicas con el consiguiente fracaso terapéutico a la pauta utilizada. Esta circunstancia limita las opciones terapéuticas futuras y dificulta significativamente el manejo clínico de los pacientes.

3. DESARROLLO DE RESISTENCIA A ANTIRRETROVIRALES.

3.1. Variabilidad y dinámica de replicación viral.

El VIH, como el resto de virus ARN, se caracteriza por una gran variabilidad genética que viene determinada por diferentes factores:

-Tasa de mutación: La RT es una enzima ADN polimerasa dependiente de ARN o ADN con actividad endonucleasa H que, a diferencia de las ADN polimerasas celulares, no presenta actividad exonucleasa 3'-5' que permite corregir las bases mal incorporadas. Se ha estimado que la tasa de error para el VIH es de aproximadamente $2,5 \times 10^{-5}$, produciéndose un promedio de 0.3-0.4 mutaciones por ronda de replicación (Preston y col., 1988).

-Recombinación: Otro mecanismo que contribuye a la gran diversidad genética es la recombinación entre variantes virales durante la retrotranscripción. Para que este fenómeno suceda se requiere la co-infección de una célula por dos virus distintos y el empaquetamiento de un ARN de cada virus en la misma partícula viral. Se ha estimado que la frecuencia de recombinación varía entre 3 y 9 eventos por ciclo de replicación en linfocitos (Levy y col., 2004).

-Tasa de replicación: Durante una infección productiva se estima que se generan en torno a 10^9 - 10^{10} partículas virales al día (Perelson y col., 1996). Como la vida media de las células productivas infectadas es 1,6 días y la de los viriones libres en plasma 6 horas, la población viral del plasma se renueva prácticamente en su totalidad de forma diaria. La combinación de esta cinética de replicación y la elevada tasa de mutación permiten que en un solo día se pueda encontrar cualquier nucleótido en cualquier posición del genoma viral (Coffin, 1995).

Los diferentes mecanismos en la generación de variabilidad descritos, combinados con la plasticidad de las proteínas virales, tanto las estructurales como las enzimas responsables del ciclo biológico viral (Turner y Summers, 1999), originan una dinámica poblacional de cuasiespecies (Cichutek y col., 1992; Domingo y Holland, 1997). Las cuasiespecies se pueden definir como distribuciones complejas de secuencias genéticamente distintas pero relacionadas entre sí, ya que provienen de una sola cadena progenitora. La presencia de diferentes factores selectivos, ya sean intrínsecos al organismo hospedador (sistema inmunitario) o externos a este (fármacos antirretrovirales), generan una competición continua entre las variantes genéticas surgidas durante la replicación vírica, seleccionando las más eficaces para hacer frente a estos cambios. Los fármacos antirretrovirales, en condiciones subóptimas, favorecen la selección de variantes resistentes limitando en buen grado el éxito de las terapias antirretrovirales (Ledergerber y col., 2004).

3.2. Mecanismos de resistencia.

Los mecanismos y las mutaciones que generan resistencia a antirretrovirales se pueden clasificar en función del tipo de fármaco que las ha seleccionado. En este trabajo se ha analizado la resistencia frente a los inhibidores de la RT (ITIAN e ITINN) y los inhibidores de la PR, que siguen siendo los más utilizados en terapia antirretroviral. En la figura 6 se muestra un cuadro resumen de las principales mutaciones de resistencia a ambos tipos de inhibidores.

La RT es un heterodímero (p66/p51), con actividad ADN polimerasa dependiente de ADN o ARN y actividad ribonucleasa (RNAsa H). La subunidad p51 se produce por el procesamiento proteolítico de p66, y parece tener sólo un papel estructural. Por el contrario, p66 presenta los dominios polimerasa y RNAsa H, donde el primero presenta una disposición que asemeja a una mano derecha (dedos, palma, pulgar) formando una hendidura para la unión del ADN (Figura 4).

3.2.1. Mecanismos de resistencia a ITIAN.

Las mutaciones de resistencia a los ITIAN se localizan principalmente en torno al centro activo de la RT (Figura 4), y generalmente se requiere la acumulación de varias mutaciones para conseguir altos niveles de resistencia. Se han establecido dos mecanismos principales de resistencia a análogos de nucleósidos: uno mediado por mutaciones que favorecen la escisión fosforolítica de los terminadores de cadena incorporados al ADN; y otro, por mutaciones que interfieren con la capacidad para incorporar el inhibidor trifosforilado.

-Disminución de la afinidad de la RT por los ITIAN. En este mecanismo influye la eficacia catalítica de incorporación del inhibidor con respecto a los sustratos naturales durante la polimerización. En general, la RT salvaje incorpora preferentemente el análogo de nucleósido farmacológico frente al natural. Sin embargo, ciertas mutaciones disminuyen la afinidad por el inhibidor manteniendo la actividad ADN polimerasa en la incorporación de dNTPs naturales (Huang y col., 1998). Así, el nucleósido natural es incorporado y se continúa la elongación de la cadena de ADN. Estas mutaciones pueden reducir la capacidad replicativa del virus, suelen ser específicas de un fármaco y presentan escasa resistencia cruzada (K65R, K70E, L74V, V75T, Y115F, M184V) con la excepción de Q151M.

A continuación se describen algunos ejemplos:

-M184V: Esta mutación es un buen ejemplo de este mecanismo, confiere altos niveles de resistencia a 3TC (>100 veces) sin alterar significativamente la afinidad de la RT por sus sustratos naturales (Diallo y col., 2003). Esto se debe a que la cadena lateral de la valina tiene un mayor grosor que la de la metionina, provocando un problema de interferencia estérica que justificaría la resistencia al inhibidor (Sarafinos y col., 1999). Los fracasos con regímenes que incluyen 3TC seleccionan rápidamente esta mutación. También puede ser seleccionada por abacavir y, en mucho menor grado, por ddI. La mutación M184V puede mejorar la resistencia fenotípica producida por el cúmulo de NAM en AZT, d4T y TDF, y empeora la resistencia fenotípica de ABC, ddI y ddC. Sin embargo, el efecto beneficioso a la resistencia a AZT, d4T y TDF se pierde cuando aumenta el número de NAM.

-K65R: La mutación K65R es la principal mutación asociada con la resistencia al TDF aunque puede ser seleccionada también por ddI, ddC y ABC. Por otro lado, se ha establecido que esta mutación se asocia con un aumento de la sensibilidad a AZT, que no modifica la sensibilidad a d4T y que puede reducir la sensibilidad a TDF, ABC, ddI, ddC y 3TC. Este impacto es especialmente significativo cuando se asocia la mutación M184V con K65R (White y col., 2002). En este caso deberían evitarse fármacos como el ddI, ABC y 3TC, y elegir AZT o d4T como opciones terapéuticas.

-Complejo Q151M: El ejemplo de la mutación Q151M es interesante porque no se trata de una mutación aislada sino que aparece acompañada de otras mutaciones (A62V, V75I, F77L y F116Y) formando el llamado complejo de multiresistencia Q151M. La selección del complejo es un proceso gradual que se inicia con la adquisición del cambio Q151M, que afecta la interacción con el dNTP entrante en la síntesis de la cadena, seguido de la sustitución F77L, y posteriormente los cambios en las posiciones 62, 75 y 116 que se sitúan en la

vecindad del sitio catalítico para acomodar el bolsillo a los dNTPs naturales. El complejo Q151M origina resistencia a todos los análogos de nucleósidos, excepto 3TC, FTC y TDF.

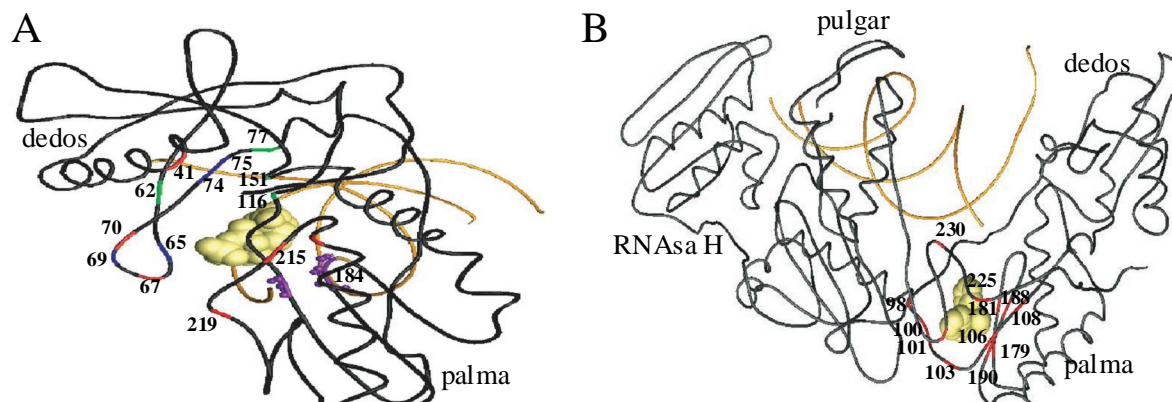


Figura 4. Modelo de la estructura de la RT del VIH-1. A) Se indican, las posiciones de las mutaciones de resistencia a ITIAN con números, el nucleótido entrante con esferas amarillas y los residuos activos (110, 185 y 186) mediante esferas violetas. B) Se indican, las posiciones de las mutaciones de resistencia a ITIANN con números y la NVP mediante esferas amarillas. Modificado a partir de Shafer, 2002.

-Aumento de la capacidad de escisión: Aunque la RT carece de actividad 3'-5' exonucleasa, dispone de un mecanismo de fosforolisis que permite retirar del extremo 3' terminal del ADN aquellos análogos de nucleósidos que bloquean la síntesis permitiendo que esta continúe. La reacción de fosforolisis requiere de una molécula donadora de pirofosfato que puede ser ATP o PPI. Aunque las dos vías son posibles, dadas las concentraciones intracelulares de estas moléculas, es más probable que el donador sea ATP que generaría un dinucleósido polifosfato (Meyer y col., 1999). Al contrario de lo que sucede con las mutaciones anteriores, estas no suponen una alteración en la afinidad de la RT por los dNTPs y, por tanto, no suelen afectar a la capacidad replicativa del virus.

Las mutaciones implicadas en este tipo de resistencia (M41L, D67N, K70R, L210W, T215F/Y y K219Q/E) se asociaron inicialmente con resistencia a AZT, y fueron denominadas mutaciones de análogos de timidina (TAM). Sin embargo, estas mutaciones generan resistencia no solo a AZT, sino también a d4T y ABC, y en menor grado a ddI y TDF (Shafer, 2002). Por ello a las mutaciones TAM también se las ha denominado mutaciones NAM (mutaciones de análogos de nucleósidos), ya que también afectan a la potencia de análogos diferentes a los de timina. Los datos bioquímicos disponibles indican que la actividad fosforolítica se incrementa conforme aumentan el número de mutaciones de resistencia.

3.2.2. Mecanismos de resistencia a ITINNs

La resistencia a ITINNs se debe a la pérdida de afinidad de la RT por los compuestos, como resultado de mutaciones en la región hidrofóbica que alteran las interacciones químicas

entre el enzima y el inhibidor (Figura 4). Una única mutación en el sitio de unión suele conferir un elevado grado de resistencia frente a uno o más ITINNs. Así, por ejemplo, los cambios K103N, V106M ó Y188L por sí solos, pueden conferir resistencia simultánea a NVP, DLV y EFV. El hecho de que todos los compuestos compartan el sitio de unión, genera una alta tasa de resistencia cruzada.

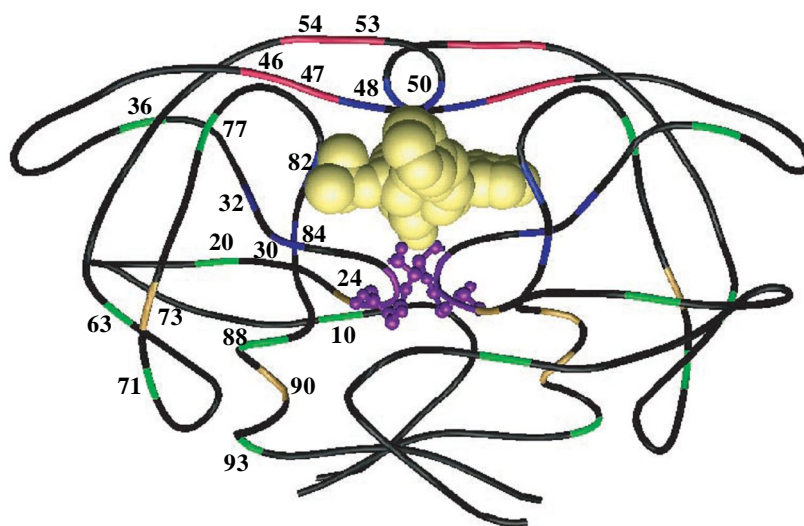


Figura 5. Modelo de la estructura del homodímero de la proteasa del VIH-1 cristalizada con IDV. Se indican las posiciones de las mutaciones en el homodímero de la izquierda, el indinavir con esferas amarillas y el centro activo mediante esferas violetas. Modificado a partir de Shafer, 2002.

3.2.3. Mecanismos de resistencia a IPs

La Proteasa viral es un dímero formado por dos cadenas polipeptídicas de 99 aminoácidos unidas no covalentemente. En la unión de estas subunidades se crea una hendidura donde se encuentran las secuencias conservadas (Asp-Thr-Gly) que constituyen el sitio activo (Figura 5). A pesar del pequeño tamaño de la PR, su gran plasticidad, le permite acumular un gran número de mutaciones en diferentes posiciones sin perder su actividad enzimática. Se han descrito numerosas mutaciones asociadas a resistencia que se localizan alrededor del sitio catalítico (mutaciones primarias), o en regiones alejadas, que no interfieren con la unión del IP al sustrato (mutaciones secundarias). Las primeras, disminuyen la afinidad por el fármaco manteniendo la especificidad por el sustrato natural. Estas mutaciones (D30N, G48V, I50V, V82A/T, I84V) confieren un alto grado de resistencia y en ocasiones se asocian con una disminución en la capacidad replicativa del virus. Las mutaciones secundarias no modifican de forma significativa la sensibilidad a los fármacos, sin embargo, compensan la pérdida previa de capacidad replicativa aumentando la estabilidad y actividad de la enzima (M46I,

L63P, L90M). Estas mutaciones suelen ser las responsables de la mayor parte de los casos de resistencia cruzada entre los distintos IPs (Menéndez-Arias y col., 2003). Además, las mutaciones secundarias pueden aparecer fuera de la proteasa, en sitios de procesamiento de la poliproteínas Gag (p2/p7, p7/p1 y p1/p6), proporcionando mejores sustratos para la PR e incrementando la eficacia del proceso de maduración del virión (Cote y col., 2001; Myint y col., 2004).

3.3. Sistemas de análisis de resistencia

Como ya se ha mencionado previamente, uno de los principales obstáculos para conseguir y mantener una buena respuesta virológica es la emergencia de variantes resistentes (Ledergerber y col., 2004). La detección de estas variantes ha demostrado su utilidad clínica (Durant y col., 1999; Baxter y col., 2000; Tural y col., 2002; Cingolani y col., 2002; Cohen y col., 2002), y por tanto, las pruebas de resistencia se recomiendan para facilitar a los clínicos el cambio de tratamiento después de fracaso terapéutico (Hirsch y col., 2003). También se recomiendan en caso de infección primaria o crónica sin tratamiento previo debido al aumento en la prevalencia de transmisión de virus resistentes (Little y col., 2002, Novak y col., 2005; Wensing y col., 2005). Los métodos para evaluar la sensibilidad del VIH a los antirretrovirales se pueden clasificar en ensayos genotípicos y fenotípicos. A continuación se detallan las características de cada uno, los sistemas disponibles y sus ventajas e inconvenientes.

3.3.1. Métodos genotípicos

Los métodos genotípicos se basan en el análisis de secuencias específicas del genoma del VIH-1 con el fin de comprobar si existen mutaciones asociadas a resistencia en los genes diana del tratamiento. En el momento actual, los métodos genotípicos se utilizan fundamentalmente para analizar las secuencias de la RT, de la PR y de la envuelta viral. A partir del ARN viral extraído del plasma del paciente infectado, mediante una reacción de RT-PCR se amplifican los genes de interés y, posteriormente, se secuencian el fragmento completo o se buscan mutaciones puntuales específicas. Para que la eficiencia de la prueba sea máxima la carga viral debe ser superior a 1.000 copias de ARN-VIH-1/ml de plasma (Shafer, 2002), y debe obtenerse antes de interrumpir o modificar el tratamiento, ya que, en su ausencia, las cepas salvajes pasan a predominar rápidamente sobre las mutantes en el conjunto de cuasiespecies de un mismo paciente.

Métodos basados en hibridación: Se basan en la búsqueda de mutaciones específicas por hibridación de los productos amplificados por RT-PCR a partir de las muestras de plasma (Kozal y col., 1996; Stuyver y col., 1997). Estas técnicas son rápidas y fáciles de realizar, pero deben ser adaptadas continuamente según se describen nuevas mutaciones asociadas a resistencia y pueden darse falsos negativos por la presencia de polimorfismos en los nucleótidos adyacentes.

Métodos basados en secuenciación: La secuenciación es el método genotípico de referencia, ya que proporciona información completa acerca de la secuencia que se esté analizando, permite identificar nuevas mutaciones de resistencia y facilita la caracterización de los diversos patrones mutacionales por los que el VIH-1 adquiere resistencia a los distintos fármacos en el contexto del tratamiento combinado. A partir de la secuencia de nucleótidos se obtiene la secuencia de aminoácidos y se compara con la secuencia consenso para detectar las mutaciones. Existen diferentes bases de datos (Shafer, 2006) y métodos comerciales (Hoover y col., 2000), para la interpretación del genotipo. Estas técnicas son rápidas, de bajo coste y fáciles de realizar, sin embargo, sólo proporcionan evidencias indirectas de resistencia. La interpretación de los resultados depende del conocimiento del fenotipo y de la actividad antiviral *in vivo* de los distintos fármacos frente a virus portadores de las diferentes mutaciones de resistencia. Esto dificulta estandarizar un criterio en el análisis de las mutaciones obtenidas (Hanna y D'Aquila, 2001), sobre todo cuando aparecen mutaciones nuevas (Paolucci y col., 2003) o patrones de mutaciones muy complejos (Ross y col., 2001).

3.3.2. Métodos fenotípicos

Los métodos fenotípicos permiten obtener una medida más directa y cuantitativa de la susceptibilidad a los antirretrovirales, midiendo la capacidad del virus para crecer en presencia de distintas concentraciones del fármaco *in vitro*. El resultado obtenido se conoce como concentración inhibidora del 50% o del 90% (IC₅₀ o IC₉₀), que es la concentración del fármaco necesaria para reducir la replicación viral, en cultivo celular, en el 50% o en el 90%, respectivamente, y permite compararla con la requerida para inhibir una cepa de referencia de laboratorio. Esta permite obtener el número de veces (*fold*) que aumenta la IC₅₀ o IC₉₀ de un aislado con relación a la cepa control sensible. Existen dos tipos de pruebas de resistencias fenotípicas: los métodos clásicos y los basados en virus recombinantes.

ITIAN	TAMs						Discriminan ITIAN						Multiresistencia					
	M41	D67	K70	L210	T215	K219	K65	K70	L74	V75	Y115	M184	T69	Q151	A62	V75	F77	F116
3TC							R	E		I		VI	Ins	M	V	I	L	Y
FTC							R	E		I		VI	Ins	M	V	I	L	Y
ABC	L	N		W	FY		R	E		TMI	F	VI	InsD	M	V	TMI	I	Y
ddI	L	N		W	FY		R	E	VI	TMI		VI	InsD	M	V	TMI	I	Y
TDF	L	N	R	W	FY		R	E		MI	F		Ins	M	V	MI	I	Y
d4T	L	N	R	W	FY	QE	R			TMI			Ins	M	V	TMI	I	Y
AZT	L	N	R	W	FY	QE				I			Ins	M	V	I	I	Y

Negrita: reducen susceptibilidad; **Rojo:** alta resistencia fenotípica y/o reducida respuesta virológica. TAMs y la inserción T69 reducen la susceptibilidad por la escisión de ITIAN monofosfatos. Mutaciones discriminatorias y Q151M+complejo (62, 75, 77, y 116) previene la incorporación de ITIAN trifosfatos. **Incremento de susceptibilidad:** M184VI a AZT, TDF y d4T; L74VI a AZT y TDF; K65R a AZT. **Otras mutaciones:** K43EQN, E44DA, V118I, H208Y, D218E, H221Y, L228H/R, aparecen en combinación con TAMs y facilitan resistencia cruzada a multiples ITIANs.

ITINN

	A98	L100	K101	K103	V106	V108	E138	V179	Y181	Y188	G190	P225	F227	M230	P236	K238
NVP	G	I	EP	N	AM	I	K	DEF	CIV	LHC	ASE	H	LC	L		NT
EFV	G	I	EP	NS	AM	I	K	DEF	CIV	LHC	ASE	H	C	L		NT

Negrita: reducen susceptibilidad. **Rojo:** alta resistencia fenotípica y/o reducida respuesta virológica. **Otras mutaciones:** Asociadas con el tratamiento a ITINN y/o responsables de la resistencia fenotípica: K101NH, K103TH, G190QCTV. **Polimorfismos:** A98S, K101RQ, K103R, V106I, E138A, V179I, y K238R poco efecto en la resistencia a estos fármacos. L318F es una mutación seleccionada con ITIAN que genera un bajo nivel de resistencia a NVP. N348I reduce la susceptibilidad a NVP y posiblemente a EFV. I135T y L283I pueden actuar sinérgicamente con otras mutaciones de resistencia a ITANs. **Incremento de susceptibilidad:** P236L a NVP; L100I y Y181C al AZT y TDF.

IPs (Mutaciones

Primarias)	D30	V32	V33	M46	I47	G48	I50	I54	L76	V82	I84	N88	L90
ATV/r			F	IL	V	V	L	VALM		AF	V	S	M
DRV/r		I	F		VA		V	LM	V	F	V		M
FPV/r		I	F	IL	VA		V	LM	V	F	V		M
IDV/r		I		IL	V			VALM	V	AFTS	V	S	M
LPV/r		I	F	IL	VA		V	VALM	V	AFTS	V		M
NFV	N		F	IL	V	V		VALM		AFTS	V	DS	M
SQV/r						V		VALM		TF	V	S	M
TPV/r		I	F	IL	V			VA		TFSL	V		M

Rojo: Reducen susceptibilidad y respuesta virológica. **Rojo:** contraindicados cuando esta mutación está presente. Posiciones 30, 32, 47, 48, 50, 82, y 84 están situadas en la hendidura de la proteasa. Posiciones 46, 47, 48, 50, y 54 están el bolsillo de la proteasa. Posiciones 33, 76, 88, y 90 impiden la unión del inhibidor. **Otras mutaciones:** L33I, M46V, G48M, I54ST, G73CA, V82M, I84AC, y N88TG. **Incremento de susceptibilidad:** I50L a todos los IPs excepto al ATV; I50V a TPV; N88S a FPV; L76V a ATV y SQV. **Mutaciones secundarias:** mutaciones en las posiciones 10, 11, 23, 24, 43, 53, 58, 71, 73, 74, 83, 89.

Figura 6. Mutaciones asociadas a resistencia de la RT y la PR. Figura adaptada a partir de “HIV RT and Protease Séquense Database” (Universidad de Standford; <http://hivdb.stanford.edu>).

3.3.2.1. Métodos clásicos de fenotipo

Los primeros métodos fenotípicos desarrollados requerían aislar y cuantificar el virus del paciente a partir de linfocitos de sangre periférica. El ensayo se realizaba infectando PBMCs de donante sano, estimuladas en presencia de diluciones seriadas del fármaco. La susceptibilidad se valoraba en base a la menor concentración del fármaco capaz de suprimir la replicación viral determinada en relación a la cuantificación del antígeno p24 o muerte celular (Japour y col., 1993). Aunque estos sistemas tienen la ventaja de evaluar directamente la sensibilidad del virus aislado del paciente, presentan numerosos inconvenientes como su extrema laboriosidad, su alto coste y su escasa reproducibilidad. Además, el aislamiento y la expansión de las poblaciones virales a partir de linfocitos pueden provocar la selección de subpoblaciones virales o variantes latentes que alteren el perfil de sensibilidad.

3.3.2.2. Métodos basados en virus recombinantes

Con el fin de solventar los problemas de estandarización y los sesgos en cultivo de los métodos de fenotipo convencionales, en los últimos años se han desarrollado nuevos abordajes basados en la generación de virus recombinantes, portadores de los genes de interés del paciente, ya sea la RT y/o la PR (Kellam y Larder, 1994; Boucher y col., 1996; Shi y Mellors, 1997; Race y col., 1999; Iga y col., 2002; Klimkait, 2002) o el gen env (Troupin y col., 2001; Van Baelen y col., 2007; Whitcomb y col., 2007), que permiten determinar la sensibilidad a los FARV de forma eficaz y relativamente rápida.

Si nos centramos en los métodos que estudian el gen pol, algunos de ellos se han semiautomatizado y se encuentran en la actualidad disponibles en laboratorios comerciales. Los tres métodos fenotípicos comerciales que utilizan un ensayo de virus recombinante son “Antivirogram” (Hertogs y col., 1998), “Phenosense” (Petropoulos y col., 2000) y “Phenoscript” (Race y col., 1999). Estos métodos amplifican mediante RT-PCR la PR y RT del VIH-1 a partir de muestras de plasma y generan virus recombinantes mediante transfección en líneas tumorales. La IC₅₀ de los virus recombinantes se determina en cultivo, midiendo la viabilidad o la señal de un gen indicador en las células infectadas en presencia de diferentes concentraciones de antirretrovirales. Existen una serie de diferencias metodológicas entre las tres técnicas que se señalan en la tabla 3.

Los tres métodos han demostrado poseer un elevado nivel de correlación para la determinación de la sensibilidad/resistencia a la mayoría de antirretrovirales (Miller y col., 2001). Sin embargo, cada uno de ellos presenta ventajas e inconvenientes. Por un lado, *Antivirogram*, requiere una amplificación y titulación previa en cultivo, haciendo el test más largo y laborioso, y posibilitando la selección de variantes mejor adaptadas al cultivo. Por

otro, *Phenosense* y *Phenoscript*, generan virus recombinantes de un único ciclo de replicación, por lo que en el caso de variantes virales de escasa capacidad replicativa los niveles del gen indicador obtenidos pueden ser bajos, y dificultar la interpretación de las pruebas de resistencia. A pesar de que estos métodos son más rápidos y reproducibles que los convencionales, siguen siendo caros, laboriosos y menos sensibles que los métodos genotípicos para detectar subpoblaciones minoritarias.

Tabla 3. Métodos comerciales para la determinación de la sensibilidad a antirretrovirales basados en virus recombinantes.

	Antivirogram (Virco)	Phenoscript (Viralliance)	Phenosense (Virologic)
Sensibilidad	1000 copias/ml	500copias/ml	500copias/ml
Fragmento	2,2 Kb	1,5 Kb	1,5 Kb
Región estudiada	PR y RT	PR o RT	PR y RT
Recombinación	Homóloga/vector deleciónado	Homóloga/vector deleciónado	Clonaje en vector luciferasa
Transfección	Electroporación-MT-4	Fosfato cálcico-HeLa	Fosfato cálcico-293
Virus	Ciclo múltiple	Ciclo único	Ciclo único
Titulación	MTT	No	No
Infección	MT4	P4	293
Lectura	MTT	β -galactosidasa	Luciferasa
Duración	20-22 días	5 días	8-10 días

3.3.3. Fenotipo virtual

El fenotipo virtual es un sistema cuantitativo desarrollado por Virco (VirtualPhenotype) en el que a partir de una amplia base de datos con información fenotípica y genotípica de miles de muestras se intenta predecir el fenotipo en función del genotipo (Larder y col., 2000). Una vez obtenido el genotipo de resistencias, se identifican en la base de datos los distintos fenotipos asociados a dicho genotipo, y se calcula la media de IC₅₀ de todas las muestras para cada fármaco. La principal ventaja del fenotipo virtual es que proporciona información rápida acerca de la sensibilidad del VIH-1 a todos los antirretrovirales, una vez conocido su genotipo, sin que sea necesario llevar a cabo una prueba fenotípica. Los estudios de comparación entre el fenotipo real y el virtual han demostrado una buena correlación entre el 80-90% (Verbiest y col., 2000). Sin embargo, el fenotipo virtual tiene el inconveniente de no reconocer la secuencia entera del genotipo, sino tan sólo las mutaciones que considera relevantes y, por tanto, no reconoce mutaciones seleccionadas por nuevas combinaciones de fármacos o nuevos antirretrovirales.

4. CAPACIDAD REPLICATIVA DE VIRUS RESISTENTES A ANTIRRETROVIRALES.

A pesar de los frecuentes fallos virológicos, en un número importante de pacientes con TARGA aparecen respuestas CD4+/CV discordantes, que se definen como CD4 estables o en aumento, en presencia de replicación viral (Deeks y col., 2000; Deeks y col., 2001; Barbour y col., 2002; Sufka y col., 2003; Kaplan y col., 2005). Para explicar este fenómeno se han propuesto diferentes mecanismos tanto inmunológicos como virológicos. Entre los primeros se ha postulado que las variantes resistentes podrían tener una capacidad citopática disminuida (mayor sensibilidad al TARGA de las variantes X4 por ejemplo) que reduciría su capacidad de replicación en el timo (Stoddart y col., 2001), o de inducción de apoptosis por activación (Hazenbergh y col., 2000). Otra alternativa propuesta es que el TARGA permita la regeneración de la respuesta inmunológica específica contra el VIH (Cao y col., 1995; Rosenberg y col., 1997). Sin embargo, varios estudios apuntan a una pérdida directa en la capacidad replicativa del virus, debida a la selección de mutaciones de resistencia, como la causa de este beneficio inmunológico observado en presencia de una alta CVP (Quinones-Mateu y col., 2000; Martínez-Picado y col., 2000).

4.1. Fitness y resistencia.

Desde un punto de vista experimental, el fitness viral se puede definir como la capacidad de un virus para replicar en un ambiente determinado y producir una progenie infecciosa (Menéndez-Arias y col., 2003). Se trata de un parámetro dinámico que depende de múltiples factores tanto virales como del huésped. Cualquier cambio en los genes del virus que modifique su capacidad replicativa, o diferentes presiones selectivas como el sistema inmune o el tratamiento antirretroviral, contribuyen a la selección de un espectro de cuasiespecies determinado en cada paciente. El término capacidad replicativa, se referiría únicamente al valor obtenido de manera experimental en ausencia de otros factores ambientales, sin embargo, en los últimos años, estos dos términos han llegado a confundirse, utilizándose indistintamente.

El tratamiento antirretroviral actúa como un componente modulador favoreciendo la selección de variantes resistentes a los fármacos. La selección de mutaciones de resistencia aumenta la capacidad del virus para replicar en presencia del fármaco, sin embargo, en ocasiones emergen a expensas de una pérdida en el fitness viral en ausencia del mismo. Las primeras mutaciones en seleccionarse suelen conferir un elevado grado de resistencia y

perdida de capacidad replicativa, pero posteriormente se van seleccionando mutaciones compensatorias que facilitan la recuperación del fitness viral. El uso prolongado de las terapias antirretrovirales ha favorecido el incremento en el número de pacientes con amplia experiencia farmacológica y resistencia a prácticamente todos los fármacos. En estas circunstancias las opciones terapéuticas son limitadas. Sin embargo, algunos estudios han descrito una asociación inversa entre el bajo fitness y la patogénesis del virus (Nijhuis y col., 2001; Quinones-Mateu y Arts, 2002), despertando en los últimos años un gran interés por el estudio del fitness viral en el VIH-1 y su posible aplicación a la práctica clínica. Una de las utilidades potenciales de la determinación del fitness viral sería la supresión selectiva de fármacos en el paciente multitratado en fracaso. De esta manera se mantendrían aquellos fármacos que seleccionan las mutaciones asociadas a baja capacidad replicativa. Trabajos realizados (Deeks y col., 2005) muestran que la retirada de ITIAN se asocia con un aumento de la CV debido a la emergencia de virus WT, mientras que la retirada del IP o del ITINN mantiene los niveles de CV y CD4. Esto sugiere que los ITIAN originan una presión selectiva que genera virus de baja capacidad replicativa. De confirmarse, estos resultados apoyarían la retirada selectiva de fármacos que redundaría en una disminución de la toxicidad, sin alterar la eficacia relativa del tratamiento al seleccionarse virus mutantes con baja capacidad replicativa.

4.2. Sistemas de estudio de la capacidad replicativa.

La principal limitación para estudiar la asociación entre patogénesis y fitness viral, es la dificultad de estandarizar un método para valorar el fitness viral y que esta medida sea representativa de lo que ocurre *in vivo*. El análisis de aislados virales a partir de PBMCs estimulados del paciente, proporciona la información más completa del virus, pero dificulta la comprensión de qué cambios, entre toda la secuencia son los responsables de la pérdida de fitness (Simon y col., 2003). Por otro lado, el estudio de mutaciones puntuales o genes concretos mediante la utilización de virus recombinantes, facilita la asociación de cambios del fitness a unos patrones concretos de mutaciones asociadas a resistencia, pero no tiene en cuenta factores epistáticos fuera de las secuencias de estudio que podrían condicionar el resultado (Bonhoeffer y col., 2004). Además de estos conceptos teóricos, para su aplicación en la clínica, los métodos deben intentar ser rápidos y reproducibles.

Todas estas premisas han llevado al desarrollo de múltiples modelos experimentales *in vitro*:

Ensayos enzimáticos: Valoran el efecto de las mutaciones de resistencia sobre la eficacia catalítica de las enzimas de la PR o de la RT (White y col., 2002).

Cinéticas de replicación: Valoran la eficacia de replicación de cada una de las variantes virales en cultivos separados, midiendo la producción de p24 o la actividad de la RT (Prado y col., 2002). Recientemente se han desarrollado ensayos de un ciclo de replicación basados en virus recombinantes. Estos métodos valoran la capacidad replicativa mediante pseudovirus que contienen un gen indicador (Luciferasa, GFP) o células que expresan el gen de la β -galactosidasa, que permiten cuantificar la replicación viral a 24 o 48 horas (Zennou y col., 1998; Deeks y col., 2001).

Ensayos de competición: Es el método más sensible, ya que mide la proporción relativa de cada una de las variantes en competición a lo largo del tiempo. Se han ido desarrollando diferentes técnicas de esta modalidad: ensayos de secuenciación (Martinez-Picado y col., 2000), heterodúplex (Quinones-Mateu y col., 2000), PCR en tiempo real (Weber y col., 2003) y virus recombinantes con genes indicadores (Zhang y col., 2004; Neumann y col., 2005; Weber y col., 2006). El objetivo de estos abordajes es reducir la laboriosidad y los tiempos elevados que dificultan su aplicación a la práctica clínica.

En los últimos años, los sistemas basados en virus recombinantes han demostrado ser útiles para valorar el impacto de las mutaciones de resistencia sobre la capacidad replicativa. Como los ensayos de competición siguen siendo muy laboriosos, un sistema basado en virus recombinantes de ciclo único, adaptado a partir del sistema de susceptibilidad a antirretrovirales de “PhenoSense”, es actualmente uno de los métodos más usados para el estudio de la capacidad replicativa del VIH-1 (Deeks y col., 2001; Deeks y col., 2003; Barbour y col., 2004). Sin embargo, una posible limitación de estos métodos basados en un solo ciclo de replicación, es su baja sensibilidad para detectar pequeñas diferencias de capacidad replicativa.

4.3. Mutaciones de resistencia en pol que provocan una pérdida de capacidad replicativa.

El análisis *in vitro* de numerosos clones con mutaciones asociadas a resistencia, y experimentos con retirada de tratamiento en los que los virus mutantes revierten a WT, ha permitido valorar el impacto de las mutaciones asociadas a resistencia sobre la capacidad replicativa del virus. Así, se ha observado en la PR, que la adquisición de mutaciones que confieren resistencia, implican un cierto coste biológico (Eastman y col., 1998; Martinez-

Picado y col., 1999; Nijhuis y col., 1999; Martínez-Picado y col., 2000; Sugiura y col., 2002). Estas mutaciones, denominadas primarias, suelen dificultar la unión del sustrato al sitio activo, provocando una pérdida de capacidad replicativa: elevada, en el caso de las mutaciones, D30N, M46I/L, G48V, V82A/T/F/S (Antinori y col., 2001; Devereux y col., 2001; Kantor y col., 2002; Svedhem y col., 2002; Yusa y col., 2002); moderada, en virus portadores de los cambios I54V, I84V, N88D (Devereux y col., 2001); o baja, en el caso de los mutantes, L10I/V, K20R, M36I, L63P, A71V/T, V77I, V82A, L90M (Mammano y col., 2000; Devereux y col., 2001). Sin embargo, a pesar de esta pérdida de capacidad replicativa, algunas de estas mutaciones siguen manteniéndose después de la retirada del tratamiento (Hance y col., 2001; Svedhem y col., 2002), lo que sugiere la presencia de mutaciones compensatorias que conceden cierta ventaja selectiva. Estas mutaciones, pueden encontrarse en la propia secuencia de la PR (Chen y col., 1995; Jacobsen y col., 1995; Markowitz y col., 1995; Rose y col., 1996; Schock y col., 1996; Eastman y col., 1998; Nijhuis y col., 1999), en otras secuencias del genoma, como los sitios de procesamiento de la poliproteína Gag (p2/p7, p7/p1, p1/p6, MA/CA, CA/p2) (Cote y col., 2001; Feher y col. 2002; Pettit y col., 2002; Matsuoka-Aizawa y col., 2003; Myint y col., 2004;), e incluso, lejos de los sitios de procesamiento (Matsuoka-Aizawa y col., 2003), proporcionando mejores sustratos para la PR e incrementando la eficacia del proceso de maduración del virión. Otro mecanismo que mejora la eficacia de maduración viral es un aumento del porcentaje de expresión de la poliproteína Gag-pol mediante mutaciones en el extremo 3' de Gag que favorecen el cambio en la fase de lectura (Doyon y col., 1998).

Las mutaciones que confieren resistencia a ITINN, suelen seleccionarse rápidamente y tener escaso impacto sobre la capacidad replicativa. Este es el caso de mutaciones como L100I, K103N, V179D, Y181C/I, Y188C/H/L. Sin embargo, también hay mutaciones asociadas a resistencia a estos fármacos que ocasionan una disminución en la infectividad del virus: V106A, P225H, M230L, P236L, G190C/Q/V/E/T (Menendez-Arias y col., 2003).

Por otro lado, dentro de las mutaciones que confieren resistencia a ITIAN se diferencian dos grupos: las TAMs (M41L, D67N, K70R, L210W, T215F/Y y K219Q/E), que no presentan un gran impacto en la capacidad replicativa, con excepción de la mutación L210W (Harrigan y col., 1996; Harrigan y col., 1998); y las mutaciones que discriminan nucleótidos como M184V, K65R, L74V y K70E que presentan una pérdida significativa del fitness viral, como consecuencia de una baja procesividad de la RT (Back y col., 1996; Sharma y Crumpacker, 1997; Miller y col., 1998; Sharma y Crumpacker, 1999; White y col., 2002).

Se ha aceptado que en general las mutaciones de la RT reducen el fitness en menor medida que las de la PR. Probablemente porque muchas de las mutaciones que confiere resistencia en la RT están alejadas del sitio de unión al dNTP como ocurre con los ITINN o el AZT y d4T (TAMs). Sin embargo, hay pocos trabajos que hayan estudiado el impacto de la PR o RT por separado (Bleiber y col., 2001; Weber y col., 2003). Además, con la aparición de nuevos fármacos, que han aumentado la prevalencia de mutaciones que actúan mediante mecanismo de discriminación de nucleótidos, y que parecen tener un mayor impacto sobre la capacidad replicativa del virus, cobra mayor interés poder analizar la capacidad replicativa de cada una de estas proteínas individualmente. Este es el caso de mutaciones como K65R, que se han analizado individualmente y en combinación con otras mutaciones como M184V, K70E o L74V, donde se ha observado una gran pérdida de capacidad replicativa, debido a una baja procesividad de la RT_{K65R/M184V} y RT_{K65R/K70E} (White y col., 2002; Kagan y col., 2007), o escasa capacidad para usar nucleótidos naturales de la RT_{K65R/L74V} (Deval y col., 2004). Sin embargo, el cambio K65R no se ha estudiado en combinación con otras mutaciones, como Q151M, con la que se ha encontrado una alta frecuencia de asociación (Winston y col., 2002; Valer y col., 2004; Winston y col., 2004; Segondy y col., 2005). El estudio del impacto en la capacidad replicativa de esta asociación constituye uno de los objetivos de este trabajo.

OBJETIVOS

Los objetivos planteados en este trabajo son:

1. Desarrollar un modelo basado en la generación de virus recombinantes en el gen *pol* para el estudio fenotípico de aislados virales de pacientes con infección por el VIH-1.

2. Aplicar esta tecnología a los siguientes aspectos de interés clínico:
 - 2.1. Resistencia fenotípica a antirretrovirales.
 - 2.2. Estudio de los efectos sinérgicos y antagónicos de combinaciones de dos inhibidores análogos a nucleótidos.
 - 2.3 Estudio de la capacidad replicativa de virus resistentes a antirretrovirales.

3. Analizar la capacidad replicativa de virus portadores de la mutación de resistencia Q151M de forma aislada o en combinación con la mutación K65R.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. CÉLULAS PROCARIÓTICAS.

1.1. Cepas.

Se han utilizado las cepas competentes de *Escherichia coli* XL1-Blue [*recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17*, *supE44*, *relA1*, *lac* [*F*⁺*proAB*, *lacI*^q*ZΔM15 Tn10 (tet^r)*]], y DH5α [*F*⁺, *Φ80dlacZΔM15*, *Δ(lacZYA-argF)*, U169, *recA1*, *endA1*, *hsdR17*(*r_k*⁻, *m_k*⁺), *phoA*, *supE44*, *λ*⁻, *thi-1*, *gyrA96*, *relA1*], suministradas por Stratagene e Invitrogen respectivamente. La primera se utilizó para los experimentos de mutagénesis dirigida, y la segunda para el clonaje y crecimiento rutinario de plásmidos.

1.2. Transformación y medios de cultivo.

Las células se transformaron por choque térmico siguiendo el protocolo y las recomendaciones del fabricante, y se crecieron en medio LB según se describe en Sambrook y col. (1989). Los cultivos bacterianos se conservaron a -70° C en el mismo medio de crecimiento con glicerol al 20%.

2. ÁCIDOS NUCLEICOS.

2.1. Purificación de ADN.

2.1.1. Purificación de ADN plasmídico.

Los plásmidos se han purificado a partir de cultivos bacterianos de 5, 100 o 500 ml, según se tratara de mini, midi o maxipreparaciones, utilizando las columnas “Wizard *Plus* SV Minipreps” (Promega), “Qiagen-tip 100” (Qiagen) o “Qiagen-tip 500” (Qiagen) respectivamente. Este método combina la lisis alcalina (Birnboim y Doly, 1979), con la purificación a través de columnas de intercambio aniónico.

2.1.2. Purificación de fragmentos de ADN.

Los fragmentos de ADN, obtenidos mediante PCR o restricción, se purificaron de geles de agarosa (Nusieve, Cambrex) mediante cartuchos para extracción rápida GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare).

2.1.3. Purificación de ADN celular.

El ADN celular se purificó con el kit “Qiamp DNA blood Mini kit” (Qiagen) siguiendo el protocolo suministrado por el fabricante.

2.2. Tratamiento con enzimas y clonaje.

La manipulación del ADN para el clonaje se llevó a cabo siguiendo la metodología descrita en Sambrook y col. (1989). Las enzimas de restricción y modificación del ADN se utilizaron según las indicaciones del fabricante. Para las ligaciones se empleó la ligasa de ADN del fago T4 (New England Biolabs) en el tampón suministrado por el proveedor, durante 16 horas a 16° C.

2.3. Mutagénesis dirigida.

Los cambios puntuales en la secuencia del vector pNL4-3 se introdujeron mediante el sistema de mutagénesis *in vitro* “QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit” de Stratagene. Este método se basa en la amplificación mediante PCR de un plásmido molde con dos oligonucleótidos complementarios a las cadenas opuestas del vector y que incluyen las mutaciones de interés. Las reacciones de mutagénesis se llevaron a cabo en 50 µl de un tampón Tris-HCl 20 mM, pH 8.8, que contenía KCl 10 mM, (NH₄)₂SO₄ 10 mM, MgSO₄ 2 mM, Triton X-100 al 0.1%, seroalbúmina libre de nucleasa (BSA) al 0.1 mg/ml, 125 ng de cada oligonucleótido mutagénico, 50 ng de plásmido molde, dNTPs a una concentración de 500 µM cada uno y 2,5 unidades de la ADN polimerasa *Pfu Turbo*. Las muestras se desnaturalizaron a 95° C durante 30 segundos y a continuación se realizaron 18 ciclos de 30 segundos de desnaturalización a 95° C, 1 minuto de unión a 55° C y 2 minutos de extensión a 68° C por kb del plásmido molde. Este producto se trató con 10 U de la endonucleasa *Dpn I* específica para ADN metilado durante 1 hora a 37° C. Durante este paso se produce la degradación de las cadenas molde que se encuentran metiladas. De esta manera la mayor parte del ADN presente en la muestra procede de las cadenas sintetizadas *in vitro*, y por tanto contendrá las mutaciones introducidas en los oligonucleótidos. A continuación, se transformó 1 µl del producto de la reacción anterior en las células competentes *E. Coli* “XL1-Blue Supercompetent cells”. Dada la alta eficacia del proceso, se seleccionaron 6 colonias por reacción y se secuenciaron para comprobar la presencia de la mutación.

2.4. Secuenciación.

Las reacciones de secuenciación se llevaron a cabo utilizando el kit de secuenciación “Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction” (Applied Biosystems), basado en el método de terminación de cadena con dideoxinucleótidos descrito en Sanger y col. (1977). Las muestras se desnaturalizaron a 96° C durante 1 minuto y a continuación se realizaron 25 ciclos de: 10 segundos de desnaturalización a 96° C, 10 segundos de unión a 50° C y 4 minutos de extensión a 60° C. Las reacciones de PCR se resolvieron en el servicio de secuenciación del ISCIII mediante un secuenciador automático ABI 3700 DNA Analyzer (Applied Biosystems).

2.5. Plásmidos.

-pNL4-3. Clon recombinante de las cepas NY5 (5') y LAV (3') que contiene el genoma completo del VIH-1 y genera una progenie infecciosa tras su infección en numerosas líneas celulares y también en linfocitos (National Institutes of Health AIDS Research and Reference Reagent Program, número de catálogo 3418) (Adachi y col., 1986).

-pNL4.3LucR-E-. Clon proviral derivado del anterior que contiene el gen de la luciferasa de luciérnaga inserto en el gen *nef* (National Institutes of Health AIDS Research and Reference Reagent Program, número de catálogo 3418) (Connor y col., 1995; He y col., 1995). Posee dos cambios del marco de lectura (5' Env y vpr aa 26) que hacen que no exprese el gen *env* ni *vpr*, por lo que requiere la coexpresión de alguna envuelta viral para generar virus infecciosos de ciclo único.

-pcDNA₃-VSV. Cedido por el Dr. Arenzana (Instituto Pasteur, Paris, Francia). Plásmido que expresa la glicoproteína G del Virus de la estomatitis vesicular (VSV) (Oberlin y col., 1996).

-pHXBnPLAP-IRES-N⁺. Se trata de un clon infectivo modificado a partir del plásmido HXB2 que expresa el gen de la fosfatasa alcalina de placenta humana (PLAP) bajo la fase de lectura del gen *nef*. Esta construcción recupera la expresión de Nef gracias a la introducción de un sitio de reconocimiento interno del ribosoma (IRES) del virus de la encefalomiocarditis (EMCV), seguido de los 34 aminoácidos del extremo 5' de Nef que habían sido delecionados (National Institutes of Health AIDS Research and Reference Reagent Program, número de catálogo 3610) (Chen y col., 1996).

-pRL-TK. Plásmido de expresión que contiene el gen codificante para la proteína Renilla luciferasa (Promega, número de catálogo 3418). Este gen, que se aisló de la medusa Renilla reniformis (Lorenz y col., 1991), codifica una proteína monomérica de 36kD que no requiere modificaciones post-traduccionales para ser activa, y que por tanto, puede utilizarse como gen marcador (Matthews y col., 1977).

2.6. Construcción de vectores provirales con genes indicadores.

Se han diseñado y construido vectores portadores de genes indicadores luciferasa a partir de un clon modificado del vector pNL4-3, donde se ha introducido mediante mutagénesis dirigida una diana de restricción *NotI* (nt 8797) en el extremo 5' de la región codificante del gen *nef*. Para ello, en un primer paso se construyó el plásmido pCDNA₃NL_{Bam/Xho} mediante el clonaje del fragmento BamHI-XhoI (nt 8465-8887) de pNL4-3, en las mismas dianas de pCDNA3.1/Zeo(+) (Invitrogen) (figura 7). Este plásmido se utilizó como molde para introducir la diana de restricción *NotI* mediante mutagénesis dirigida usando los oligonucleótidos mut-4.3Not-Up and mut-4.3Not-Down (tabla 4). Finalmente, el fragmento BamHI-XhoI se clonó en los mismos sitios de restricción del pNL4-3 y se confirmó la presencia de la diana de restricción *NotI* mediante secuenciación.

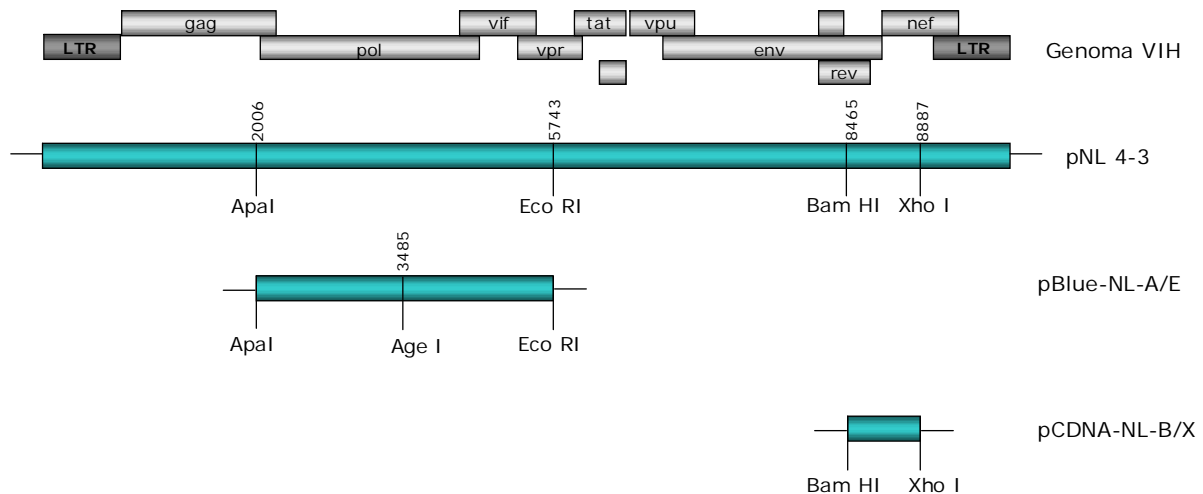


Figura 7. Vectores de subclonaje. En el esquema se representa el genoma completo del VIH-1, y los plásmidos a partir de los cuales se han construido los diversos mutantes. En cada uno se indica las dianas de restricción empleadas y la posición que ocupan.

Esta construcción, denominada **pNL4-3NotI** permite la expresión de genes indicadores clonados bajo la fase de lectura del gen *nef*. A continuación se detallan los diferentes vectores provirales con genes indicadores construidos en este proyecto (figura 8).

2.6.1. pNL4-3Luc.

Esta construcción se generó sacando el gen de la Luciferasa de luciérnaga del plásmido pNL4-3.Luc.R-E- con las enzimas de restricción *NotI* y *XhoI*, y clonandolo en los mismos sitios del vector pNL4-3NotI.

2.6.2. pNL4-3LucIRESnef.

Para la construcción de este vector subclonamos el fragmento *NotI*-*XhoI* del plásmido pHXBnPLAP-IRES-N+, que incluye el gen de la fosfatasa alcalina de placenta humana (PLAP) seguido de un sitio de reconocimiento interno del ribosoma (IRES) del virus de la encefalomiocarditis (EMCV) y los 34 aminoácidos del extremo 5' de *Nef* que habían sido deleccionados, en el vector pBluescript II SK(-) (Stratagene). A continuación se sustituyó el gen PLAP por el gen de la Luciferasa de luciérnaga. Para ello el gen de la Luciferasa de luciérnaga se amplificó mediante PCR del plásmido pNL4-3.Luc.R-E- con los oligonucleótidos *Not*-Luc-Up y *EcoRI*-Luc-Down (tabla 4), se digirió con *NotI* y parcialmente con *EcoRI* y se ligó en los mismos sitios de restricción del vector de subclonaje. Finalmente, el fragmento *NotI*-*XhoI* se devolvió al plásmido pNL 4-3NotI.

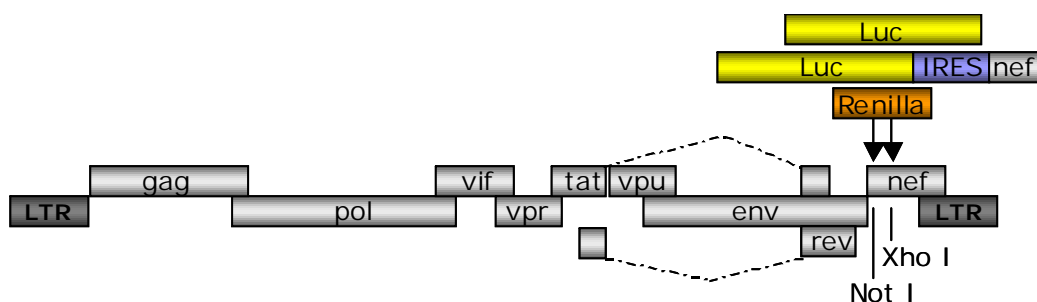


Figura 8. Vectores provirales con genes indicadores. Representación esquemática de los vectores provirales con genes indicadores pNL4-3Luc, pNL4-3LucIRESnef y pNL4-3Ren. El fragmento *NotI*-*XhoI* del gen *nef* se sustituyó por el gen de la Luciferasa de luciérnaga (Luc), el gen de la Luciferasa de luciérnaga seguido de un sitio de reconocimiento interno del ribosoma (IRES) del virus de la encefalomiocarditis (EMCV) y los 34 aminoácidos del extremo 5' de *Nef* que habían sido deleccionados, y el gen *Renilla* luciferasa respectivamente.

2.6.3. pNL4-3Ren.

Este vector se generó sustituyendo el gen *nef* por el gen *Renilla* Luciferasa. El gen *Renilla* Luciferasa se amplificó mediante PCR del plásmido pRL-TK con los oligonucleótidos *Not*-

Ren-Up and Xho-Ren-Down (tabla 4) que incluyen las dianas de restricción *NotI* y *XhoI* respectivamente. A continuación se digirió el producto de PCR con las enzimas *NotI* y *XhoI* y se clonó en los mismos sitios del plásmido pNL 4-3*NotI*.

2.6.4. pNL4-3Ren.R-E-.

Esta construcción se generó clonando el gen Renilla Luciferasa en el plásmido pNL4-3.Luc.R-E-. El gen Renilla Luciferasa se extrajo del plásmido pNL4-3Ren mediante digestión con las enzimas *NotI* y *XhoI*, y se clonó en los mismos sitios del vector pNL4-3.Luc.R-E-.

Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados en la modificación y construcción de virus recombinantes.

Nombre	Oligonucleótido (5'→3')	Función
mut-4.3 <i>NotI</i> -Up	GCTATAAGATGGGTGGG <u>CGGCCG</u> CAAAAAGTAGTGTGATTGG	Mutagénesis <i>Not I</i>
mut-4.3 <i>NotI</i> -Down	CCAATCACACTACTTTTT <u>GCGGCCG</u> GCCACCCATCTTATAGC	
<i>NotI</i> -Luc-Up	GGAAAGGATTTTCTATAAGATGGGTGGG <u>CGGCCG</u>	Amplificación gen Luciferasa
<i>EcoRI</i> -Luc-Down	<u>GGAATTC</u> GTCGAGTTACAATTTGGACTTTCGCCCTTCTTGGCC	
<i>NotI</i> -Ren-Up	ATAAGAAT <u>GCGGCCG</u> CTACTTCGAAAGTTTATGATCCAGAAC	Amplificación gen Luciferasa de Renilla
<i>XhoI</i> -Ren-Down	CCG <u>CTCGAG</u> TTATTGTTCATTTTGAGAACTCGCTC	
mut- <i>NcoI</i> -Up	CCAGTAAATTAAGCCAGCCATGGATGGCCCAAAG	Mutagénesis <i>Nco I</i>
mut- <i>NcoI</i> -Down	CTTTGGGCCAT <u>CCATGG</u> CTGGCTTAAATTTACTGG	
<i>ApaI</i> -LacZ-Up	GCA <u>GGGCCG</u> CGCCCAATACGCAAACCGCCTC	Amplificación del gen lacZ para mutantes de deleción de pol, PR y RT
<i>AgeI</i> -LacZ-Down	CATGT <u>ACCGGT</u> GCCATTCGCCATTCAGGCTGCGC	
<i>NcoI</i> -LacZ-Up	CATG <u>CCATGG</u> GCGCCCAATACGCAAACCGCCTC	
<i>NcoI</i> -LacZ-Down	CATG <u>CCATGG</u> GCCATTCGCCATTCAGGCTGCGC	
27-pol-Up	GCCAAAATTGCAGGGCCCTAGGA	Amplificación de las secuencias pol, PR y RT de virus de pacientes
28-pol-Down	GATGGGTCATAATACTCCATGT <u>ACCGGT</u> TC	
RT- <i>NcoI</i> -Up	CATG <u>CCATGG</u> GATGGCCCAAAGTTAAACAATGGCC	
Pr- <i>NcoI</i> -Down	CATG <u>CCATGG</u> GCTGGCTTAAATTTACTGGTACAGTC	

En la columna de la izquierda se indica el nombre y en la de la derecha la función para la que se han usado. Los nucleótidos subrayados corresponden a la diana de restricción.

2.7. Construcción de mutantes.

2.7.1. Modificaciones del vector pNL4-3Ren.

2.7.1.1. pNL4-3*NcoI*-Ren.

Vector derivado del pNL4-3Ren en el que se ha introducido un sitio de restricción *NcoI* en el aminoácido 15 de la retrotranscriptasa, dando lugar a un cambio de Glycina por Alanina, para permitir el clonaje de los genes de la PR y la RT por separado. En un primer paso se eliminó el único sitio de restricción *NcoI* del plásmido pNL4-3Ren, que se encuentra fuera de

la secuencia codificante del virus. Para ello se digirió con *NcoI*, se rellenaron los extremos cohesivos con el fragmento Klenow de ADN polimerasa I (GE Healthcare) y se religaron, dando lugar al plásmido pNL4-3Ren(*Nco*-). A continuación construimos el plásmido pBluescript-NLApa/Eco mediante el clonaje del fragmento *ApaI*-*EcoRI* (nts 2006-3485) de pNL4-3, en las mismas dianas de pBluescript II SK(-) (Stratagene). Este plásmido se utilizó como molde para introducir la diana de restricción *NcoI* mediante mutagénesis dirigida usando los oligonucleótidos mut-*Nco*-Up y mut-*Nco*-Down (tabla 4). Finalmente, el fragmento *ApaI*-*AgeI* se devolvió al pNL4-3Ren*Nco*- y se confirmó la presencia de la diana de restricción *NcoI* mediante secuenciación.

2.7.1.2. Mutantes de delección de pNL4-3Ren (defectivos en pol, PR y RT)

Para evitar la interferencia que podría ocasionar el arrastre de secuencias salvajes, se construyeron tres vectores a partir del plásmido pNL-*Nco*-Ren en el que se deleccionaron los genes de la proteasa y la transcriptasa inversa de forma conjunta o separada. Para ello, se sustituyeron los fragmentos *ApaI*/*AgeI*, *ApaI*/*NcoI* y *NcoI*/*AgeI* por el extremo amino-terminal del gen *lacZ*. El fragmento *ApaI*/*AgeI* incluye los sitios de procesamiento p7/p1/p6 de gag, el gen de la proteasa completo y los 312 primeros aminoácidos del gen de la retrotranscriptasa. El gen *LacZ* se amplificó mediante PCR del plásmido pUC18 (Invitrogen) con los oligonucleótidos *Apa*-*LacZ*-Up/*Age*-*LacZ*-Down, *Apa*-*LacZ*-Up/*Nco*-*LacZ*-Down y *Nco*-*LacZ*-Up/*Age*-*LacZ*-Down (tabla 4) que incluían los sitios de restricción *ApaI*/*AgeI*, *ApaI*/*NcoI* y *NcoI*/*AgeI* respectivamente. A continuación se digirieron los productos de PCR con las enzimas correspondientes y se clonaron en los mismos sitios del plásmido pNL4-3*Nco*-Ren. Los plásmidos generados que se caracterizan por tener deleccionados el gen pol completo, la proteasa o la retrotranscriptasa se denominaron pNL4-3*LacZ*/polRen, pNL4-3*LacZ*/PRRen y pNL4-3*LacZ*/RTRen respectivamente (figura 9).

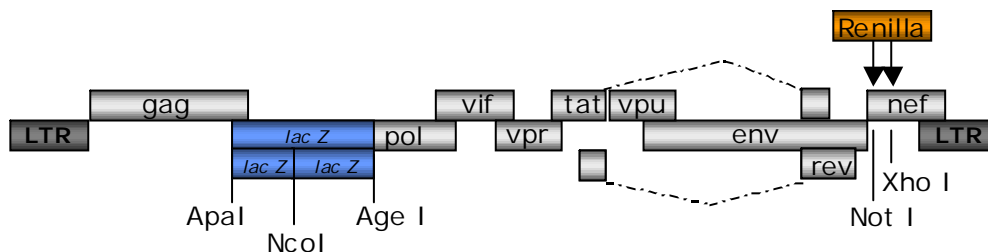


Figura 9. Vectores de delección para la construcción de virus recombinantes. Representación esquemática de los vectores de delección pNL4-3*LacZ*/polRen, pNL4-3*LacZ*/PRRen and pNL4-3*LacZ*/RTRen. A partir del pNL4-3Ren se introdujo un sitio de restricción *NcoI* en el aminoácido 15 de la retrotranscriptasa y se sustituyeron los genes de la proteasa y la transcriptasa inversa de forma conjunta o separada por el extremo amino-terminal del gen *lacZ*.

2.7.2. Mutantes puntuales de la RT.

Con objeto de estudiar el impacto de ciertas mutaciones de resistencia sobre la capacidad replicativa del VIH-1 se construyeron una serie de mutantes puntuales en la región codificante de la RT. Las reacciones de mutagénesis se llevaron a cabo utilizando como molde el plásmido pBluescript-NLApa/Eco. Una vez construidas, las mutaciones puntuales se introdujeron en los plásmidos pNL4-3 o pNL4-3Ren mediante la sustitución del fragmento ApaI/AgeI por el correspondiente del mutante en pBluescript-NLApa/Eco. Los plásmidos con las diferentes mutaciones se confirmaron mediante secuenciación. En la tabla 5 se resume las diferentes mutaciones introducidas mediante el código de una letra. La mutación indica el aminoácido mutagenizado de la RT, seguido de la posición y el nuevo residuo insertado.

Tabla 5. Mutaciones puntuales de la retrotranscriptasa.

Mutación	Oligonucleótido (5'→3')	Codón salvaje	Codón mutado
A62V	CCATACAATACTCCAGTATTTG <u>C</u> CATAAAGAAAAAGACAGTAC	GCC	GTC
K65R	CTCCAGTATTTGCCATAAAGAGAAAAGACAGTACTAAATGGAG	AAA	AGA
S68G	GCCATAAAGAAAAAGAC <u>G</u> GTAATAATGGAGAAAATTAGTAG	AGT	GGT
V75I+F77L	CTAAATGGAGAAAATTA <u>A</u> TAGAT <u>C</u> TCAGAGAACTTAATAAGAGAAC	GTA	ATA
F116Y	GGATGTGGGCGATGCATATT <u>A</u> TTTCAGTTCCTTAGATAAAGAC	TTC	CTC
Q151L	CAGTACAATGTGCTTCCAC <u>I</u> GGGATGGAAAGGATCACCAG	TTT	TAT
Q151M	CAGTACAATGTGCTTCCA <u>A</u> TGGGATGGAAAGGATCACC	CAG	CTG
M184V	CCAGACATAGTCATCTATCAATAC <u>G</u> TAGATGATTTGTATGTAGG	CAG	ATG
M230I	CCTCCATTCTTTGGAT <u>A</u> GGTTATGAACCTCATCC	ATG	GTA
		ATG	ATA

Oligonucleótidos utilizados para las reacciones de mutagénesis, con los cambios puntuales subrayados, correspondientes a la hebra codificante. En la columna de la izquierda se indican los aminoácidos mutagenizados de la RT, según la secuencia de NL4-3, seguidos de las posiciones y los nuevos residuos insertados. Para la introducción de dichas mutaciones se utilizaron dos oligonucleótidos, el descrito y otro complementario a éste.

2.8. Construcción de vectores provirales recombinantes.

2.8.1. Purificación de ARN viral.

Para la extracción del ARN viral, a partir del plasma de pacientes, se empleó el “HIV Simple Prep Module” (Applied Biosystems). Las partículas de VIH se aislaron de cada muestra de plasma (500 µl) mediante centrifugación a 23.500 g durante una hora a 4° C. A

continuación, se lisaron con 600 µl de Tampón de lisis durante 10 minutos para liberar el ARN viral. Se precipitaron con isopropanol puro y se lavaron con etanol al 70% centrifugando a 13000 g durante 15 y 5 minutos respectivamente. Finalmente, se resuspendieron en diluyente de ARN y se conservaron a -80° C.

2.8.2. Amplificación de las secuencias codificantes pol, PR y RT.

El ARN de VIH-1 extraído del plasma se empleó como molde para obtener el ADNc. Para la reacción de transcripción inversa se añadieron 10 µl del ARN viral a una mezcla de reacción que incluía HIV RT Mix (8 µl), un inhibidor de ribonucleasas (1 µl), DTT 100mM (0.4 µl) y la transcriptasa inversa de MuLV (1 µl). Se procesó a 42° C durante 60 minutos y, posteriormente, se desnaturalizó la enzima a 99° C durante 5 minutos. A partir del ADNc obtenido se amplificó mediante PCR un fragmento de 1,8 kb correspondiente al gen de la proteasa y el extremo 5' del gen de la transcriptasa inversa. Para la reacción de PCR se emplearon los 20 µl del producto de la transcripción inversa y 30 µl de una mezcla que contiene HIV PCR MIX (29.5 µl), AmpErase UNG y AmpliTaq Gold. La reacción se llevó a cabo con el siguiente programa: 50° C durante 10 minutos para activar la AmpErase UNG, seguidos de 12 minutos a 93° C para activar AmpliTaq Gold, a continuación, cuarenta ciclos consistentes cada uno en 93° C durante 20 segundos para desnaturalizar el ADN, 64° C durante 45 segundos para la unión del iniciador y 66° C durante 3 minutos de extensión; finalmente 10 minutos a 72° C de extensión final (Viroseq HIV-1 genotyping System, Applied Biosystems). Para asegurar una buena representatividad se realizaron diluciones al 1/10 del ARN extraído y se verificó su amplificación siguiendo el mismo protocolo.

Para amplificar los fragmentos correspondientes al gen pol o los genes de la PR y la RT por separado, se realizó una segunda reacción de PCR usando “Expand high fidelity PCR system” (Roche), 10 ng de la primera reacción de PCR y las parejas de oligonucleótidos 27-pol-Up/28-pol-Down, 27-pol-Up/Pr-Nco-Down y RT-Nco-Up/28-pol-Down que incluían las dianas de restricción para su posterior clonaje. Las muestras se desnaturalizaron a 94° C durante 5 minutos y a continuación se realizaron 35 ciclos de 30 segundos de desnaturalización a 94° C, 1 minuto de unión a 50° C y 2 minutos de extensión a 72° C. Después se añadieron 10 minutos de extensión final.

2.8.3. Clonaje y análisis genético.

Los productos de PCR se digirieron con las enzimas ApaI/AgeI (pol), ApaI/NcoI (PR) y NcoI/AgeI (RT) y se clonaron en los mismos sitios de los vectores provirales pNL4-3LacZ/polRen, pNL4-3LacZ/PRRen y pNL4-3LacZ/RTRen respectivamente. A continuación

las diferentes ligaciones se transformaron en bacterias competentes y sólo las reacciones que presentaban una alta eficacia, por encima de las 200 colonias y menos de un 5% de religados, se crecieron y purificaron como se describe en el apartado 2.1.1. Finalmente, todas las construcciones se secuenciaron mediante el sistema “BigDye Terminador” empleando siete iniciadores específicos. Los siete fragmentos secuenciados se ensamblaron con el programa HIV-1 Genotyping Software package v2.6 (Celera Diagnostics), para obtener una secuencia única continua que corresponde al gen completo de la PR y a los 320 primeros aminoácidos de la RT. Una vez revisadas y editadas las secuencias manualmente, el programa informa de todas las mutaciones presentes en la secuencia en comparación al pNL4-3. Para confirmar los datos obtenidos por este sistema las secuencias se analizaron e interpretaron usando la base de datos de la Universidad de Standford (<http://hivdb.stanford.edu/pages/algs/HIVdb.html>).

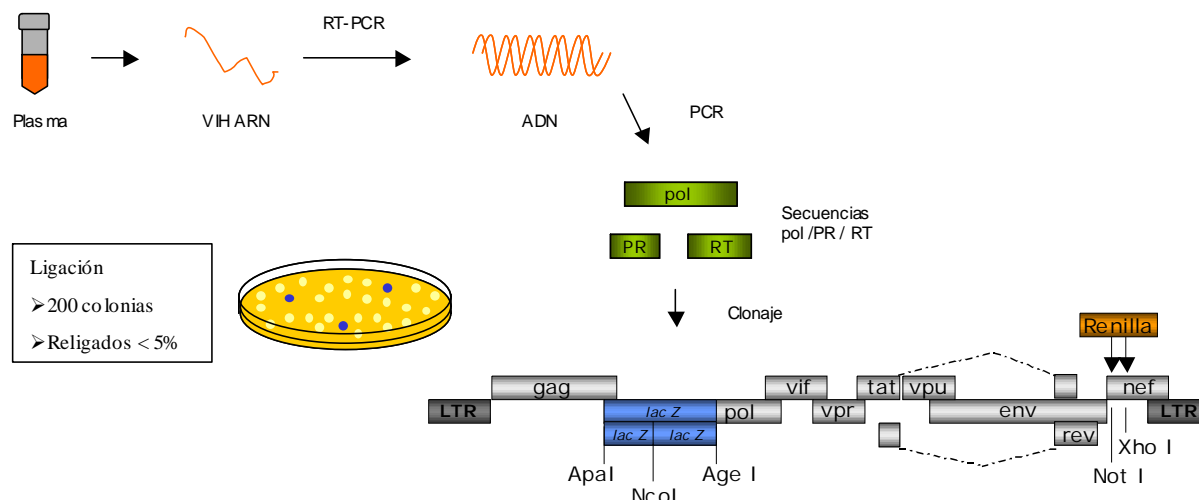


Figura 10. Esquema representativo del proceso de construcción de los virus recombinantes.

3. CÉLULAS EUCARIÓTICAS.

3.1. Líneas celulares y medios de cultivo.

En este trabajo se ha utilizado: 293T, MT-2 y células mononucleares de sangre periférica (PBMC).

-293T, línea celular derivada de fibroblastos de riñón embrionario humano inmortalizada con adenovirus 5 y que expresa el antígeno mayor T de SV40 (DuBridge y col., 1987).

-MT-2, línea celular derivada de linfocitos CD4 transformados con el virus de la leucemia de células T de tipo I (HTLV-I) (Harada y col., 1985; Haertle y col., 1988).

-Las células mononucleares se aislaron a partir de sangre de donantes sanos. La purificación se realizó mediante centrifugación (800 g, 30 minutos, 22° C) en un gradiente de densidad Ficoll-Hypaque (Lymphoprep, BioWhitaker) con la sangre diluida al 50% en tampón fosfato salino (PBS; ClNa 150 mM, pH 7.2). La fase que contenía la fracción de células mononucleares (linfocitos, monocitos y células NK) se recogió y lavó tres veces mediante centrifugación (480 g, 10 minutos, 24° C) en PBS para eliminar al máximo las plaquetas. Finalmente, las células se trataron con tampón de lisis para eritrocitos (RBL, Sigma), se lavaron en PBS y se cultivaron en medio completo a una concentración de 1×10^6 células/ml en presencia de PHA (5 μ g/ml, Sigma-Aldrich) e IL-2 (300 IU/ml, Chiron) durante 48 h.

Las células MT-2 se cultivaron a 3×10^5 células/ml en medio de cultivo RPMI-1640 (BioWhitaker), y las 293T en DMEM (BioWhitaker). Ambos medios se suplementaron con 20 mM de L-glutamina (BioWhitaker), una mezcla de antibióticos que contenía 100 U/ml de penicilina y 100 μ g/ml de estreptomicina (BioWhitaker), y 10% de suero de ternera fetal (STF, BioWhitaker). Los cultivos se mantuvieron a 37° C y en atmósfera del 5% de CO₂. La concentración y viabilidad celular se valoraron en microscopio invertido mediante exclusión del azul tripán (Sigma).

3.2. Transfección de células eucarióticas con fosfato cálcico.

El día anterior a la transfección monocapas subconfluentes de células 293T se trataron con Tripsina + EDTA (GIBCO), se lavaron con medio completo y se sembraron 5×10^5 células en 3 ml de medio por pocillo en una placa de 6 pocillos (Falcon). Cinco minutos antes de la transfección se añadieron 4 μ l de cloroquina (25 mM, Sigma) por pocillo. La mezcla de transfección se preparó en las proporciones y en el orden indicado: sobre 10 μ g de ADN se añadió agua hasta un volumen de 439 μ l para resuspender el ADN. A continuación, se echaron 61 μ l de CaCl₂ 2M gota a gota y se agitó para evitar que se formara un precipitado. Finalmente se mezcló suavemente con 500 μ l de HBS 2x y se sometió a burbujeo durante 15 segundos. Inmediatamente después se recogió la mezcla con la pipeta y se añadió gota a gota sobre los pocillos. Después de 8 horas se cambió el medio y se añadieron 3 ml de medio fresco por pocillo. Este mismo proceso se realizó a las 24 horas de la transfección. A las 48

horas se recogieron los sobrenadantes, se centrifugaron a 240 g durante 5 minutos para retirar posibles restos celulares, y se almacenaron a -80° C.

4. PROTEÍNAS.

4.1. Preparación de extractos celulares.

Se utilizaron aproximadamente 2×10^6 células 293T por punto experimental recogidas a las 48 horas de la transfección. Las células se lavaron en PBS y en tampón A (Hepes 10 mM pH 8, KCl 10 mM, $MgCl_2$ 15 mM y DTT 1 mM), se resuspendieron en 20 μ l de tampón C (Hepes 20 mM pH 8, NP-40 0.1%, glicerol 25%, NaCl 420 mM, KCl 10 mM, $MgCl_2$ 1.5 mM, EDTA 0.2 mM, leupeptina 0.5 μ g/ml, pepstatina 0.5 μ g/ml, aprotinina 0.5 μ g/ml, PMSF 1 mM y DTT 1 mM), se dejaron lisar durante 15 minutos a 4° C y se centrifugaron a 4.062 g durante 10 minutos a 4° C. El sobrenadante obtenido se diluyó en tampón D (Hepes 20 mM pH 8, glicerol 20%, KCl 50 mM, EDTA 0.2 mM, leupeptina 0.5 μ g/ml, pepstatina 0.5 μ g/ml, aprotinina 0.5 μ g/ml, PMSF 1 mM y DTT 1 mM) en función de la concentración final de proteína deseada.

4.2. Valoración de la concentración de proteínas.

La concentración de proteínas se determinó mediante la reacción de Bradford (Biorad) (Bradford, 1976).

4.3. Western-blot (WB).

Se migraron 10 μ g de extractos obtenidos de células 293T en un gel de poliacrilamida-SDS al 10%. Los geles se transfirieron a membranas PVDF (SIGMA-Aldrich) previamente incubadas 5 minutos en metanol mediante un aparato de electrotransferencia (Pharmacia) usando un tampón de transferencia (glicina 20 mM, Tris-base 150 mM y metanol 20%). Las membranas se saturaron por incubación a 37° C durante una hora con leche en polvo al 5% en PBS/Tween-20 0.1%. Tras la saturación, las membranas se incubaron con un anticuerpo monoclonal dirigido frente a Nef cedido por el Dr. Olivier Schwartz (Instituto Pasteur, Paris, Francia). Después de tres lavados de 5 minutos con PBS/Tween-20 0.1%, se incubaron con anticuerpos anti-inmunoglobulinas de ratón unidos a peroxidasa durante una hora a 37° C. Posteriormente se realizaron tres lavados de 5 minutos con PBS/Tween-20 0.1%. La

detección de las interacciones antígeno-anticuerpo se realizó mediante el sistema de quimioluminiscencia “SuperSignal WestPico Chemiluminescent Substrate” (Pierce) y exposición a película fotográfica (Hyperfilm ECL, GE HEALTHCARE).

5. VIRUS.

5.1. Titulación de virus.

5.1.1. Titulación por actividad luciferasa.

En placas de 96 pocillos de fondo redondo (Nunc) se sembraron 5×10^4 células MT-2, o 10^5 PBMCs en presencia de IL-2, por pocillo y se infectaron con distintas diluciones de los stocks virales en un volumen final de 200 μ l. Las infecciones se mantuvieron a 37° C en atmósfera del 5% de CO₂. A las 24, 48 o 72 horas de la infección se determinó la actividad luciferasa con los sistemas “Luciferase Assay System” o “Renilla Luciferase Assay System” (Promega) siguiendo las recomendaciones del fabricante según se tratara de la Luciferasa de luciérnaga o de la Renilla luciferasa respectivamente. Las células se lisaron en 100 μ l del tampón de lisis durante 5 minutos a 4° C. La actividad luciferasa de estos extractos celulares se valoró introduciendo 50 μ l del lisado celular en un luminómetro de placa (Orion, Berthold) programado para inyectar 50 μ l de sustrato. Este valor nos proporciona las unidades relativas de luz (RLUs) por μ l de stock viral a las 24, 48 o 72 horas de infección en células MT2 o PBMCs.

5.1.2. Titulación por efecto citopático.

En placas de 96 pocillos de fondo plano (Becton Dickinson) se sembraron 2×10^4 células MT2 por pocillo en presencia de diluciones seriadas de cada stock viral. Al cuarto día se retiraron 100 μ l del cultivo y se sustituyeron por medio fresco. Finalmente, se analizó el efecto citopático (CPE) al séptimo día y se determinó la dosis infectiva para el 50% del cultivo celular (CCID₅₀) por el método de Reed y Muench (Reed y Muench, 1938).

5.2. Determinación de la sensibilidad a antirretrovirales.

5.2.1. Antirretrovirales.

A continuación se describe la lista de fármacos utilizados y sus respectivos proveedores: Zidovudina (AZT, ZDV), Lamivudina (3TC), Abacavir (ABC) y Amprenavir (APV), GlaxoSmithKline; Stavudina (d4T), didanosina (ddI) y Efavirenz (EFV), Bristol-Myers

Squibb; Tenofovir (TDF, PMPA), Gilead Sciences, Inc.; Nevirapine (NVP), Boehringer Ingelheim; Indinavir (IDV), Merck Sharp; Ritonavir (RTV), Abbott laboratories; Nelfinavir (NFV) y Saquinavir (SQV), Roche Farma.

Los ITIANs (AZT, 3TC, d4T, ddI, ABC y TDF) y los ITINNs (EFV y NVP) se resuspendieron en H₂O a una concentración de 10 mM. Los IPs (IDV, RTV, SQV, NFV y APV) se resuspendieron en etanol al 50% a una concentración de 1 mM. Una vez resuspendidos se conservaron a -20° C.

5.2.2. Ensayos de susceptibilidad a antirretrovirales.

Los virus necesarios para los ensayos de susceptibilidad a antirretrovirales se generaron transfecando células 293T con las construcciones de virus recombinantes previamente purificadas. Para medir la susceptibilidad a los inhibidores de la proteasa, las células 293T se trataron con tripsina 16-18 horas después de la transfección y se distribuyeron en placas de 96 pocillos de fondo plano (5×10^4 células/pocillo) en presencia de diluciones seriadas del inhibidor correspondiente al rango de actividad de cada droga. Los virus generados en presencia del inhibidor de la proteasa se recogieron a las 48 horas de la transfección y se usaron para infectar células MT-2 (5×10^4 células/pocillo) en placas de 96 pocillos de fondo redondo en ausencia de fármaco. Para medir la susceptibilidad a los inhibidores de la transcriptasa inversa, los virus generados en ausencia de droga se recogieron a las 48 horas de la transfección y se usaron para infectar células MT-2 (5×10^4 células/pocillo) en presencia de diluciones seriadas del inhibidor, en placas de 96 pocillos de fondo redondo. Todas las infecciones se realizaron por triplicado (figura 11).

A las 48 horas de la infección se analizó la replicación viral midiendo la actividad luciferasa en los extractos celulares como hemos descrito en el apartado 5.1.1. Los valores de actividad luciferasa obtenidos se analizaron representando el porcentaje de inhibición de la actividad luciferasa ($[1 - (\text{actividad luciferasa en presencia del fármaco} / \text{actividad luciferasa en ausencia del fármaco})] \times 100$) frente al logaritmo en base 10 de la concentración del fármaco. Las curvas de inhibición se obtuvieron mediante una ecuación sigmoidea de cuatro parámetros ($Y = a + [(b-a) / (1 + 10^{-(\text{Log}CI_{50} - X)H})]$) donde a es el valor de Y en el *plateau* inferior, b el valor de Y en el *plateau* superior, y H el coeficiente de Hill, que define la pendiente de la curva. A partir de estas curvas de inhibición se calculó la concentración inhibitoria 50 (CI_{50}), utilizando el programa *GraphPad Prism versión 2.01* (GraphPad Software). Para calcular los cambios de sensibilidad a fármacos dividimos la CI_{50} del virus mutado entre la CI_{50} del virus de referencia. Este valor, denominado *fold* de resistencia, determina el número de veces que se incrementa la CI_{50} de cada antirretroviral respecto al virus de referencia.

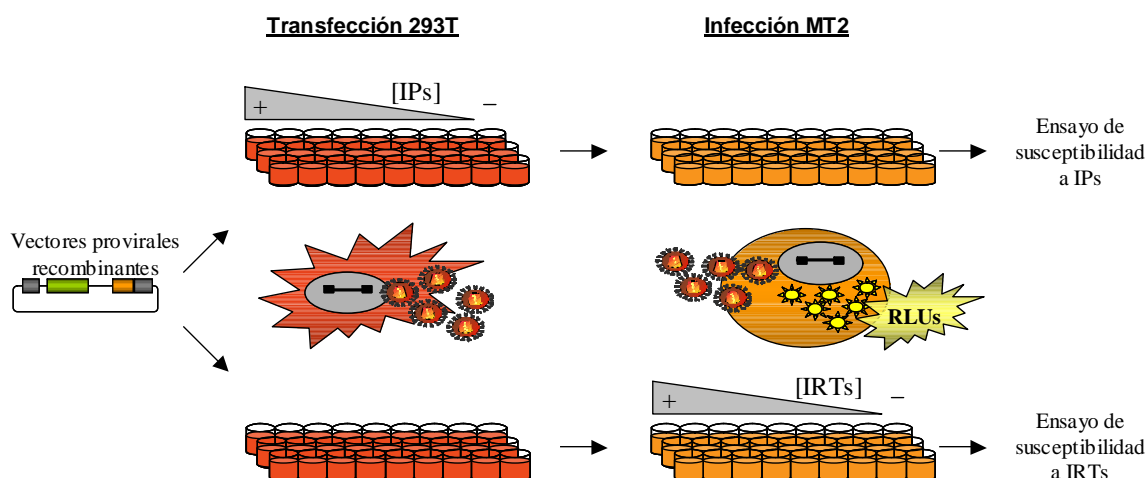


Figura 11. Esquema del ensayo de susceptibilidad a antirretrovirales. Las partículas virales se producen transfectando las células 293T con los plásmidos virales mediante fosfato cálcico. Después de la transfección se recogen los sobrenadantes y se infectan las células diana MT-2. La replicación viral se cuantifica midiendo la actividad luciferasa en las células diana. La actividad de los inhibidores de la proteasa y de la transcriptasa inversa se mide añadiendo los primeros a las células transfectadas y los segundos a las células infectadas.

5.2.3. Análisis del efecto sinérgico/antagónico de combinaciones de NRTIs.

Los virus necesarios para los ensayos de sinergia/antagonismo se generaron cotransfectando en células 293T los plásmidos pNL4-3.Luc.R-E- (2 μg) y pcDNA₃-VSV (8 μg). Los pseudotipos virales generados en ausencia de droga se recogieron a las 48 horas de la transfección y se usaron para infectar PBMCs (5 x 10⁴ células/pocillo) en presencia de diluciones seriadas en base 5 del inhibidor, de forma individual o combinada, en placas de 96 pocillos de fondo redondo y en presencia de IL-2. Antes de añadir el virus las células se incubaron en presencia del fármaco durante 2 horas. Las combinaciones de las drogas se hicieron en una relación molar fija y de igual potencia, teniendo en cuenta las IC₅₀ de cada droga. A las 48 horas de la infección se analizó la replicación viral midiendo la actividad luciferasa en los extractos celulares como hemos descrito en el apartado 5.1.1. Los valores de actividad luciferasa obtenidos se analizaron representando la fracción afectada ($Fa = \frac{(RLU_{+drug}) - (RLU_{-drug})}{(RLU_{-drug})}$) frente a la concentración del fármaco. Las curvas de inhibición de los fármacos por separado o en combinación se obtuvieron según la ecuación “median-effect” descrita por Chou y Talay (Chou y Talalay, 1984) [$Fa = 1 / [1 + (IC_{50} / drug\ concentration)^m]$], donde m es la pendiente de la curva, mediante el programa Calcsyn (Biosoft). La concentración de fármaco que genera una Fa del 50, 75 o 90% se denomina dosis efectiva 50, 75 o 90 (ED₅₀, ED₇₅ o ED₉₀). El análisis del efecto sinérgico, aditivo o antagónico entre los NRTIs se realizó de acuerdo a la ecuación del efecto de múltiples drogas

desarrollada por Chou y Talay (Chou y Talalay, 1984) con el mismo programa, que nos proporciona el Índice de Combinación (CI) a cada nivel de Fa. Esta ecuación determina el efecto aditivo de la combinación de drogas (CI=1) y define el sinergismo como un efecto aditivo superior al esperado (CI<1) y el antagonismo como un efecto aditivo menor al esperado (CI>1). Los valores de CI se definieron como: >1.30 antagónicos, 1.10-1.30 levemente antagónicos, 0.90-1.10 aditivos, 0.70-0.90 levemente sinérgicos, <0.70 sinérgicos. Las diferencias experimentales entre las diferentes combinaciones de fármacos se analizaron mediante un test no paramétrico (Mann-Whitney) usando el programa SPSS (v 13.0), donde los valores de $p < 0,05$ se consideraron significativos.

5.2.4. Viabilidad celular.

Para valorar el efecto citotóxico de las concentraciones de fármaco administradas de forma individual o combinada se utilizaron diferentes técnicas que describimos a continuación.

5.2.4.1. Ensayo de viabilidad celular por luminiscencia.

Las células, en presencia de las diferentes concentraciones del compuesto y en ausencia de virus, se recogieron al mismo tiempo que los ensayos de susceptibilidad. La viabilidad celular se valoró mediante la cuantificación de la actividad luciferasa con el sistema “CellTiter-gol Luminescent cell viability Assay” siguiendo el protocolo suministrado por el fabricante.

5.2.4.2. Ensayo clásico de infectividad mediante MTT

El ensayo de MTT se realizó según el protocolo de Pauwels y cols. Células MT-2 (10^4 células/pocillo) infectadas (100 CCID₅₀ de NL4-3) o sin infectar se sembraron en placas de 96 pocillos de fondo plano en un volumen final de 200 μ l en presencia de las diferentes concentraciones de fármaco. A los 7 días post-infección, se valoró la viabilidad celular mediante la adición de MTT. Se añadió 20 μ l de la solución de MTT (7,5 mg/ml en PBS) a cada pocillo y se incubó 1 hora a 37° C. El MTT se reduce a formazán por acción de las enzimas mitocondriales de las células activas metabólicamente. La sal de formazán, de color amarillo, es insoluble en agua y precipita en forma de cristales. A continuación se retiran 150 μ l de medio con cuidado, evitando arrastrar las células que contienen los cristales de formazán. La solubilización de los cristales de formazán se realiza mediante la adición de 100 μ l Triton X-100 al 10% (V/V) en isopropanol acidificado (0,04 M HCl en isopropanol) produciéndose coloración azul. La generación de formazán es directamente proporcional al número de células que sobreviven a la presencia de las diferentes concentraciones del

compuesto en células infectadas o no por el virus. Esta reacción colorimétrica se valora por espectrofotometría a una absorbancia de 540-690 nm, en un espectrofotómetro computerizado (Tecan Sunrise).

5.3. Determinación de la capacidad replicativa.

Para medir el impacto de las mutaciones de resistencia sobre la capacidad replicativa se utilizaron diferentes técnicas que describimos a continuación:

5.3.1. Virus recombinantes.

La capacidad replicativa de los virus construidos, a partir de plasma de pacientes o por mutagénesis dirigida, se analizó mediante una adaptación del ensayo fenotípico de resistencia a antirretrovirales descrito anteriormente. Se infectaron células MT-2 (5×10^4 células/pocillo) con los stocks virales obtenidos de la transfección en células 293T. Las infecciones se llevaron a cabo por triplicado en placas de 96 pocillos de fondo redondo y en un volumen final de 200 μ l. La actividad luciferasa obtenida en las células infectadas por varios mutantes puntuales se midió a diferentes tiempos (24, 48, 72 horas) y se determinó con el sistema “Renilla Luciferase Assay” (Promega) según se describe en el apartado 5.1.1. La proporción de actividad luciferasa producida por cada virus en comparación al virus control NL4-3Ren fue prácticamente idéntica e independiente del tiempo de infección. Así, la actividad luciferasa se midió rutinariamente a las 48 horas de la infección, y se usó como una medida directa de la infectividad del virus. Para normalizar los valores de la infección, teniendo en cuenta posibles diferencias en la eficacia de las transfecciones, se emplearon 3 métodos: infectar con una dosis constante de proteína gag p24; normalizar después de la infección en función de la cantidad de proteína gag p24 en el stock viral o normalizar después de la infección en función de la actividad luciferasa obtenida en las células transfectadas. Los valores de capacidad replicativa obtenidos con una batería de mutantes puntuales de la RT, resultaron prácticamente idénticos independientemente del método de normalización utilizado. Por este motivo, y teniendo en cuenta que las mutaciones en la proteasa pueden afectar el buen procesamiento de gag en la producción de p24 (Zennou y col., 1998), se usó la actividad luciferasa obtenida en las células transfectadas como método principal de normalización. La capacidad replicativa, expresada como porcentaje, se determinó comparando la capacidad replicativa del virus mutante con la del virus de referencia. El cálculo se realizó de la siguiente manera: $[1 - (\text{RLUvirus mutado} \times \text{FC}_{293}) / \text{RLUvirusWT}] \times 100$. En esta ecuación, FC_{293} , es el factor de corrección de la eficacia de transfección que

viene determinado por la ecuación: (RLU transfección virus mutado / RLU transfección virus WT).

5.3.2. Cinéticas de replicación.

Para analizar la replicación viral, se infectaron 10^6 células MT-2 o 4×10^6 PBMCs con una dosis de 25ng o 2.5ng de proteína gag p24 según se tratara de virus recombinantes basados en el vector pNL4-3Ren o en el vector pNL4-3 respectivamente. Después de 3 horas de adsorción, las células se lavaron tres veces con PBS y se resuspendieron en medio completo a 7.5×10^4 células/ml en el caso de las MT-2, y a 3×10^5 células/ml en el caso de las PBMCs. Las PBMCs se preactivaron durante 48 horas con PHA e IL-2 y se mantuvieron en presencia de IL-2 durante todo el ensayo. Durante una semana, se recogió diariamente un mililitro de cultivo y se repuso con medio fresco. La replicación viral se determinó cuantificando los niveles de proteína p24 en los sobrenadantes del cultivo mediante un ensayo inmunoenzimático (ELISA) para la detección del antígeno p24 (InnotestTM HIV Ag mAb, Innogenetics), o la actividad luciferasa en los extractos celulares.

5.3.3. Ensayo de competición.

Para confirmar la pérdida de capacidad replicativa de algunos mutantes, se realizaron ensayos de competición como se describe en Garcia-Lerma y cols. (Garcia-Lerma y col., 2000). Previamente, se calcularon las CCID₅₀ de los stocks virales (apartado 5.1.2). A continuación, se prepararon combinaciones de las dos variantes virales a diferentes ratios para infectar 3×10^5 células MT-2 a una MOI de 0.001 aproximadamente. Para asegurarnos de que las dos variantes virales partían en la misma proporción, se mezcló una cantidad fija de uno de los virus (150 CCID₅₀) con diferentes cantidades (75, 150 o 300 CCID₅₀) del otro clon viral. Al día siguiente, se recogió un tercio de las células infectadas, se lavó con PBS y se purificó el ADN celular. A partir de este ADN se amplificó el gen pol mediante una reacción de PCR con la pareja de oligonucleótidos 27-pol-Up/28-pol-Down como se describe en el apartado 2.8.2., y cada mutación se secuenció con un oligonucleótido (5'-3') y con otro (3'-5') como se describe más adelante. Las infecciones que más se aproximaron a una proporción 50:50, se mantuvieron en cultivo y el resto se desecharon. Cada 5-6 días, un nuevo cultivo de 2×10^5 células MT-2 se infectó con 200 µl de sobrenadante libre de células de la infección anterior. Las células se recogieron al final de cada pase y se sometieron a un análisis genético como hemos descrito previamente para determinar la proporción relativa de cada una de las dos poblaciones virales que están compitiendo. La proporción relativa de cada variante viral se estimó en función de la altura de los picos del electroferograma obtenido de la secuenciación del ADN celular (Kosalaraksa y col., 1999). Por ejemplo, igual altura de los

picos indica una proporción 50:50, y una altura de dos veces la del otro indica una proporción 67:33. La altura de los picos se clasificaron en igual que o 1.25-, 1.5-, 2-, 2.5-, 3- o 4-veces mayor que el otro pico. Cada categoría corresponde aproximadamente a un 55, 60, 67, 70, 75, o 80% de representación de la muestra con el pico más alto dentro de la mezcla. Poblaciones menores al 20% dentro de la mezcla fueron difíciles de estimar por el fondo de las secuencias. Todos los porcentajes se calcularon en función de los valores obtenidos con las dos secuencias (5'-3') y (3'-5'). En el caso de los clones virales con más de una mutación, se determinó la media entre los porcentajes obtenidos con cada una de las mutaciones. Para controlar la posible reversión espontánea de alguna de las mutaciones, se llevaron cultivos de cada virus en paralelo y se secuenciaron después de cada pase.

RESULTADOS

1. DESARROLLO DE UN MODELO BASADO EN LA GENERACIÓN DE VIRUS RECOMBINANTES EN EL GEN *POL* PARA EL ESTUDIO FENOTÍPICO DE AISLADOS VIRALES DE PACIENTES CON INFECCIÓN POR EL VIH-1.

La generación de virus recombinantes con fines diagnósticos surge con el fin de solventar los numerosos inconvenientes asociados a los métodos clásicos de determinación del fenotipo de resistencia a antirretrovirales. Se consideran virus recombinantes genomas completos del VIH en los que se han insertado fragmentos génicos procedentes de la población viral de un paciente determinado. De esta manera se generan quimeras virales que portan los genes de interés del virus del paciente y que permiten estudiar diferentes características como la resistencia a fármacos o la capacidad replicativa. Para llevar a cabo los estudios que se describen a continuación se ha utilizado como material de partida el clon molecular de referencia pNL 4-3 que contiene el genoma completo del VIH-1.

1.1. Construcción de un virus de ciclo múltiple que exprese un gen indicador.

El primer objetivo de este trabajo fue generar un virus de ciclo múltiple que expresara un gen indicador con el fin de aumentar la sensibilidad en la detección de la infección y facilitar su monitorización. Para ello se sustituyó parte del gen regulador *nef*, que no es esencial para la replicación del VIH en cultivo (Fisher y col., 1986; Terwilliger y col., 1986), por diferentes genes indicadores. En primer lugar se clonó el gen Luciferasa de Luciérnaga (1.6 kb), dando lugar a la construcción pNL4-3Luc. Para comprobar la capacidad replicativa de este nuevo virus, se realizaron cinéticas de replicación en células MT2 midiendo la actividad luciferasa en los lisados celulares. Como se observa en la figura 12C, el perfil de la curva de replicación del virus NL4-3Luc es muy similar al del virus de ciclo único NL4-3VSVRen. Esta falta de replicación podía deberse a la eliminación del gen regulador *nef*. Por ello, recuperamos la expresión completa de Nef bajo el control de una secuencia IRES del virus de la encefalomiocarditis (0.5 kb). En la figura 12B, se muestran altos niveles de expresión de la proteína Nef en células 293T transfectadas con el plásmido pNL4-3LucIRESnef. Sin embargo, los virus generados con esta construcción presentaron el mismo perfil de replicación que los anteriores. Finalmente, introdujimos un gen indicador de menor tamaño, el gen Renilla Luciferasa (0.8 kb), dando lugar al plásmido pNL4-3Ren. Aunque esta construcción

no expresa Nef, los virus resultantes mostraron una cinética de replicación productiva (Figura 12C).

Con el objeto de confirmar la capacidad replicativa del virus NL4-3Ren y analizar la estabilidad del gen indicador Renilla, se realizaron tres pases seriados con los diferentes virus indicadores en células MT2, y se valoró la actividad luciferasa en los lisados celulares. Como era de esperar, los virus NL4-3Luc, NL4-3LucIRESnef y NL4-3VSVRen realizaron un único ciclo de replicación, mientras que el virus NL4-3Ren fue capaz de propagarse durante tres pases sucesivos en MT2 (Figura 12D). Además, el hecho de que los niveles de actividad Luciferasa obtenidos fueran similares durante los tres pases, sugiere que la expresión del gen Renilla luciferasa se mantiene estable después de múltiples ciclos de replicación.

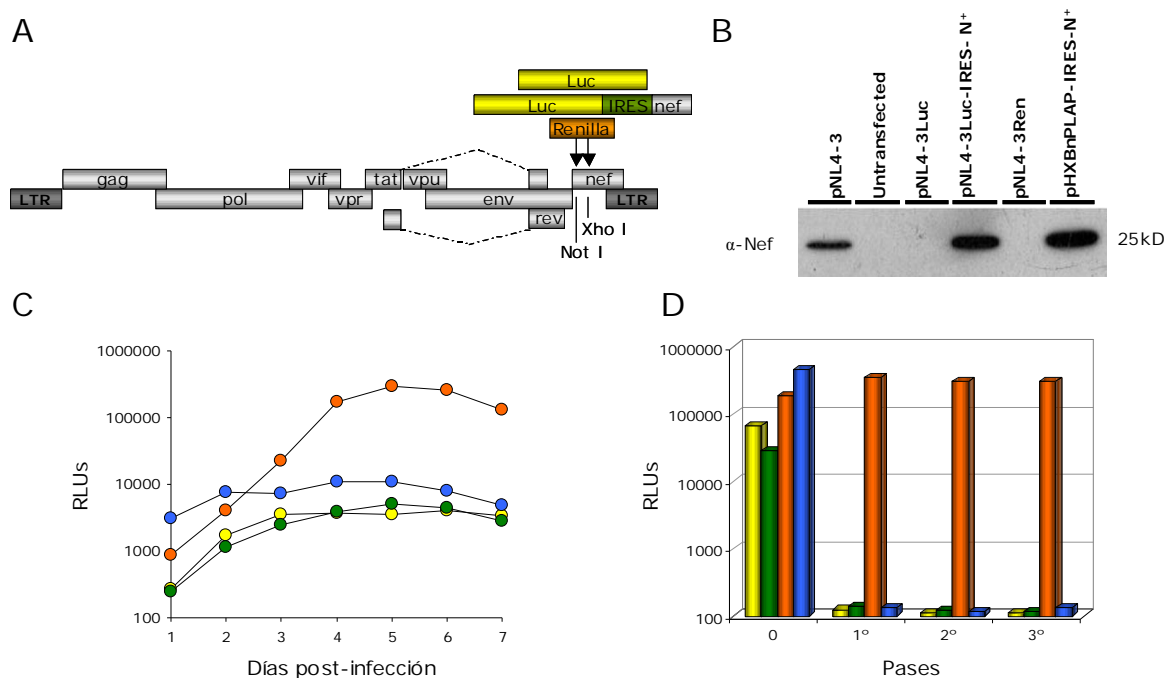


Figura 12. Características replicativas de los clones virales con genes indicadores NL4-3Luc (amarillo), NL4-3LucIRESnef (verde), NL4-3Ren (naranja) y NL4-3VSVRen (azul). (A) Esquema representativo de los clones provirales pNL4-3Luc, pNL4-3LucIRESnef y pNL4-3Ren. (B) Análisis de la expresión de nef mediante Western Blot. Extractos de células 293T, obtenidos 48 horas posttransfección con los plásmidos indicados, se incubaron con un anticuerpo monoclonal anti-nef a una dilución 1:1000. (C) Cinéticas de replicación en MT2. La replicación viral se valoró midiendo la actividad luciferasa en los lisados celulares. (D) Ensayo de reinfección en MT2. Sobrenadantes de tres infecciones consecutivas se titularon en MT2 y se valoró la actividad luciferasa en los lisados celulares.

Para comprobar el efecto que pudiese tener la expresión del gen indicador y la ausencia del gen regulador nef sobre la correcta replicación del virus, se compararon las cinéticas de replicación del virus NL4-3Ren con las del virus original NL4-3 en diferentes tipos celulares. Las infecciones con ambos virus en células MT2 y PBMCs, mostraron cinéticas de

replicación similares, aunque se observó una reducción en los niveles de replicación del virus NL4-3Ren, fenómeno descrito con anterioridad en otros sistemas (Muller y col., 2004; Brown y col., 2005; Neumann y col., 2005; Weber y col., 2006). Sin embargo, es interesante resaltar la alta correlación entre los valores de actividad luciferasa y la producción de la proteína p24 (Figura 13).

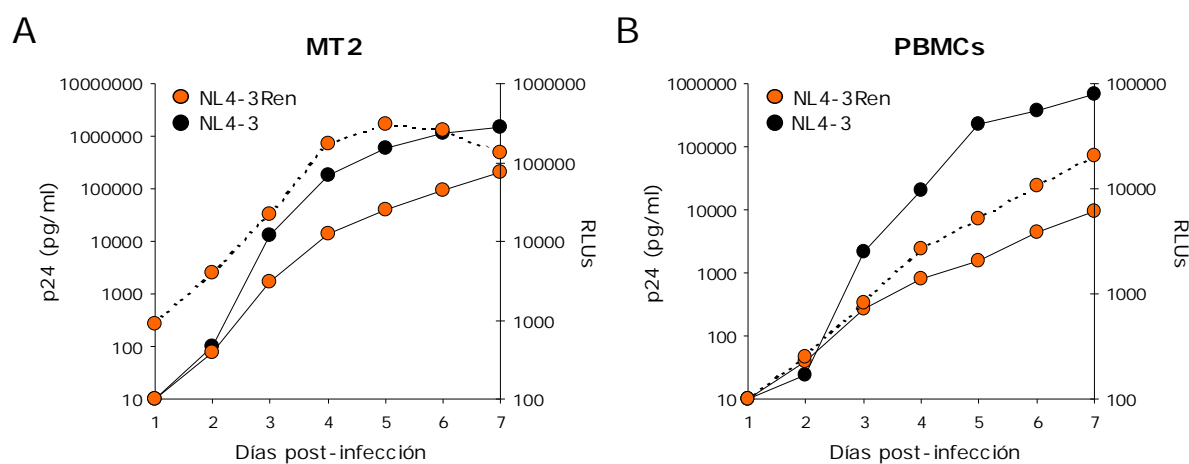


Figura 13. Comparación entre las cinéticas de replicación del virus indicador NL4-3Ren y las del virus de origen NL4-3. Células MT2 (A) y PBMCs (B) se infectaron con cantidades iguales de proteína p24 de los virus indicados. La replicación viral se valoró midiendo la producción de proteína p24 en el sobrenadante (línea continua) y la actividad luciferasa en los lisados celulares (línea discontinua). Los datos son representativos de tres experimentos en los que se obtuvieron resultados similares.

1.2. Estrategia para generar virus recombinantes.

Para permitir el clonaje de las secuencias de la PR y la RT por separado, se introdujo mediante mutagenéesis dirigida una diana de restricción *NcoI* en el extremo amino-terminal de la RT del vector pNL4-3Ren. La introducción de esta nueva diana de restricción genera un cambio de aminoácido en la posición 15 de la RT (G15A). Sin embargo, esta mutación no afecta a la correcta actividad de la RT, ya que el nuevo virus NL-Nco-Ren presenta una cinética de replicación y una capacidad replicativa muy similares a las del virus de origen NL4-3Ren (Figura 14A y 14B).

A partir de este nuevo plásmido se construyeron los vectores pNL4-3LacZ/polRen, pNL4-3LacZ/PRRen y pNL4-3LacZ/RTRen, en los cuales el gen pol y los fragmentos que codifican por la PR y la RT respectivamente, se deleccionaron y sustituyeron por el gen LacZ (Figura 15A).

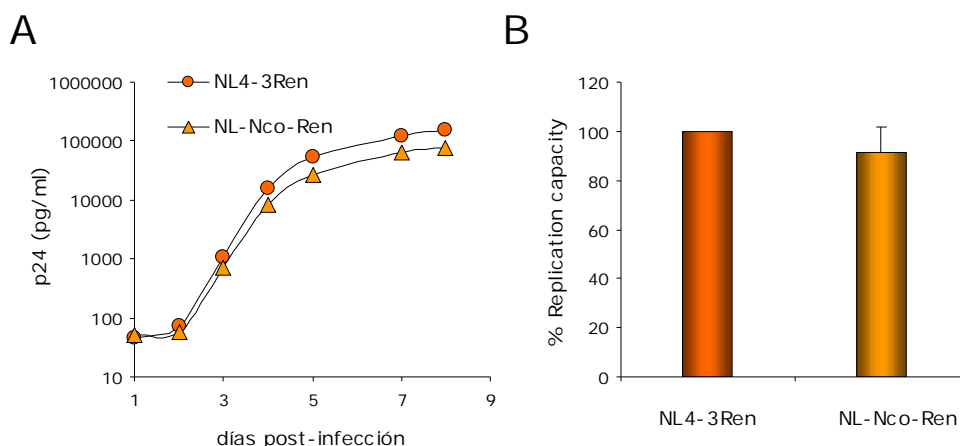


Figura 14. Características replicativas del clon viral NL-Nco-Ren. (A) Cinéticas de replicación en MT2. La replicación viral se valoró midiendo la producción de proteína p24 en el sobrenadante. (B) Capacidad replicativa relativa de NL-Nco-Ren. Como se describe en “Materiales y métodos”, la capacidad replicativa se determinó comparando la actividad luciferasa del virus NL-Nco-Ren con la del virus de referencia NL4-3Ren. La barra de error indica la desviación estándar de tres experimentos independientes.

1.2.1. Producción de virus recombinantes con las secuencias pol, PR y RT procedentes de plasma de paciente.

En un primer paso, a partir de plasma de pacientes infectados por el VIH-1 se purificó el ARN viral y se amplificaron, mediante RT-PCR y posterior PCR anidada, los fragmentos comprendidos entre las dianas de restricción *ApaI/AgeI*, *ApaI/NcoI* y *NcoI/AgeI* correspondientes a las secuencias de pol, PR y RT respectivamente. El fragmento *ApaI/AgeI* incluye los sitios de procesamiento p7/p1/p6 de gag, el gen de la proteasa completo y los 312 primeros aminoácidos del gen de la RT. Los productos de PCR se digirieron con las enzimas *ApaI/AgeI* (pol), *ApaI/NcoI* (PR) y *NcoI/AgeI* (RT) y se clonaron en los mismos sitios de los vectores provirales pNL4-3LacZ/polRen, pNL4-3LacZ/PRRen y pNL4-3LacZ/RTRen (Figura 15A). Este sistema nos permite trabajar tanto con clones como con poblaciones de virus recombinantes.

Las diferentes construcciones virales generadas se transfectaron en la línea celular 293T mediante precipitación por fosfato cálcico. A las 48 horas se recogieron los sobrenadantes con los virus recombinantes y se emplearon para infectar la línea celular MT2. La actividad luciferasa se determinó a las 48 horas.

En la figura 4A se representan los valores de actividad luciferasa obtenidos tras la infección con virus recombinantes que expresan las secuencias pol, PR y RT procedentes de un paciente multitratado elegido al azar y del virus control NL4-3Ren. Cuando la transfección se realizó con los vectores delecionados en dichas secuencias (LacZ), no se detectó actividad

luciferasa, lo que demuestra que la producción de virus y su infectividad dependen de las secuencias clonadas en estos fragmentos.

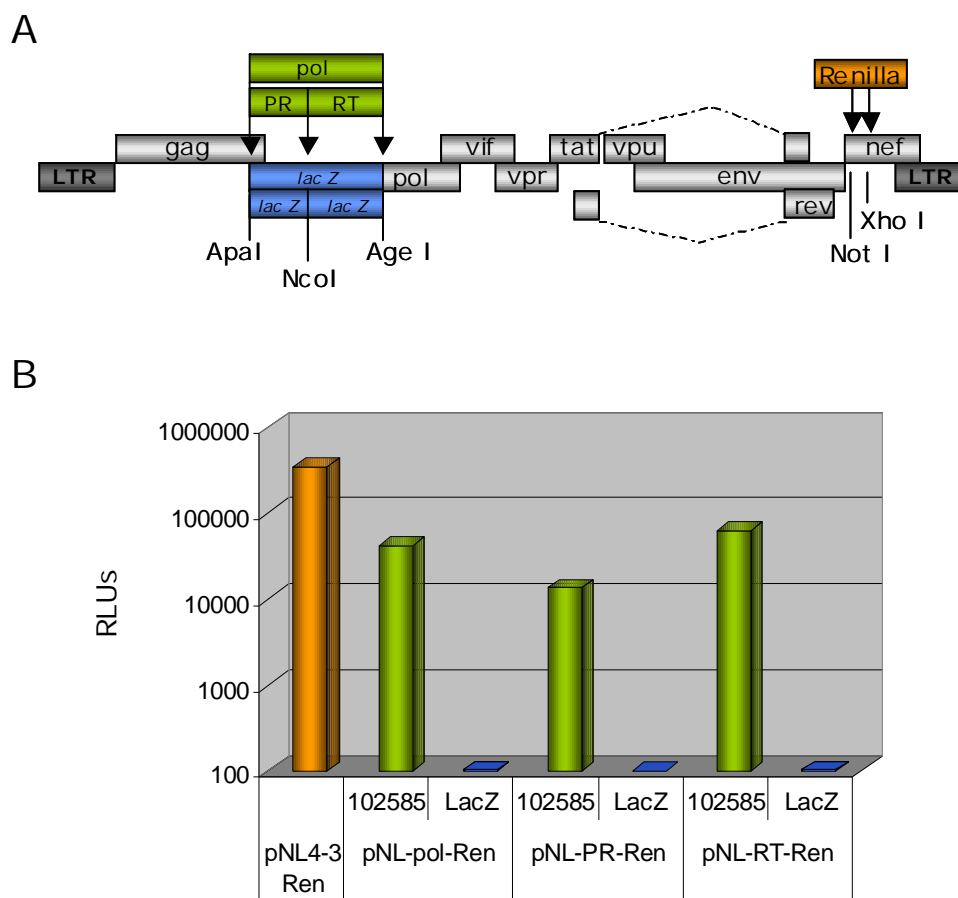


Figura 15. Construcción y titulación de virus recombinantes con las secuencias pol, PR y RT derivadas de pacientes. (A) Esquema representativo del clonaje de las secuencias pol, PR y RT derivadas de pacientes en los vectores pNL4-3LacZ/polRen, pNL4-3LacZ/PRRen y pNL4-3LacZ/RTRen respectivamente. (B) Infección en la línea MT2 con los stocks generados tras la transfección en células 293T de los construcciones recombinantes derivadas del paciente 102585 y los respectivos vectores de origen. El paciente presentó las siguientes mutaciones de resistencia en la PR: K20R, L33F, M46L, I50V, I54V, L63P, A71V, G73S, V77I, V82F, L90M; y en la RT: K65R, S68G, K70R, V75I, F77L, Y115F, F116Y, V118I, Q151M, Y181C, M184V/I, G190A, K219E.

1.2.2. Análisis de los virus recombinantes.

Para confirmar que la introducción de los fragmentos amplificados por PCR a partir de plasma de pacientes no modificaba las propiedades replicativas de los virus, y especialmente su capacidad para producir múltiples ciclos de replicación, se infectaron células MT2 en presencia y ausencia de NFV con virus NL4-3Ren y dos virus resistentes derivados de pacientes. El inhibidor de la PR se usó a una dosis de 2 μ M, concentración que inhibe la replicación viral de los tres clones en más de un 90% sin presentar toxicidad celular (Figura 16A). La replicación viral se valoró midiendo la actividad luciferasa en los lisados celulares a

diferentes tiempos. La actividad luciferasa obtenida en presencia de NFV se consideró resultante de un único ciclo de replicación. En ausencia de fármaco, tanto el virus control como los virus derivados de pacientes replicaron eficientemente (Figuras 16B-D). La diferencia de actividad luciferasa obtenida a 72 horas respecto a un único ciclo de replicación, resulta una ventaja para la detección de variantes virales con baja capacidad replicativa. Esto se puede apreciar en el caso de clones donde la señal de actividad luciferasa se incrementa en dos veces a las 48 horas, y 4 veces a las 72 horas respecto a los cultivos con un solo ciclo de replicación (NFV+) (Figura 16C y D).

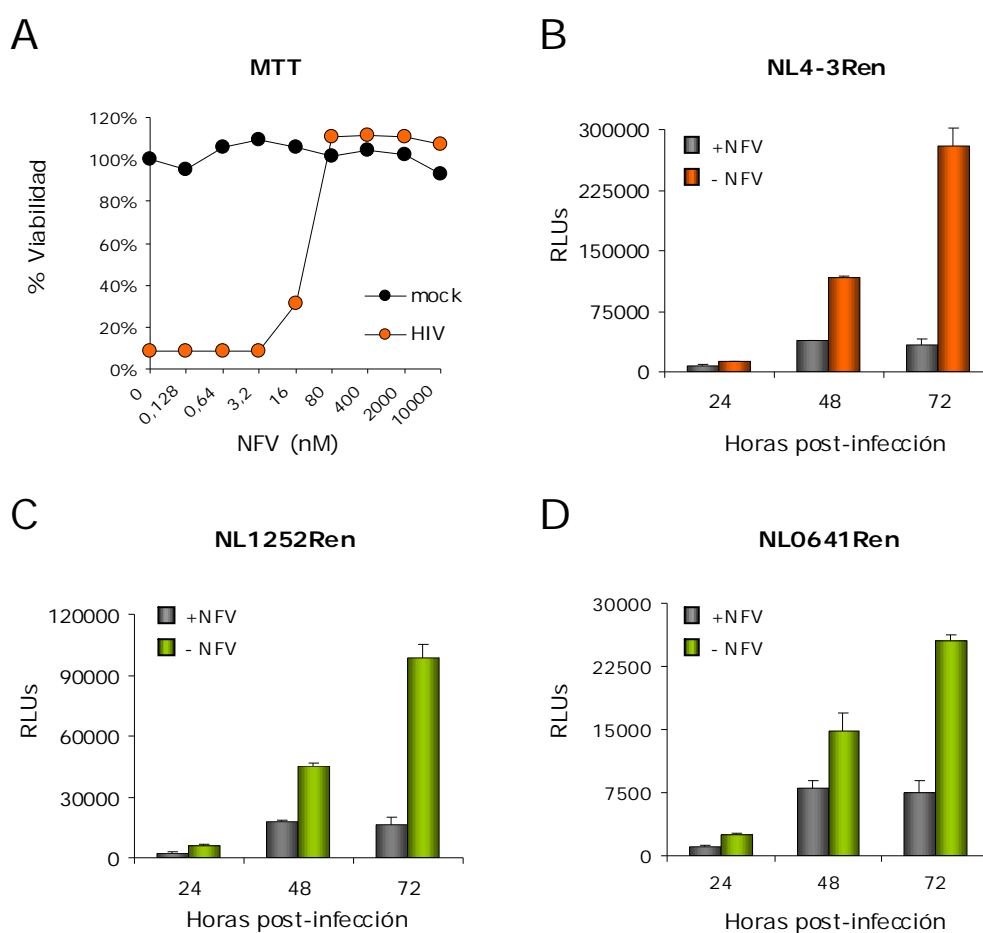


Figura 16. Replicación de virus recombinantes derivados de pacientes. (A) Inhibición de la replicación del virus NL4-3 en presencia de las concentraciones indicadas de NFV (Ensayo de MTT). Se muestran los porcentajes de viabilidad celular respecto al control en ausencia de fármaco (naranja). También se valoró la toxicidad del fármaco en las células MT2 (negro). (B, C, D) Células MT2 se infectaron, en presencia o ausencia de 2 μ M NFV, con NL4-3Ren (B), y con dos clones virales derivados de pacientes (NL1252Ren (C); RT: M41L, K70R, T215F, K219Q PR: M36I y NL0641Ren (D); RT: K65R, K70R, V75I, F77L, K103N, F116Y, Q151M, Y181C, G190A PR: L10I, G48V, I54V, L63P, A71V, V77I, V82A, L90M). La replicación viral se valoró a los tiempos indicados midiendo la actividad luciferasa en los lisados celulares. Cada medida representa la media de tres ensayos.

Para confirmar la estabilidad de las secuencias derivadas de pacientes en los virus recombinantes, se realizaron tres pases seriados con 2 poblaciones virales en células MT2. A partir del sobrenadante de cada infección, se purificó el ARN viral y se confirmó la presencia íntegra del gen *pol* por secuenciación. Los virus fueron capaces de propagarse durante tres pases consecutivos en MT2 sin producirse ninguna reversión de las mutaciones asociadas con resistencia.

2. APLICACIONES DEL SISTEMA DE EXPRESIÓN DE VIRUS RECOMBINANTES AL ESTUDIO DE DIFERENTES ASPECTOS FENOTÍPICOS DEL VIH.

2.1. Resistencia fenotípica a antirretrovirales.

La generación de quimeras recombinantes en el gen *pol* a partir de muestras clínicas se adaptó al estudio fenotípico de sensibilidad a antirretrovirales. Para determinar los perfiles de sensibilidad a fármacos se añadieron concentraciones seriadas de los inhibidores de la PR a las células transfectadas (293T) y de los inhibidores de la RT a las células infectadas (MT2). La actividad luciferasa en presencia de concentraciones crecientes de un fármaco permite determinar la susceptibilidad al mismo de los virus recombinantes portadores del gen *pol* de los pacientes. Las drogas que inhiben la replicación del virus reducen la actividad luciferasa en función de su concentración, y permite cuantificar la sensibilidad a dicha droga.

Como ejemplo, en la figura 17 se muestran los perfiles fenotípicos de sensibilidad a antirretrovirales de un clon viral obtenido a partir del plasma de un paciente en fracaso terapéutico portador de un patrón complejo de mutaciones de resistencia a antirretrovirales. Los valores de actividad luciferasa obtenidos se analizaron representando el porcentaje de inhibición de la actividad luciferasa frente al logaritmo en base 10 de la concentración del fármaco. Para analizar la sensibilidad a los diferentes fármacos se determinó el nivel de resistencia definido como el cociente entre la IC_{50} del virus recombinante derivado de paciente entre la IC_{50} del virus de referencia. Así, en comparación con el virus NL4-3Ren, el clon viral NL0641Ren presentó alta resistencia a los NRTIs: ZDV (64.1-fold), d4T (12.9-fold), 3TC (30.5-fold), TDF (5.8-fold), ddI (15.2-fold) y ABC (13.6-fold); a los NNRTIs: EFV (>250-fold) y NVP (67.3-fold); y a los IPs: SQV (55.4-fold), RTV (21-fold), IDV (17.4-fold) y NFV (44.8-fold). Sin embargo, no se observó resistencia para el APV. Los resultados

fenotípicos obtenidos se correlacionan correctamente con el perfil genotípico del paciente (Tabla 6). La mutación Q151M con los cambios asociados en las posiciones 75, 77, 116, en combinación con la mutación K65R explica el fenotipo de multiresistencia a NRTIs. Igualmente las mutaciones K103N, Y181C y G190A confieren alta resistencia a NNRTIs. Por último, la presencia de las mutaciones de la proteasa G48V, I54V, V82A y L90M, en combinación con L10I, L63P, A71V, V77I, explican la alta resistencia a SQV, RTV, IDV y NFV. La ausencia de mutaciones en la proteasa como I50V, I54L/M o I84V explica la escasa pérdida de sensibilidad a APV.

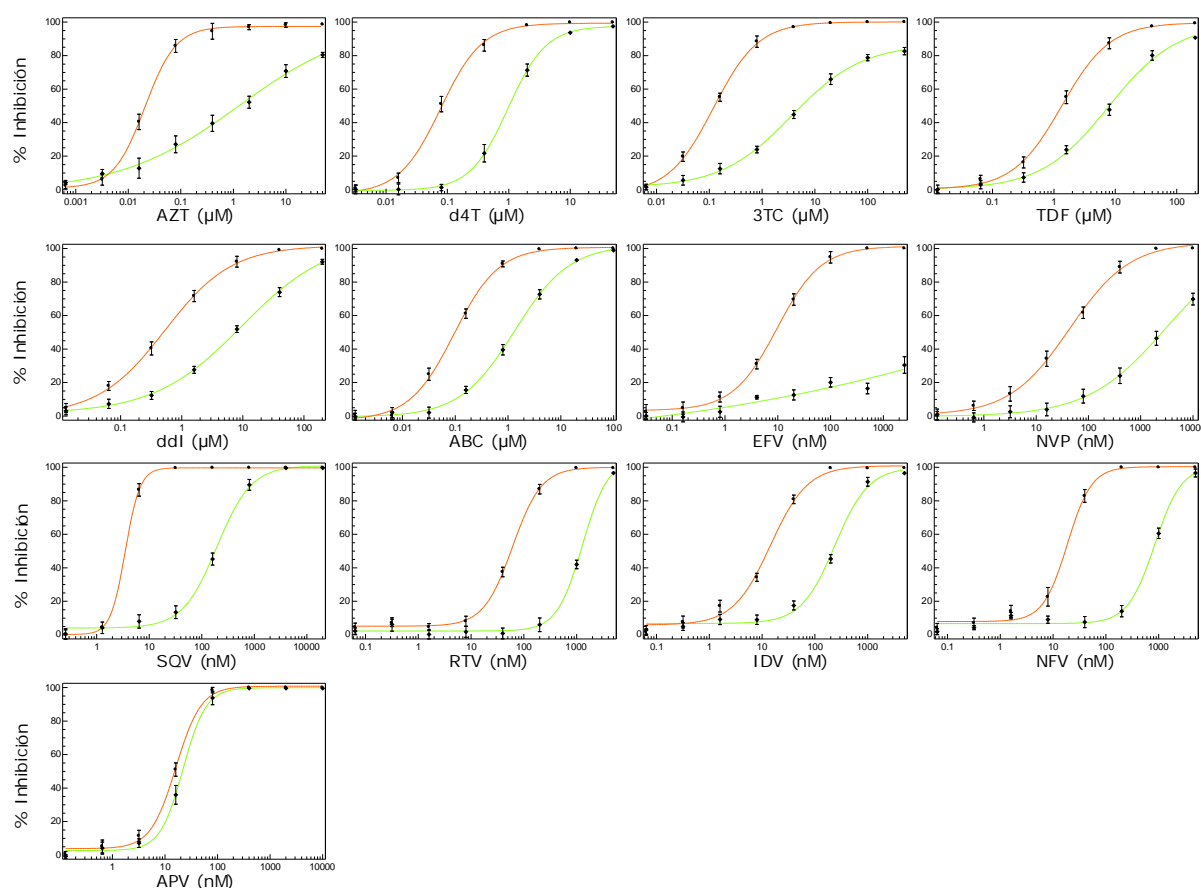


Figura 17. Perfil fenotípico de sensibilidad de un clon viral derivado de paciente. Análisis fenotípico de sensibilidad del clon viral derivado de paciente NL0641Ren (RT: K65R, K70R, V75I, F77L, K103N, F116Y, Q151M, Y181C, G190A; PR: L10I, G48V, I54V, L63P, A71V, V77I, V82A, L90M) (línea verde) y del virus control NL4-3Ren (línea naranja) a los inhibidores de la PR y la RT indicados en la figura. Las curvas de sensibilidad se obtuvieron representando el porcentaje de inhibición de la actividad luciferasa frente al logaritmo en base 10 de la concentración del fármaco. La IC_{50} se calculó mediante una ecuación sigmoidea de cuatro parámetros utilizando el programa GraphPad Prism versión 2.01 (GraphPad Software, San Diego, CA). Cada punto representa la media \pm la DS de tres experimentos. Para calcular los cambios de sensibilidad a fármacos dividimos la IC_{50} de la muestra del paciente entre la IC_{50} del virus de referencia.

2.1.1. Evaluación del sistema fenotípico de sensibilidad a antirretrovirales.

La capacidad del sistema para medir alteraciones en la susceptibilidad a antirretrovirales se demostró con una serie de clones virales derivados de pacientes, que presentaban múltiples mutaciones asociadas a resistencia tanto de inhibidores de la PR como de la RT. En este apartado decidimos usar clones en vez de poblaciones para evitar posibles enmascaramientos ocasionados por poblaciones minoritarias presentes en el paciente y así poder determinar con seguridad la sensibilidad y reproducibilidad del sistema. En la tabla 6 se muestran los resultados de sensibilidad a antirretrovirales para los once clones seleccionados junto con las mutaciones asociadas a resistencia de cada uno de ellos. Todos los resultados obtenidos, en cuanto a las alteraciones en la susceptibilidad a los tres tipos de fármacos (ITIANs, ITINNs e IPs), fueron consistentes con los datos descritos en la bibliografía tanto desde el punto de vista de la magnitud como de la especificidad (Boden y Markowitz, 1998; Hirsch y col., 2003; Johnson y col., 2005). Por ejemplo, la mutación M184V en la RT del clon 0360 redujo dramáticamente la sensibilidad a 3TC (Gao y col., 1993; Tisdale y col., 1993) y resensibilizó frente a la ZDV (Larder y col., 1993; Larder y col., 1995). El ensayo es capaz de medir el incremento paulatino de pérdida de susceptibilidad a ZDV según aumentan el número de mutaciones asociadas con resistencia a AZT, como sucede en los clones VGG, 1252 y RPC (Kellam y col., 1994). También nos ha permitido analizar combinaciones de mutaciones muy complejas que confieren multiresistencia a ITIANs, como el complejo Q151M (Shirasaka y col., 1995; Iversen y col., 1996), la inserción 69 (de Jong y col., 1999; Larder y col., 1999) o mutaciones de resistencia cruzada a IPs (Boden y Markowitz, 1998).

2.1.2. Estudio de reproducibilidad del ensayo fenotípico.

Con el fin de evaluar la reproducibilidad del sistema se llevaron a cabo dos estrategias. En primer lugar, se repitió el ensayo 6 veces con el virus control NL43Ren y con el clon viral multiresistente NL0641Ren frente a trece antirretrovirales diferentes. Cada perfil de sensibilidad se realizó por triplicado y con el mismo stock viral. En la tabla 7 se muestran la media de las IC_{50} s, la desviación estándar y el intervalo de confianza 95% de las seis determinaciones para cada antirretroviral.

Tabla 6. Análisis de la sensibilidad a antirretrovirales de virus recombinantes derivados de pacientes con diferentes patrones de mutaciones de resistencia.

Muestra ^a	Genotipos			Fold de resistencia ^b (IC ₅₀ virus de paciente/IC ₅₀ virus de referencia)												
				ITIAN					ITINN				IP			
	ITIAN	ITINN	IP	AZT	D4T	3TC	TDF	ddI	ABC	EFV	NVP	SQV	RTV	IDV	NFV	APV
1252	M41L, K70R, T215F, K219Q		M36I	20.4	1.6	3.6	3.3	1.0	3.1							
0360	A62V, M184V			0.6	0.6	>150	0.6	1.1	1.5							
1174	M41L, E44D, D67N, T69D, V118I, M184V, L210W, T215Y		L10I, K20R, M36I, V82A	8.9	1.4	>150	2.5	2.3	4.1			1.1	10.2	3.6	3.9	3.9
1412	M41L, E44D, D67N, T69D, V75M, V118I, M184V, L210W, T215Y	K101E, V108I, G190A	L10I, M46I, I54V, V77I, V82F	22.1	2.1	>150	2.8	3.5	6.8			0.6	16.1	8.1	9.6	6.8
2169	M41L, E44D, A62V, D67E, 69ins, V118I, L210W, T215Y	K103N, Y181C, G190A	M36I, I54V, L63P, A71V, G73S, L90M	216.2	18.2	40.9	6.5	5.6	10.3	54.8	>200	5.6	8.8	6.1	10.5	1.2
0641	K65R, K70R, V75I, F77L, F116Y, Q151M	K103N, Y181C, G190A	L10I, G48V, I54V, L63P, A71V, V77I, V82A, L90M	64.1	12.9	30.5	5.8	15.2	13.6	>250	67.3	55.4	21.0	17.4	44.8	1.4
ELP	M41L, D67N, M184I, L210W, T215F		L10I, K20M, M36I, M46L, I54V, L63P, A71T, V82A	15.7	1.8	>150	3.4	3.6	4.8			2.5	58.5	49.2	26.3	16.4
VGG	M41L, T215Y	K103N, P225H	L10V, L24I, M46I, I54V, L63P, V82A	12.3	1.4	2.53	1.8	0.7	1.5	>250	>200	1.6	26.7	7.1	20.1	4.2
RPC	M41L, E44D, D67N, V118I, L210W, T215Y, K219R	G190A	L10F, M36I, I54V, L63P, A71V, G73S, I84V, L90M	31.2	2.3	5.8	3.7	1.7	2.8	31.7	73.1	123.5	33.9	29.1	22.8	5.2
61010	K65R, M184V	V106A, G190A	L63P, V77I	0.5	0.6	>150	1.6	1.4	5.5	12.8	71.3	0.6	0.8	0.6	0.8	0.5
79280	K65R, K70R, V75I, F77L, F116Y, Q151M, M184I		L10I	120.7	6.8	>150	4.1	19.3	21.4	0.9	0.9	0.8	1.2	0.9	1.0	1.1

^a Se seleccionaron clones a partir de las poblaciones recombinantes derivadas de cada paciente.

^b Para calcular los cambios de sensibilidad a fármacos dividimos la IC₅₀ de la muestra del paciente entre la IC₅₀ del virus de referencia.

Tabla 7. Reproducibilidad de la determinación de la sensibilidad de los factores

Muestra estadística ^a	PIAN(µM)						PIIN(nM)			IP(nM)			
	AZI	DIT	3IC	TDF	cd	ABC	EFV	NP	SOV	RIV	IDV	NIV	APV
Media I ₅₀	0020	0078	0120	1.341	0510	0096	9860	4547	3492	6099	1383	1879	1608
N4-3Rn SD(n=6)	0004	0018	0026	0446	0104	0033	1890	797	0802	875	229	439	382
CI 95%	0003	0015	0021	0357	0083	0026	1513	637	0642	700	183	351	305
Media I ₅₀	1.281	1.004	3.665	7.784	9.773	1.335	>2500	3061	1985	182	241.4	8433	2216
N064Rn SD(n=6)	0275	0249	0797	1.833	1.818	0416	-	667.1	687	261.4	508	201.8	497
CI 95%	0220	0199	0633	1.443	1.479	0333	-	5338	549	2092	407	161.5	398

^aLa reproducibilidad del análisis de la I₅₀ se valoró realizando seis determinaciones independientes del virus de referencia N4-3Rn y del virus de resistencia N064Rn (RF: K5R, K3R, V5I, F7L, K0N, H16Y, Q51M, Y83C, G90A, R110I, G8V, I54V, I62P, A1V, V7I, V82A, I90M). Se muestran la desviación estándar (SD) y el intervalo de confianza (CI) del 95% de las seis determinaciones para cada fármaco.

Table 8 Evaluation of the reproductive fitness of the complete genome

Muestra ^a	Grupos			Efectividad (IC ₅₀ virus de paciente/IC ₅₀ virus de referencia)												
	PIAN	PIIN	IP	PIAN				PIIN				IP				
				AZI	D4I	3IC	TDF	cd	ABC	EFV	NVP	SOV	RIV	IDV	NFV	AVV
VCGA	M1L, T215Y	K103N P228H	L10I, L24I, M46I, I54V, L63P, V82A	252	15	29	19	08	17	>200	>200	1.3	166	87	153	36
VCGB	M1L, T215Y	K103N P228H	L10I, L24I, M46I, I54V, L63P, V82A	243	12	32	22	09	19	>200	>200	1.7	254	101	161	29
FCGA	M1L, E44D, D67N, V118I, L210V, T215Y, K219R	K103K/N G90A	L10I, M46I, I54V, L63P, A71V, G73S, I84V, L90M	638	37	57	35	21	97	1335	1537	1205	361	259	168	54
FCGB	M1L, E44D, D67N, V118I, L210V, T215Y, K219R	K103K/N G90A	L10I, M46I, I54V, L63P, A71V, G73S, I84V, L90M	889	54	106	56	19	69	1456	1458	1182	309	223	244	37
61010A	K65R, M84V	V106A G90A	L63P, V77I	05	08	>100	18	26	105	133	756	07	09	04	07	03
61010B	K65R, M84V	V106A G90A	L63P, V77I	06	07	>100	22	22	90	152	694	05	09	05	09	04
7280A	K65R, K103R, V83I, F77L, F116Y, Q151M, M184I, M187V		L10I	1055	87	>100	48	243	241	08	07	09	16	10	11	09
7280B	K65R, K103R, V83I, F77L, F116Y, Q151M, M184I, M187V		L10I	1162	113	>100	76	263	271	09	08	08	13	08	12	12

^aLa reproducibilidad del genoma completo se valorizó por duplicado en paralelo por completo 4 muestras de pacientes infectados con virus que presentaban representaciones de resistencia.

Por otro lado evaluamos la reproducibilidad del ensayo completo procesando por duplicado el plasma de 4 pacientes infectados con virus que presentaban diferentes perfiles genotípicos. Los resultados de este análisis se muestran en la Tabla 8, donde la diferencia entre las IC_{50} s de las medidas realizadas por duplicado fue menor de dos veces. Todos los resultados obtenidos son consistentes con el perfil genotípico del paciente teniendo en cuenta los datos descritos en la bibliografía.

2.2. Estudio de los efectos sinérgicos y antagónicos de combinaciones de dos inhibidores análogos a nucleósidos.

Como los tests fenotípicos actuales permiten realizar el ensayo con un único fármaco, se analizó si el sistema desarrollado permitía analizar la susceptibilidad de dos ITIANs combinados. Esta familia de fármacos fue elegida porque representa la base de todo tratamiento antirretroviral y tras un primer fracaso es el componente del tratamiento cuyo reemplazo resulta más complejo.

En busca de un modelo más fisiológico se adaptó el sistema de detección de resistencias para estudiar el efecto sinérgico o antagónico de la combinación de fármacos. Debido a los diferentes perfiles de sensibilidad observados en experimentos realizados en paralelo en MT-2 y PBMCs, se decidió utilizar PBMCs, en lugar de la línea celular MT2. Como se muestra en la Figura 18, existe una clara diferencia de IC_{50} entre los dos tipos celulares para varios inhibidores de la RT análogos a nucleósidos (AZT, d4T y 3TC). Los PBMCs presentan una gran variabilidad de expresión de proteínas de superficie dependiendo del donante (Ciuffi y col., 2004). Por tanto, para evitar posibles alteraciones en la infectividad con el virus NL4-3Ren, se decidió utilizar el virus de ciclo único NL4-3LucR-E- pseudotipado con VSV-G, que no requiere una entrada específica mediada por receptor (Naldini y col., 1996).

Así, los perfiles de susceptibilidad a NRTIs se realizaron infectando PBMCs en presencia del inhibidor, de forma individual o combinada, con el virus NL4-3LucR-E- pseudotipado con VSV-G. Las combinaciones de las drogas se hicieron en una relación molar fija y de igual potencia, teniendo en cuenta las IC_{50} de cada droga (Tabla 9). Las combinaciones de fármacos analizadas se seleccionaron en función del interés y uso en la práctica clínica: ZDV+d4T, 3TC+ABC, 3TC+ddI, 3TC+d4T, TDF+d4T, TDF+ddI, TDF+ABC, TDF+3TC y TDF+ZDV. Los valores de actividad luciferasa obtenidos se analizaron representando el porcentaje de inhibición de la actividad luciferasa frente a la concentración del fármaco y se analizó el efecto sinérgico o antagónico según la ecuación “median-effect” descrita por Chou y Talay

(Chou y Talalay, 1984) mediante el programa Calcsyn (Biosoft). Cada combinación se repitió entre 3-6 veces y solo se seleccionaron las curvas que presentaban un coeficiente de linealidad (r) por encima de 0.9.

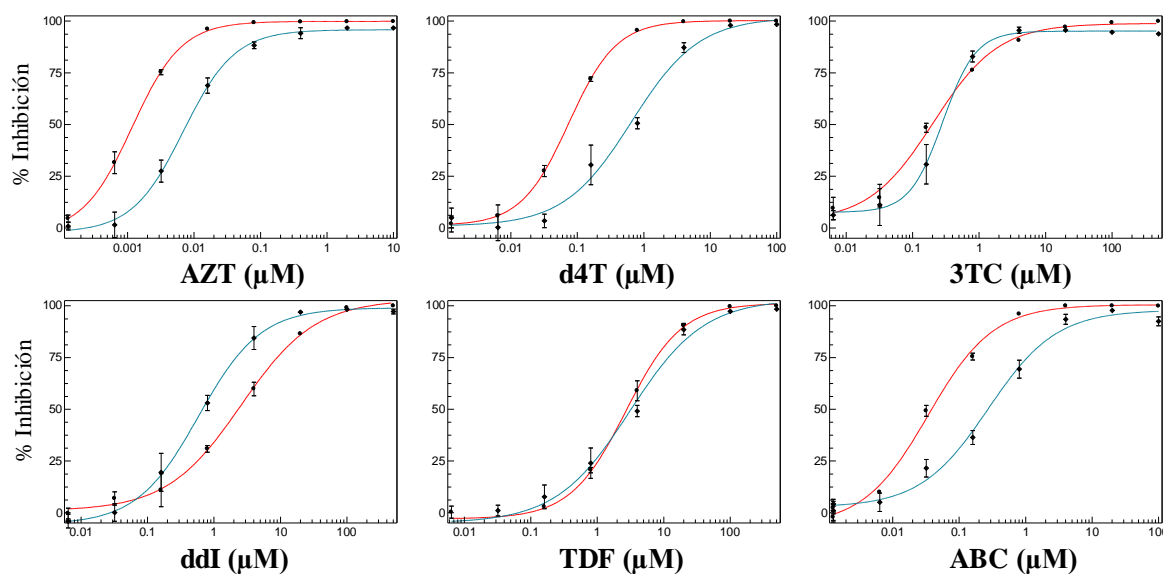


Figura 18. Comparación del perfil fenotípico de sensibilidad a ITIANs entre MT2 y PBMCs. Análisis fenotípico de sensibilidad a los ITIANs indicados en la figura de un virus wild-type (NL4.3LucR-E- pseudotipado con la envuelta de VSV) en células MT2 (línea azul) y PBMCs (línea roja). Las curvas de sensibilidad se obtuvieron representando el porcentaje de inhibición de la actividad luciferasa frente al logaritmo en base 10 de la concentración del fármaco. La IC_{50} se calculó mediante una ecuación sigmoidea de cuatro parámetros utilizando el programa GraphPad Prism versión 2.01 (GraphPad Software, San Diego, CA). Cada punto representa la media \pm la SD de tres ensayos.

El análisis efectuado mostró un claro efecto sinérgico de las combinaciones TDF+d4T y TDF+ZDV a las diferentes concentraciones inhibitorias (ED_{50} , ED_{75} , ED_{90}). Los valores de CI en estas dos combinaciones mostraron una diferencia estadísticamente significativa con el resto de combinaciones a las diferentes ED analizadas ($p < 0.05$, test de Mann-Whitney). También se observó un claro efecto antagónico ($CI > 1.30$) en las combinaciones TDF+ddI y 3TC+ddI en todas las ED analizadas. Además, a la ED_{50} el CI de la combinación TDF+ddI es claramente antagónica en comparación con el resto de combinaciones ($p < 0.05$, test de Mann-Whitney). A ED_{90} los CI de las combinaciones TDF+ddI y 3TC+ddI mostraron diferencias significativas con las combinaciones sinérgicas (TDF+d4T, TDF+ZDV) o aditivas (d4T+3TC) ($p < 0.05$, test de Mann-Whitney), pero no cuando se compararon con otras combinaciones. También se encontró un claro efecto antagónico ($CI > 1.30$) a ED_{50} en las combinaciones 3TC+ABC, 3TC+TDF y 3TC+d4T, pero a ED_{90} solo resultaron levemente antagónicas (3TC+ABC y 3TC+TDF) o incluso aditivas (3TC+d4T). La combinación TDF+ABC se mostró levemente antagónica (entre 1.10 y 1.30) a todas las ED analizadas. El

efecto de la combinación entre ZDV y d4T mostró ser sinérgico en valores de ED₅₀, aditivo para valores de ED₇₅ y claramente antagónico para valores de ED₉₀ (Tabla 9 y figura 19).

Tabla 9. Efecto sinérgico, aditivo o antagónico de diferentes combinaciones de ITIANs.

Indice de combinación (CI) de diferentes mezclas de ITIAN (Ratio)									
	TDF+d4T (10:1)	TDF+AZT (100:1)	3TC+ddI (1:12,5)	TDF+ddI (2:1)	3TC+ABC (1:10)	TDF+3TC (20:1)	3TC+d4T (1:2)	TDF+ABC (2:1)	AZT+d4T (1:10)
ED ₅₀	0.77	0.42	1.64	2.70	1.49	1.63	1.47	1.23	0.63
SD	0.22	0.22	0.38	1.03	0.19	0.58	0.33	0.46	0.24
ED ₇₅	0.52	0.41	1.48	2.14	1.33	1.31	1.19	1.18	1.07
SD	0.18	0.23	0.18	0.74	0.09	0.35	0.24	0.38	0.38
ED ₉₀	0.55	0.42	1.55	1.65	1.28	1.24	1.01	1.16	1.96
SD	0.11	0.26	0.23	0.59	0.09	0.39	0.30	0.38	0.80

Las interacciones entre fármacos se definieron mediante el índice de combinación (CI) a diferentes concentraciones inhibitorias (ED₅₀, ED₇₅, ED₉₀) según el método de Chou y Talalay. Los valores de CI se definieron como: >1.30 antagónicos, 1.10-1.30 levemente antagónicos, 0.90-1.10 aditivos, 0.70-0.90 levemente sinérgicos, <0.70 sinérgicos. SD: Desviación estandar. Para cada combinación se realizaron entre tres y seis experimentos y cada uno de ellos por triplicado.

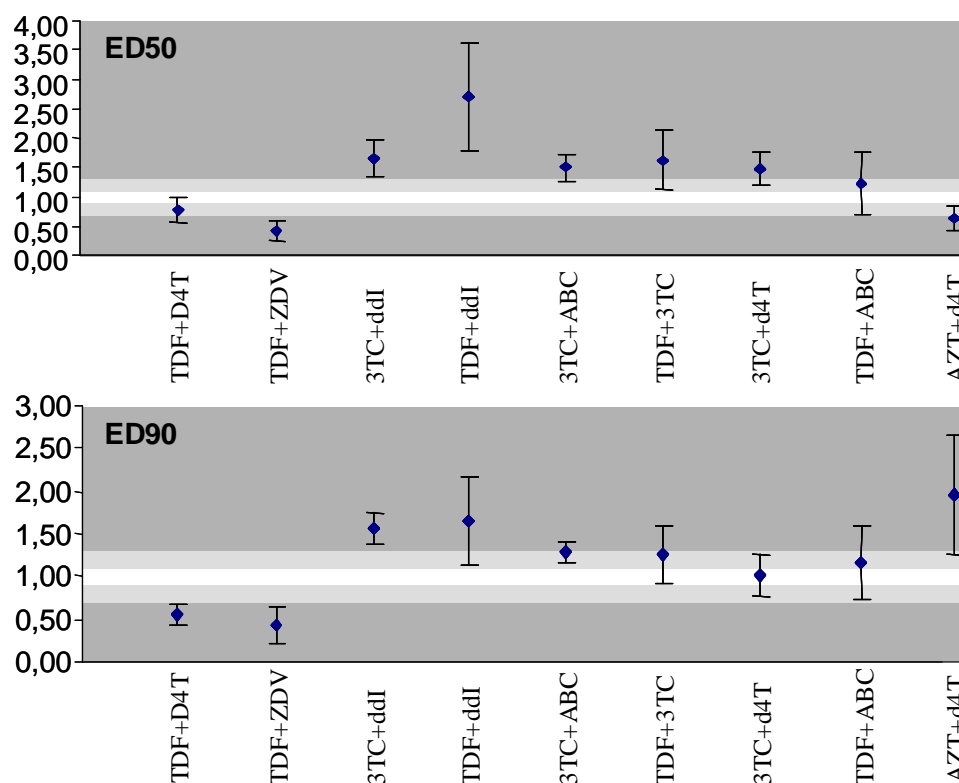


Figura 19. Representación esquemática de los valores CI y las SD de la tabla 9 a ED₅₀ y ED₉₀. Los valores de CI se definieron como: >1.30 antagónicos, 1.10-1.30 levemente antagónicos, 0.90-1.10 aditivos, 0.70-0.90 levemente sinérgicos, <0.70 sinérgicos. Las diferencias experimentales entre las diferentes combinaciones de fármacos se analizaron mediante un test no paramétrico (Mann-Whitney) usando el programa SPSS (v 13.0), donde los valores de $p < 0,05$ se consideraron significativos.

2.3. Estudio de la capacidad replicativa de virus resistentes a antirretrovirales.

En los últimos años, además del análisis genotípico y fenotípico de resistencias, se ha estudiado incorporar la medida del fitness viral para decidir las estrategias de tratamiento de los pacientes infectados por VIH, especialmente en aquellos casos de pacientes multitratados donde es imposible conseguir un régimen de supresión completo. Uno de los componentes del fitness viral es la capacidad replicativa del virus en ausencia de droga. Aunque el análisis de la capacidad replicativa del gen *pol* no es una medida completa del fitness viral, se ha comprobado en algunos trabajos, que este valor *in vitro* correlaciona notablemente con el valor *in vivo* (Prado y col., 2002; Weber y col., 2003). Sin embargo, pocos trabajos han estudiado la contribución de la PR y la RT por separado al fitness viral (Bleiber y col., 2001; Weber y col., 2003; van Maarseveen y col., 2006). Así, el siguiente objetivo de este trabajo fue adaptar nuestro sistema de virus recombinantes al estudio de la capacidad replicativa del VIH, y analizar de manera conjunta y por separado el impacto de las mutaciones de la PR y de la RT sobre la capacidad replicativa.

2.3.1. Capacidad replicativa de virus recombinantes sensibles a antirretrovirales.

Antes de realizar cualquier ensayo con virus resistentes a antirretrovirales, se decidió analizar la capacidad replicativa de variantes virales procedentes de pacientes en primoinfección que no presentaran mutaciones de resistencia. Los virus sensibles a antirretrovirales mostraron un amplio rango de valores de capacidad replicativa, probablemente por la gran variabilidad de polimorfismos genéticos presentes en cada estirpe viral (Wrin y col., 2001; Bates y col., 2003). A pesar de la ausencia de mutaciones de resistencia, los valores de capacidad replicativa de los virus recombinantes con las secuencias de *pol*, PR o RT fueron del 65, 58 y 23% en comparación con el virus de referencia NL4-3Ren que se consideró 100% de capacidad replicativa. La media de estos valores de capacidad replicativa se usaron como referencia para el análisis de virus resistentes derivados de pacientes.

2.3.2. Evaluación del ensayo de capacidad replicativa.

Con la finalidad de comprobar la capacidad del sistema para medir cambios en la capacidad replicativa, se analizaron clones generados por mutagénesis dirigida y poblaciones virales recombinantes derivadas de pacientes con las mutaciones de resistencia K65R, M184V

y K65R+M184V, que como se ha descrito previamente modifican la capacidad replicativa (White y col., 2002; Deval y col., 2004). Para ello se infectaron células MT2 con inóculos virales normalizados por p24, y se analizó la replicación viral a diferentes tiempos midiendo la actividad luciferasa en los lisados celulares. Como se observa en la Figura 20, tanto los virus generados por mutagénesis dirigida como los derivados de pacientes replicaron eficazmente, y las diferencias en capacidad replicativa, fueron similares en comparación a los virus sensibles de referencia. De hecho, el análisis de los virus generados por mutagénesis dirigida mostró una capacidad replicativa del 57% (K65R), 80% (M184V) y 38% (K65R+M184V) en comparación con el virus de referencia NL4-3Ren. Igualmente, cuando se analizó la capacidad replicativa de los virus resistentes derivados de pacientes en comparación con los virus WTs, los resultados fueron muy similares: 54% para los virus que presentaban la mutación K65R (n=5), 76% para los que presentaban la mutación M184V+NAMs (n=5) y 39% para los que presentaban las dos mutaciones K65R y M184V (n=8) (tabla 10 y figura 21). Estos resultados son consistentes con lo descrito previamente en la bibliografía y demuestran la capacidad del ensayo para medir alteraciones en la capacidad replicativa tanto de mutantes puntuales como de virus derivados de pacientes.

Tabla 10. Mutaciones asociadas a resistencia de los virus recombinantes derivados de pacientes con las mutaciones de resistencia K65R y/o M184V.

CONSTRUCCIONES RECOMBINANTES DE LA RT								
Muestra	Genotipos K65R	CR	Muestra	Genotipos M184V	CR	Muestra	Genotipos K65R+M184V	CR
1	65R,103N,190A	30,5	7	41L,67N,69D,74V,75M,100I,103N,184V,210W,215Y,219N	56,5	11	65R,181C,184V	49,2
2	65R,100I,103N	44,4	8	41L,67N,70R,184V,210W/L,215F,219E	38,3	12	65R,184V	19,9
3	65K/R,74V,103N,181C	77,3	9	41L,67N,70R,74I,98G,118I,184V,215F,219Q	78,9	13	65R,184V	22,5
23	65R	44,8	38	41L,67N,70R,74I,98G,184V,215F,219Q	113,2	14	65R,70R,108I,181C,184V,219E	12,7
31	65R	71,7	0360	62V,184V	93,4	15	65R,115F,184V	54,4
						21	65R,184V	55,2
						39	65R,115F,184V	40,8
						40	62V,65R,184V	62,6

2.3.3. Capacidad replicativa de virus recombinantes resistentes a antirretrovirales.

Con el objeto de analizar el impacto de las mutaciones de resistencia sobre la capacidad replicativa, se seleccionaron 14 aislados virales de pacientes en fracaso terapéutico que presentaban distintos patrones de mutaciones asociadas a resistencia tanto de inhibidores de la PR como de la RT (Tabla 11).

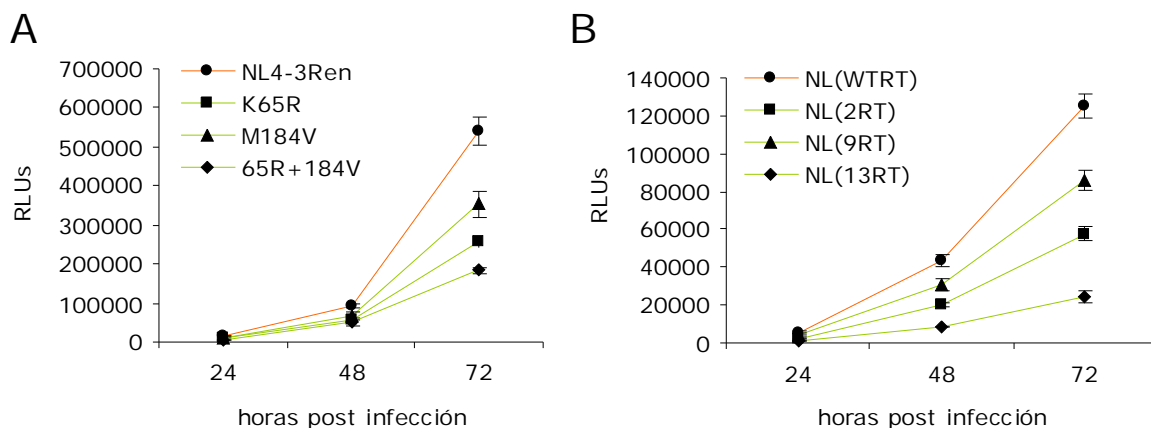


Figura 20. Análisis de la replicación de virus recombinantes con mutaciones de resistencia. Células MT2 se infectaron con cantidades normalizadas de p24 de virus recombinantes generados por mutagénesis dirigida (A) o derivados de pacientes (B). Las mutaciones asociadas a resistencia de los virus recombinantes con la RT derivados de pacientes son NL(2RT)Ren; K65R, L100I, K103N; NL(9RT)Ren: M41L, D67N, K70R, M184V, T215F, K219Q; NL(13RT)Ren: K65R, M184V. La replicación viral se valoró a los tiempos indicados midiendo la actividad luciferasa en los lisados celulares.

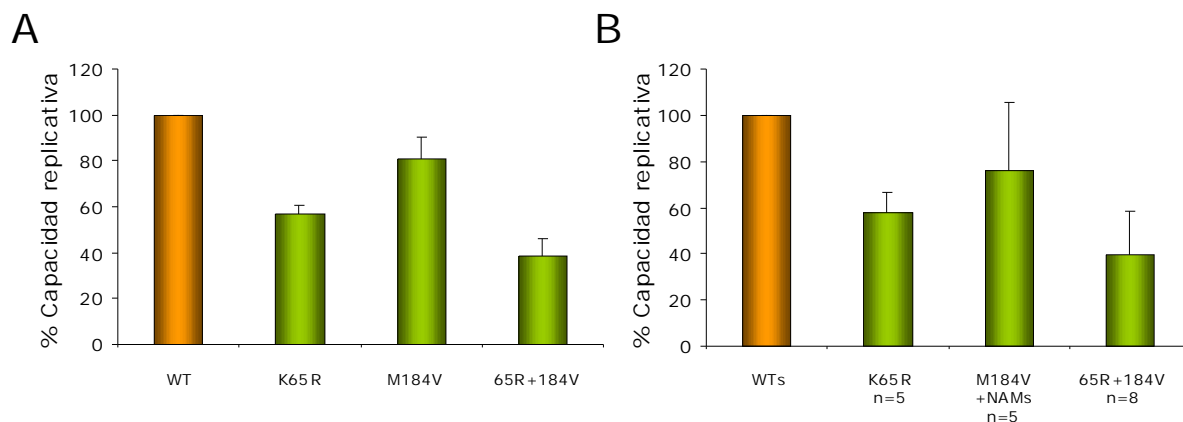


Figura 21. Determinación de la capacidad replicativa de virus recombinantes con las mutaciones de resistencia K65R y/o M184V. La capacidad replicativa relativa se determinó comparando la actividad luciferasa producida por el virus mutante (mutante puntual o derivado de paciente) con la del virus de referencia (NL4-3Ren o WTs derivados de paciente). Las barras de error indican la SD de tres experimentos independientes en el caso de los mutantes puntuales (A) o de los valores de capacidad replicativa de las poblaciones virales descritas en la tabla 10 (B).

Para estudiar la contribución de las mutaciones de la PR y de la RT sobre la capacidad replicativa, se construyeron tres tipos de virus recombinantes que expresaban las secuencias de la PR y de la RT individualmente o en combinación (pol), a partir de cada uno de los aislados virales. Como se observa en la figura 22, los 14 virus recombinantes portadores del gen pol mostraron una pérdida significativa de la capacidad replicativa en comparación con los virus recombinantes sensibles a antirretrovirales. El análisis de los virus recombinantes que únicamente expresan la PR o la RT de cada uno de los pacientes, mostró que la pérdida

de capacidad replicativa se debía principalmente a mutaciones de la PR en 3/14 (GCV, JJVM, 54292) y a mutaciones de la RT en 7/14 (ELP, 1174, 1412, 2169, 0641, 61010, 79280). En los 4 pacientes restantes (DVS, VGG, MGL, RPC) las dos secuencias, tanto la PR como la RT, redujeron la capacidad replicativa a niveles similares. En estos últimos pacientes, los virus recombinantes que expresaban la PR y la RT independiente, mostraron una capacidad replicativa mayor que la del virus recombinante que expresaba el gen pol completo, lo que sugiere que la combinación de las secuencias autólogas de la PR y la RT impiden la replicación viral en mayor medida que de forma separada. Aunque en los virus 54292 y 0641 son las secuencias de la PR y la RT respectivamente las que parecen contribuir en mayor medida a la pérdida de la capacidad replicativa, también hay que tener en cuenta la contribución de la RT para el virus 54292 (CR 53%) y de la PR para el virus 0641 (CR 33%).

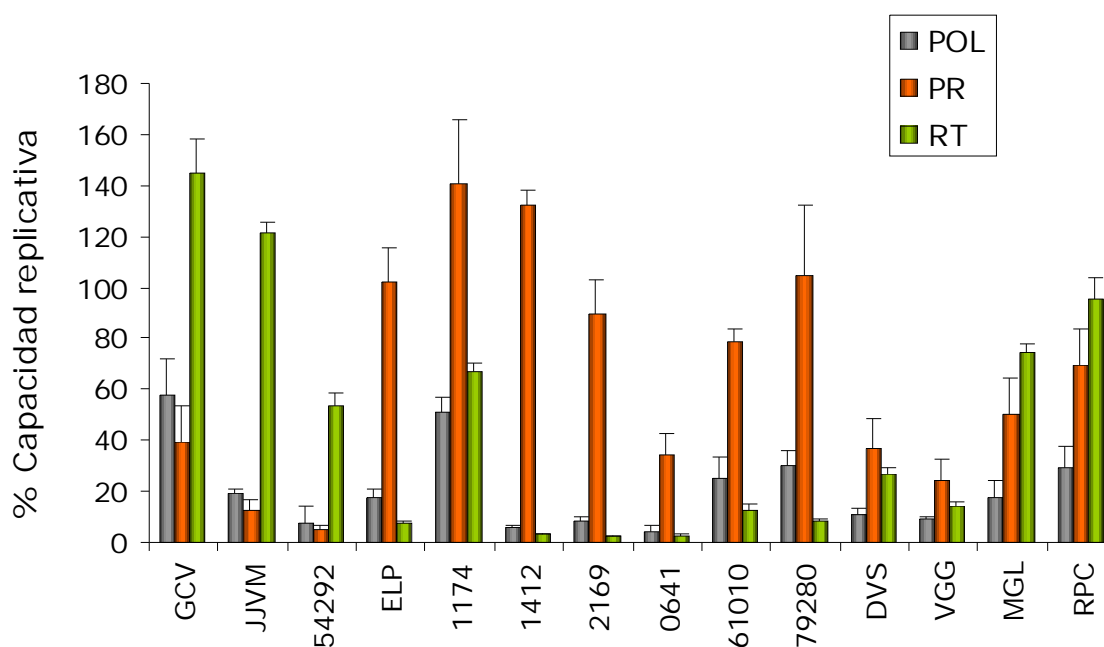


Figura 22. Capacidad replicativa de los virus recombinantes derivados de pacientes en fracaso terapéutico. La capacidad replicativa relativa se determinó comparando la actividad luciferasa producida por los virus recombinantes derivados de pacientes con la actividad luciferasa producida por los virus WTs. Cada valor representa la media \pm la SD de tres experimentos independientes.

Tabla 11. Mutaciones asociadas a resistencia de los 14 virus recombinantes construidos a partir de pacientes en fracaso terapéutico.

Muestra	PR	RT		CVP (copias/ml)
		ITIAN	ITINN	
GCV	L10I, K20R, L33F, M36I, I54V, L63P, A71V, G73S, V82A, L90M	M41L, E44D, 67N, V118I, L210W, T215Y	Y188L	>500.000
JJVM	L10I, K20R, M36I, F53L, I54V, L63P, A71V, G73S, V82A, L90M	M41L, D67N, T69N, K70R, L74I, V75T, T215F, K219Q	G190S	1.926
54292	K20R, L33F, M36L, M46L, I50V, F53F/L, I54V, L63P, A71V, G73S, V77I, V82F, L90M	K65R, K70R, V75I, F77L, Y115F, F116Y, Q151M, M184I	Y181C, G190A	252.117
ELP	L10I, K20M, M36I, M46L, I54V, L63P, A71T, V82A	M41L, D67N, M184I, L210W, T215F		10.934
1174	L10I, K20R, M36I, V82A	M41L, E44D, D67N, T69D, V118I, M184V, L210W, T215Y		36.210
1412	L10I, M46I, I54V, V77I, V82A/F	M41L, E44D, D67N, T69D, V75M, V118I, M184V, L210W, T215Y	K101E, V108I, G190A	18.010
2169	M36I/M, I54V, L63P, A71V, G73S, L90M	M41L, E44D, A62V, D67E, 69ins, V118I, L210W, T215Y	K103N, Y181C, G190A/S	35.124
0641	L10I, G48V, I54V, L63P, A71V, V77I, V82A, L90M	K65R, K70R, V75I, F77L, F116Y, Q151M	K103N, Y181C, G190A	11.519
61010	L63P, V77I	K65R, M184V	V106A, G190A	2225
79280	L10I/L	K65R, K70R, V75I, F77L, F116Y, Q151M, M184I/M		1.359
DVS	L10I, V32I, L33F, M46I, I47V, F53L, I54V, L63P, A71V, G73A, V82A, L90M	M41L, E44D, D67N, L74I, V75A, V118I, L210W, T215Y		20.442
VGG	L10F, L24I, M46I, I54V, L63P, V82A	M41L, T215Y,	K103N, P225H	6.960
MGL	L10F, K20R, M36I, M46I, I54V, L63P, A71V, V82A	D67N, K70R, T215F	Y188L	55.028
RPC	L10F, M36I, I54V, L63P, A71V, G73S, I84V, L90M	M41L, E44D, D67N, V118I, L210W, T215Y, K219R	K103N, G190A	7.249

3. ANÁLISIS LA CAPACIDAD REPLICATIVA DE VIRUS PORTADORES DE LA MUTACIÓN DE RESISTENCIA Q151M DE FORMA AISLADA O EN COMBINACIÓN CON LA MUTACIÓN K65R.

Se ha descrito que la mutación K65R se asocia positivamente con la mutación Q151M. Ambas mutaciones tienen una baja prevalencia, sin embargo con la introducción del TDF y el mayor uso de otros NRTIs como el ABC, la prevalencia de la K65R está aumentando y con ello la posibilidad teórica de seleccionar el complejo de multirresistencia Q151M. Este hecho tendría implicaciones muy importantes para el tratamiento, ya que la presencia de estas dos mutaciones genera altos niveles de resistencia a todos los NRTIs (tabla 13). En esta parte del trabajo, en primer lugar se ha estudiado el efecto de esta combinación de mutaciones sobre la capacidad replicativa, y en segundo lugar se ha intentado explicar y predecir la evolución de esta asociación en función de las nuevas pautas de tratamiento antirretroviral.

3.1. Análisis de la capacidad replicativa de virus portadores de las mutaciones K65R y/o Q151M.

3.1.1. Análisis de la capacidad replicativa mediante virus recombinantes

En primer lugar se determinó la capacidad replicativa de los virus generados por mutagénesis dirigida en comparación con el virus de referencia NL4-3Ren. Como se ha descrito previamente, el virus K65R presentó una capacidad replicativa del 57% (White y col., 2002; Deval y col., 2004). El virus Q151M en ausencia o en presencia de las mutaciones adicionales A62V, V75I, F77L y F116Y (Q151c) mostró una capacidad replicativa del 71% y 78% respectivamente. La capacidad replicativa de los dobles mutantes K65R+Q151M y K65R+Q151Mc disminuyó a 35% las dos. Por lo tanto, la introducción de la mutación Q151M reduce la capacidad replicativa del virus K65R, y la reducción en la capacidad replicativa que confiere cada una de las mutaciones por separado, es inferior a la disminución en la capacidad replicativa de la combinación de las dos mutaciones K65R y Q151M en el mismo virus (Figura 23A).

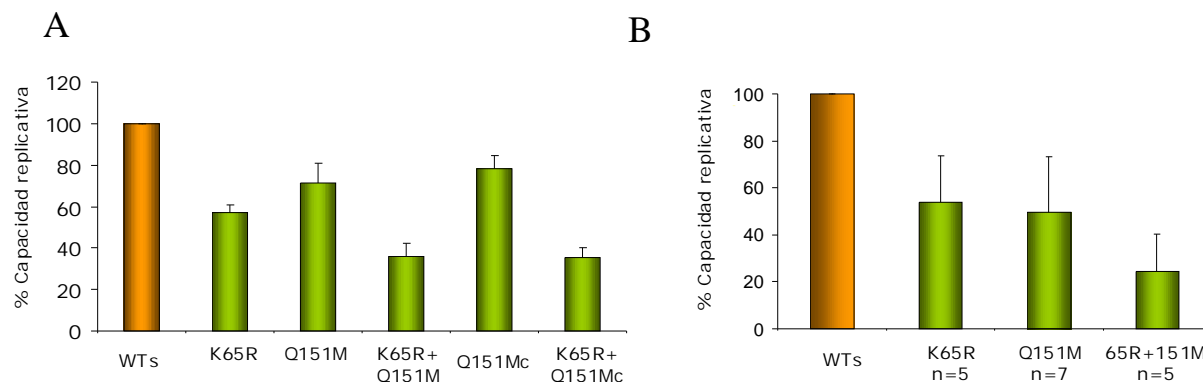


Figura 23. Determinación de la capacidad replicativa de virus recombinantes con las mutaciones de resistencia K65R y/o Q151M. La capacidad replicativa relativa se determinó comparando la actividad luciferasa producida por el virus mutante (mutante puntual o derivado de paciente) con la del virus de referencia (NL4-3Ren o WTs derivados de paciente). Las barras de error indican la SD de tres experimentos independientes en el caso de los mutantes puntuales (A) o de los valores de capacidad replicativa de las poblaciones virales descritas en la tabla 12 (B).

En segundo lugar, se analizó la capacidad replicativa de los virus recombinantes derivados de pacientes que presentaban estas mutaciones. Como se muestra en la figura 23B, los patrones de capacidad replicativa fueron muy similares al de los mutantes puntuales, un 54% en los virus que presentaban la mutación K65R (n=5), un 49% en los virus con el complejo Q151M (n=5) y un 24% en los virus con ambas mutaciones K65R+Q151M (n=8). Los valores de capacidad replicativa de las diferentes poblaciones virales recombinantes, junto con su genotipo de resistencia se muestran en la tabla 12.

Tabla 12. Mutaciones asociadas a resistencia de los virus recombinantes derivados de pacientes con las mutaciones de resistencia K65R y/o Q151M.

CONSTRUCCIONES RECOMBINANTES DE LA RT								
Muestra	Genotipos K65R	RC	Muestra	Genotipos Q151M	RC	Muestra	Genotipos K65R+Q151M	RC
1	65R,103N,190A	30,5	4	62V,75I,101E,115F,116Y,151M, Y181C,190A,219E	64,0	16	65R,70R,75I,77L,116Y,151M	13,8
2	65R,100I,103N	44,4	5	116Y,151M,181C,190A	93,9	25	65R,70R,75I,77L,103N,116Y,151M	19,6
3	65K/R,74V,103N,181C	77,3	6	116Y,151M,181C	44,5	43	65R,67N,69D,116Y,118I,181C,151M	37,1
23	65R	44,8	24	116I,103N,151M,190A	21,5	44	65R,151M,100I,103N	44,8
31	65R	71,7	32	67N,75I,116Y,151M,190A,227L	48,1	44	65R,151M,100I,103N	44,8
			33	116Y,151M	43,9	0641	65R,68G,70R,75I,77L,103N,116Y,151M,181C,190A	7,5
			34	74L/V,151M,101E	32,1			

3.1.2. Análisis de la capacidad replicativa de los diferentes clones virales mediante cinéticas de replicación y ensayos de competición.

Para confirmar los resultados anteriores, se determinó la capacidad replicativa de los clones virales obtenidos por mutagénesis mediante cinéticas de replicación, y ensayos de

competición en ausencia de fármacos. El análisis de las cinéticas de replicación en MT2 mostró un pequeño retraso en la replicación de los virus K65R, Q151M y Q151Mc en comparación con el NL4-3. En el caso de los dobles mutantes K65R+Q151M y K65R+Q151Mc los perfiles de producción de la proteína p24 fueron claramente menores que los de los mutantes simples (Figura 24A). Estos mismos perfiles de replicación se obtuvieron utilizando como células diana PBMCs preactivados durante 48h con PHA + IL-2 (Figura 24B).

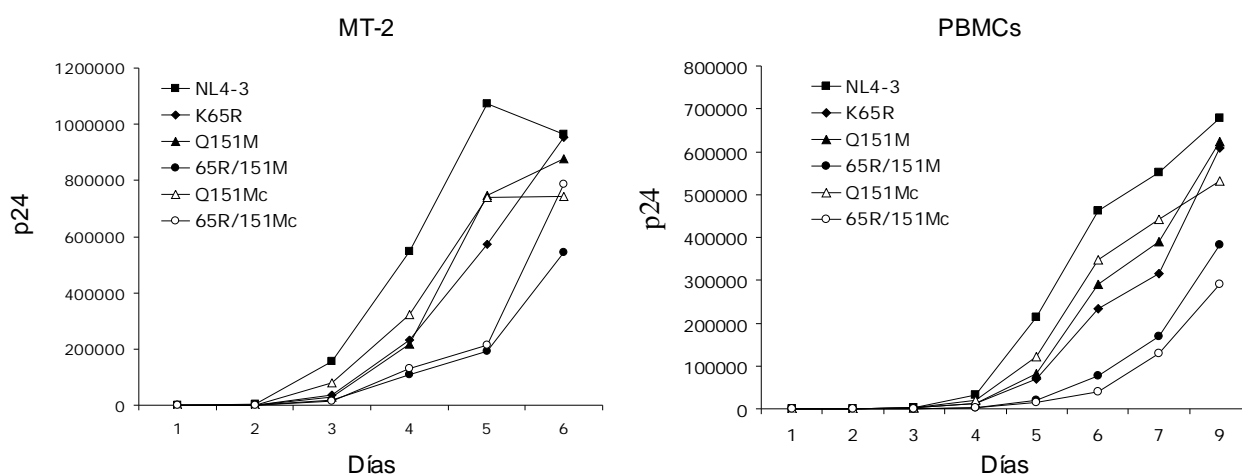


Figura 24. Cinéticas de replicación de los virus indicados en MT2 y PBMCs. Células MT2 (A) y PBMCs (B) se infectaron con cantidades iguales de proteína p24 de los virus indicados. La replicación viral se valoró midiendo la producción de proteína p24 en el sobrenadante. C= (A62V, V75I, F77L y F116Y).

Los ensayos de competición en células MT2 demostraron que todos los mutantes replican peor que el virus WT. El virus Q151M se impuso al virus K65R confirmando que el virus K65R presenta menor CR que el virus Q151M. También se confirmó que los mutantes dobles tienen menos eficacia replicativa que los mutantes sencillos. En los cultivos llevados en paralelo con un solo virus no se detectó ninguna reversión a WT. Las diferencias en las alturas de los picos se realizaron con dos oligonucleótidos diferentes sobre el mismo producto de PCR.

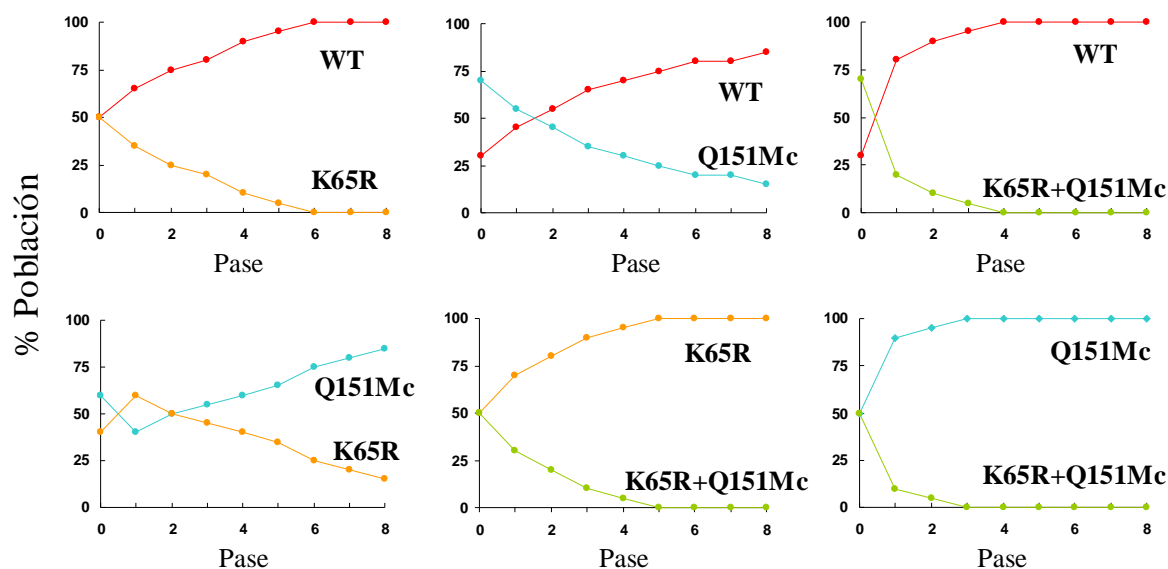


Figura 25. Ensayo de competición viral con los clones virales indicados a una multiplicidad de 0.001 en ausencia de fármaco. La proporción relativa de cada una de las dos poblaciones virales que están compitiendo se estimó en función de la altura de los picos del electroferograma obtenido de la secuenciación del ADN celular como se describe en el apartado 5.3.3 de “Materiales y Métodos”. C= (A62V, V75I, F77L y F116Y).

3.2. Evolución de la asociación entre las mutaciones K65R y Q151M.

3.2.1. Cambios en la frecuencia de asociación entre K65R y Q151M.

En primer lugar, se analizaron los cambios de frecuencia de las mutaciones de resistencia K65R y Q151M a partir de una gran base de datos genotípicos entre los años 2000 a 2006. Como se ha descrito previamente, la frecuencia de la mutación K65R ha aumentado de 0.6% en 2000 a 1.7% en 2006 (Kagan y col., 2004; Valer y col., 2004; Winston y col., 2004). Por el contrario, la frecuencia de la mutación Q151M y el doble mutante K65R/Q151M apenas se modifica durante el mismo periodo de tiempo mostrando un pequeño descenso (de 1.7% en 2000 a 1.2% en 2006) y un pequeño aumento (de 0.3% en 2000 a 0.36% en 2006) respectivamente (Figura 26A). La alta asociación encontrada entre estas dos mutaciones (Winston y col., 2002; Valer y col., 2004; Winston y col., 2004; Segondy y col., 2005), ha sugerido que la presencia de la mutación K65R podría favorecer la selección de Q151M. Sin embargo, aunque K65R se asocia positivamente con Q151M (29%), la asociación entre estas dos mutaciones muestra un claro descenso a lo largo del tiempo, desde un 48% en 2000 hasta un 21% en 2006 (Fig. 26B). Por otro lado, la asociación de Q151M con K65R muestra un incremento moderado en el tiempo, de un 17% en el 2000 a un 29% en el 2006. En un total de 4 pacientes con ambas mutaciones, en los que conseguimos datos longitudinales en la evolución de estas secuencias, en todos los casos la mutación Q151M estaba presente antes de la selección de la mutación K65R (datos no mostrados).

A

Mutación	Numero de genotipos (%)						
	2000 (n=28929)	2001 (n=30882)	2002 (n=37443)	2003 (n=40916)	2004 (n=40970)	2005 (n=46634)	2006 (n=51526)
K65R	179 (0,62)	229 (0,74)	459 (1,23)	919 (2,25)	956 (2,33)	905 (1,94)	869 (1,69)
Q151M	491 (1,70)	541 (1,75)	704 (1,88)	629 (1,54)	697 (1,70)	637 (1,37)	624 (1,21)
65R & 151M	86 (0,30)	97 (0,31)	144 (0,38)	161 (0,39)	210 (0,51)	227 (0,49)	186 (0,36)

B

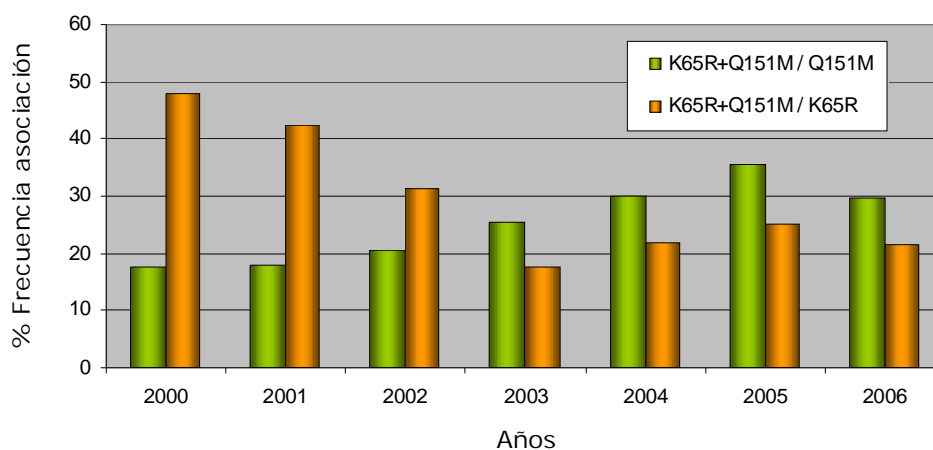


Figura 26. Cambios en la prevalencia y la frecuencia de asociación de las mutaciones K65R y/o Q151M. (A) Prevalencia de las mutaciones indicadas de la base de datos de Virco entre los años 2000 a 2006. (B) Frecuencia de asociación entre las mutaciones K65R y Q151M.

3.2.2. Los virus con la mutación Q151L tienen una desventaja replicativa en presencia de la mutación K65R.

Se ha planteado que el doble cambio (CAG→ATG) para la mutación Q15M ocurre a través del intermediario Q151L (CTG) del cual se ha comprobado que replica pobremente en comparación con el virus WT o con el virus mutante Q151M (Kosaralaksa y col., 1999; Garcia-Lerma y col., 2000). Para comprobar si la presencia de K65R podría ser desfavorable para la selección de la mutación Q151M, determinamos la eficacia replicativa de los mutantes Q151L y K65R/Q151L mediante diferentes métodos experimentales. Se comprobó que las dos variantes replicaban peor en comparación con el virus salvaje y el mutante Q151M, tanto en ensayos de capacidad replicativa con virus recombinantes como en cinéticas de replicación. La capacidad replicativa del clon viral K65R/Q151L (0.2%) fue claramente inferior a la del mutante Q151L (6%) (Figura 27A). El análisis de cinéticas de replicación en cultivos separados, mediante la producción de p24, mostró que el virus Q151L era capaz de reinfectar células MT2, mientras que el virus K65R+Q151L no produjo una infección productiva detectable mediante la medición de los niveles de p24 (Figura 27B).

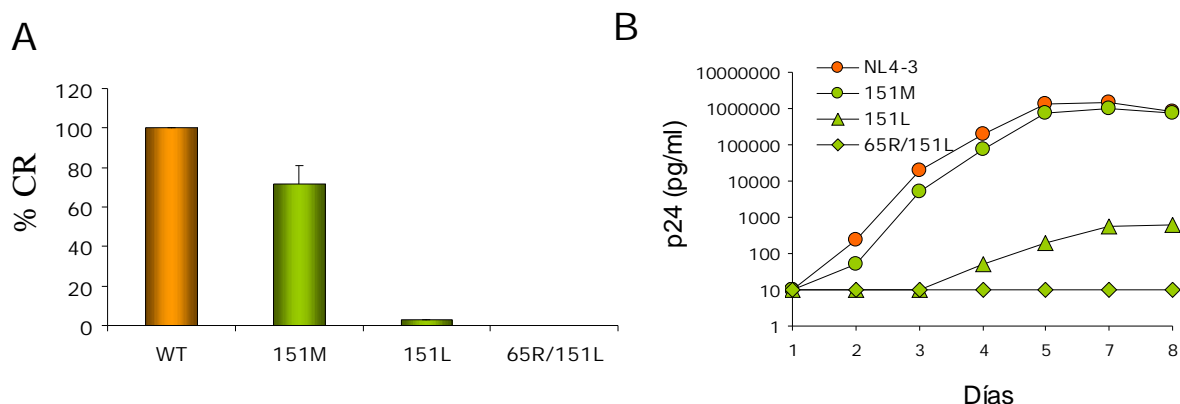


Figura 27. Determinación de la capacidad replicativa de virus recombinantes con las mutaciones de resistencia Q151L y K65R/Q151L. (A) La capacidad replicativa relativa de los mutantes indicados en la figura se determinó comparando la actividad luciferasa producida por el virus mutante con la del virus de referencia NL4-3Ren. Las barras de error indican la SD de tres experimentos independientes. (B) Células MT2 se infectaron con cantidades iguales de proteína p24 de los virus indicados. La replicación viral se valoró midiendo la producción de proteína p24 en el sobrenadante. Los datos son representativos de dos experimentos en los que se obtuvieron resultados similares.

Todos estos resultados demuestran que la presencia de la doble mutación K65R+Q151L genera virus prácticamente defectivos, y podría explicar la disminución en la asociación de la mutación Q151M con la mutación K65R a partir de virus portadores inicialmente de la mutación K65R.

3.2.3. Efecto de la mutación compensatoria S68G en la replicación de los mutantes Q151L and K65R/Q151L.

La mutación S68G se ha definido como una mutación compensatoria que recupera parte de la capacidad replicativa de la mutación Q151L y por tanto, podría facilitar la selección del complejo de multiresistencia Q151M (García-Lerma y col., 2000; Matsumi y col., 2003). Con el objeto de determinar si esta mutación pudiera tener un papel relevante en la selección de la mutación Q151M en presencia de la K65R, se construyeron los virus recombinantes: S68G, S68G/Q151L y K65R/S68G/Q151L; y se analizó su capacidad replicativa (Figura 28). El virus S68G presentó una capacidad replicativa de 102%, confirmando que esta mutación no confiere ninguna desventaja replicativa al virus (García-Lerma y col., 2000). La introducción de la mutación S68G en los virus recombinantes 151L y 65R/151L restauró parcialmente su capacidad replicativa de 2.7% y 0.08% en su ausencia a 14% y 1% en su presencia respectivamente. A pesar del aumento de capacidad replicativa del virus 65R/151L en presencia de la mutación S68G, su capacidad replicativa sigue estando por debajo del virus

con la Q151L aislada. Este resultado sigue sugiriendo que la selección de la mutación Q151M en presencia de K65R pueda estar seriamente comprometida a pesar de que la mutación compensatoria S68G esté presente.

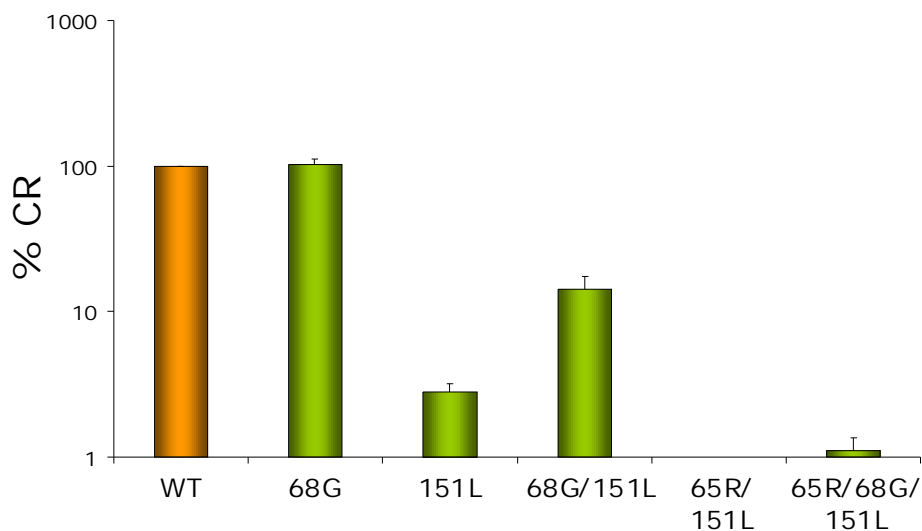


Figura 28. Capacidad replicativa de los mutantes puntuales Q151L y K65R+Q151L en presencia de la mutación compensatoria S68G. La capacidad replicativa relativa de los mutantes indicados en la figura se determinó comparando la actividad luciferasa producida por el virus mutante con la del virus de referencia NL4-3Ren. Las barras de error indican la SD de tres experimentos independientes.

3.2.4. Análisis de la susceptibilidad a NRTIs de los clones virales Q151M/L en presencia o ausencia de K65R.

Por último, se estudió la sensibilidad fenotípica a ITIANs de los clones virales con las mutaciones de resistencia presentes en la Tabla 13. El virus con la mutación K65R presentó una reducción de sensibilidad a 3TC, ddI, ABC y TDF, pero no mostró resistencia ni a AZT ni a d4T. Por otro lado, el virus con la mutación Q151M, principalmente en presencia de las mutaciones A62V, V75I, F77L y F116Y, mostró altos niveles de resistencia a AZT, d4T, ddI y ABC, y ninguna resistencia a 3TC y TDF. Sin embargo, los virus que presentan las dos mutaciones K65R+Q151M mostraron altos niveles de resistencia a todos los NRTIs analizados, incluido el TDF, y esa resistencia fue mayor que la presente con cada mutación por separado. El virus con la mutación Q151L presentó una reducción de la sensibilidad a ddI y ABC, no presentó resistencia a 3TC, AZT y d4T, e interesantemente presentó hipersusceptibilidad a TDF.

Table 13. Análisis de la susceptibilidad a NRTIs de de los clones virales Q151M/L en presencia o ausencia de K65R.

Mutación	Fold de resistencia (\pm SD)					
	ITIAN					
	AZT	D4T	3TC	TDF	ddl	ABC
K65R	0,6 \pm 0,2	1,4 \pm 0,1	12,9 \pm 4,6	3,6 \pm 1,8	4,8 \pm 0,4	4,9 \pm 0,9
Q151M	3,1 \pm 0,3	3,5 \pm 1,2	2,2 \pm 0,6	1,2 \pm 0,2	6,6 \pm 2,3	3,0 \pm 0,6
65R+151M	6,8 \pm 2,5	6,3 \pm 1,9	28,3 \pm 7,2	6,2 \pm 1,4	20,9 \pm 2,8	15,1 \pm 1,3
Q151Mc	43,5 \pm 15	11,9 \pm 2,2	6,6 \pm 2,4	2,8 \pm 1,3	16,5 \pm 4,3	7,4 \pm 0,1
65R+151Mc	131 \pm 28	23,6 \pm 6,3	63,4 \pm 23	17,3 \pm 2,8	23,3 \pm 7,9	57,1 \pm 14
Q151L	0,7 \pm 0,2	1,5 \pm 0,8	2,4 \pm 0,5	0,3 \pm 0,1	4,3 \pm 1,3	3,7 \pm 1,3
65R+151L	1,2 \pm 0,4	6,9 \pm 2,2	3,9 \pm 0,8	0,9 \pm 0,1	10,4 \pm 1,7	10,2 \pm 4,1

Para calcular los cambios de sensibilidad a fármacos dividimos la IC₅₀ de la muestra del paciente entre la IC₅₀ del virus de referencia. Cada punto representa la media \pm la SD de tres experimentos independientes. C (A62V, V75I, F77L y F116Y).

DISCUSIÓN

1. Desarrollo de un modelo basado en la generación de virus recombinantes en el gen *pol* para el estudio fenotípico de aislados virales de pacientes con infección por el VIH-1.

El principal objetivo de este trabajo radica en analizar el impacto de las mutaciones de resistencia seleccionadas por el tratamiento sobre diferentes aspectos fenotípicos del VIH como los cambios en la susceptibilidad a los distintos antiretrovirales y la capacidad replicativa. Para alcanzar este objetivo, en la primera parte del trabajo se ha desarrollado un modelo basado en el clonaje del gen *pol*, amplificado a partir del plasma de pacientes, en un vector diana que incluye el genoma completo del VIH. Se genera de esta manera una quimera viral portadora de distintas secuencias del gen *pol* del paciente que al incorporar estos fragmentos permite analizar su impacto en la modificación del fenotipo viral respecto a virus salvajes. Este modelo presenta similitudes con otros previamente desarrollados que podemos agrupar genéricamente bajo la denominación de “técnicas basadas en la generación de virus recombinantes”. Estos modelos presentan ventajas importantes sobre los modelos clásicos de aislamiento viral: por una parte reducen la laboriosidad, acortan el tiempo necesario para analizar el virus del paciente y disminuyen notablemente el coste del proceso. Por otra parte, al ser el material de partida plasma, y no linfocitos circulantes, se evitan los sesgos de selección que se producen en cultivo debido a la propagación de las variantes más aptas o a la inhibición de determinadas variantes por quimiocinas inflamatorias producidas en el cultivo. Por último, al clonarse secuencias concretas en un contexto fijo puede analizarse el impacto directo de estos cambios en el fenotipo viral analizado sin que interfieran otras regiones del genoma. Como inconvenientes potenciales se encuentran el hecho de que el virus quimérico así generado no es un aislado del paciente que contenga todas las secuencias y propiedades del virus residente en el mismo, y que el clonaje en un contexto de secuencia diferente puede modificar las propiedades funcionales del fragmento insertado. Estas críticas tienen una base cierta y deben ser controladas y tenidas en cuenta en la evaluación de los resultados. Sin embargo, globalmente los modelos basados en la generación de quimeras virales por técnicas de recombinación genética presentan una serie de ventajas que permiten plantear preguntas sobre el impacto de determinados cambios genotípicos en el fenotipo viral que serían de otro modo difíciles de abordar con las metodologías clásicas de aislamiento en cultivo.

El ensayo fenotípico descrito se fundamenta, por tanto, en la construcción de virus recombinantes que permiten analizar tanto la información genotípica como fenotípica de las

secuencias implicadas en el desarrollo de resistencias. Para ello seguimos la siguiente estrategia:

En primer lugar, para poder cuantificar la replicación viral con mayor sensibilidad y mejorar la reproducibilidad del sistema, decidimos sustituir en el vector proviral el gen regulador *nef* por un gen indicador luciferasa. La proteína Nef es un factor patogénico muy importante *in vivo* pero se ha demostrado que es dispensable en cultivo (Fisher y col., 1986; Terwilliger y col., 1986). En la primera construcción se introdujo el gen luciferasa de luciérnaga (NL4-3Luc), y posteriormente, se recuperó la expresión de Nef mediante la introducción de una secuencia IRES (NL4-3LucIRES_{nef}). Ninguna de estas dos construcciones produjo virus capaces de propagarse en cultivo. Sin embargo, un clon viral en el que el gen *nef* fue parcialmente reemplazado por la luciferasa de Renilla dio lugar a una infección productiva (Figura 12C). La ausencia de replicación con estas construcciones virales se debe probablemente a la limitación de los retrovirus para empaquetar más allá del 5-10% de la longitud de su genoma (Balestre y col., 2006). Esto explicaría que la introducción de un gen indicador de menor tamaño, como es el gen de la luciferasa de Renilla, genere virus capaces de producir múltiples ciclos de replicación en cultivo (Figura 12D). Además, en cinéticas de replicación realizadas en MT-2 y en PBMCs con este virus, se encontró una muy buena correlación entre los niveles de proteína p24 y de actividad luciferasa (Figura 13). Esto permite el seguimiento de la replicación viral mediante la valoración de la actividad luciferasa, que es un método mucho más sensible y barato que los test de detección del antígeno p24. La disminución en el tiempo de cultivo necesario para detectar la replicación viral en las células diana, junto con la generación de altos títulos virales mediante la transfección en células 293T, reduce la selección de subpoblaciones virales con mejor capacidad replicativa.

Las secuencias de interés se amplifican a partir del ARN viral y se incorporan en el vector proviral defectivo para esas mismas secuencias, lo que permite generar librerías genómicas de virus recombinantes. Teniendo en cuenta la baja eficacia del proceso de recombinación homóloga *in vivo* (Hertogs y col., 1998; Race y col., 1999), se decidió usar el clonaje del gen de interés *in vitro* para obtener una mayor representatividad de la heterogeneidad presente en los pacientes. De hecho, la comparación entre el ADN de la primera PCR y el de las construcciones recombinantes mostraron un patrón de mutaciones asociadas a resistencia prácticamente idéntico (datos no mostrados). La sustitución de los genes diana por la región amino-terminal del gen *lacZ* en el vector proviral se realizó para evitar el arrastre de secuencias salvajes del clon de origen. Esta estrategia proporciona además un buen control de

calidad de la reacción de ligación al permitir cuantificar el número y proporción de colonias blancas (contienen el inserto) respecto a las azules (no contienen el inserto). El modelo utilizado permite el clonaje de secuencias *pol* de la población viral del paciente. Para demostrar esta representatividad se realizaron diluciones al 1/10 del ARN extraído y se verificó su amplificación siguiendo el mismo protocolo. Posteriormente se utilizó para el clonaje la muestra conteniendo diez veces más de ARN lo que nos asegura una representación al menos relativa de la población viral del paciente. Los cebadores utilizados corresponden a zonas altamente conservadas del genoma del VIH para minimizar el riesgo de amplificación selectiva de determinadas cuasiespecies dentro de la población. Mediante estos controles intentamos asegurar una representatividad de la muestra poblacional del paciente en los virus recombinantes generados. Además, este método permite generar información genotípica y fenotípica a partir de clones individuales mediante la selección de colonias en placa, proporcionando así una información valiosa para poder realizar predicciones de fenotipo basadas en genotipo.

La sustitución del gen *nef* por el gen luciferasa de Renilla en el vector proviral, preserva el gen *env* del VIH y permite la generación de virus recombinantes que son capaces de realizar múltiples ciclos de replicación (Figura 12D). Otros ensayos fenotípicos basados en virus recombinantes, como *Antivirogram* (Hertogs y col., 1998) o *PhenoTect* (Klimkait, 2002), también generan virus infectivos pero sin un gen indicador en el genoma viral limitando la sensibilidad del ensayo. Estos sistemas, por tanto, requieren la amplificación de la progenie viral y una posterior titulación antes de realizar cualquier ensayo fenotípico, lo cual prolonga el proceso y favorece la selección de subpoblaciones mejor adaptadas al cultivo. Otros métodos comerciales, como *Phenosense* (Petropoulos y col., 2000) y *Phenoscript* (Race y col., 1999) están basados en un ensayo de un único ciclo de replicación. Esta estrategia también presenta un inconveniente y es que, a menudo, los virus con baja capacidad replicativa, por la presencia de múltiples mutaciones de resistencia, reducen la posibilidad de realizar el ensayo debido a los bajos niveles de actividad luciferasa que se consiguen con un único ciclo de replicación.

El sistema de virus recombinantes que se describe en este trabajo presenta las ventajas de ambas estrategias: el clonaje de un gen indicador dentro del genoma viral y la generación de virus recombinantes capaces de producir múltiples ciclos de replicación. Previamente, usando modelos basados en clones virales con el gen indicador luciferasa, se demostró que el tiempo necesario para un ciclo de replicación viral completo es menor (0,5 días) (Bermejo y col., 2004) que el calculado con modelos matemáticos (0,92 días) (Mittler y col., 1999). Por tanto,

la valoración de la replicación viral después de 48 horas permite que se den de 2 a 4 ciclos de replicación completos. En algunos casos, en los cuales la presencia de múltiples mutaciones de resistencia disminuye la capacidad replicativa del virus, el test puede evaluarse a 72 horas consiguiendo valores de actividad luciferasa más elevados como se muestra en el caso del clon NL0641Ren (figura 16). Una de las grandes ventajas de este modelo de virus recombinantes es que puede realizarse en tan solo 10 días. Además, la sustitución del gen nef por el gen luciferasa de Renilla preserva el gen de la envuelta y permitiría la construcción de virus recombinantes con este gen y estudiar diferentes aspectos relacionados con la entrada del virus. Una vez desarrollado el modelo de virus recombinantes, se adaptó al estudio de diferentes aspectos fenotípicos del VIH.

2. APLICACIONES DEL MODELO DE VIRUS RECOMBINANTES GENERADO.

2.1. Resistencia fenotípica a antirretrovirales.

La resistencia viral se puede determinar mediante métodos genotípicos, examinando las mutaciones asociadas a resistencia en el genoma del virus, o mediante métodos fenotípicos, analizando la susceptibilidad del VIH a un fármaco determinado (Sebastian y Faruki, 2004). Aunque los dos métodos han demostrado su utilidad en la práctica clínica, los métodos genotípicos son los habitualmente utilizados por su facilidad y accesibilidad a los grupos clínicos responsables del tratamiento de los pacientes. Algunos trabajos muestran que los tests genotípicos permiten una mejor selección de tratamientos antirretrovirales efectivos que los abordajes fenotípicos (Meynard y col., 2002). Una de las posibles razones de estos resultados, es la capacidad de los ensayos genotípicos para identificar mutaciones de transición, que los test fenotípicos son incapaces de detectar (Meynard y col., 2002). Sin embargo, los métodos genotípicos no pueden valorar el nivel de resistencia de nuevas mutaciones o de patrones complejos de mutaciones asociadas a resistencia. Algunos autores sugieren que ambos métodos podrían aportar informaciones complementarias (Parkin y col., 2002) y, por tanto, los ensayos fenotípicos de susceptibilidad a antirretrovirales pueden ser útiles en la práctica clínica en al menos dos situaciones: los pacientes en mult fracasos con combinaciones de mutaciones de resistencia complejas, y en los ensayos clínicos de nuevos antiretrovirales en los que no se conocen los patrones de resistencias generados por métodos genotípicos.

Por tanto, el siguiente objetivo de este trabajo fue aplicar el sistema de virus recombinantes en el gen *pol* de aislados virales de pacientes con infección por el VIH-1 al estudio fenotípico de la susceptibilidad a antirretrovirales. Para ello se comprobó la capacidad del sistema para determinar la IC₅₀ y el *fold* de resistencia de una selección de clones virales derivados de pacientes con diferentes patrones de mutaciones frente a una batería de antirretrovirales pertenecientes a las tres principales familias de fármacos (Tabla 6). Todos los resultados obtenidos correlacionaron estrechamente con los del estudio genotípico. Incluso realizamos un análisis comparativo entre nuestros datos y los datos cedidos por el sistema de fenotipo virtual, encontrando una correlación del 85 % (95% CI: 79-91%; Kappa statistic: 0,77), muy similar al resultado que obtuvo el sistema de fenotipo real de *Antivirogram* en un estudio similar (Verbiest y col., 2000).

Una vez probada la capacidad del ensayo para determinar el *fold* de resistencia de virus recombinantes derivados de pacientes, el siguiente punto importante fue analizar la reproducibilidad del ensayo. La comparación entre los valores de IC₅₀ obtenidos, después de realizar el ensayo completo, por duplicado y en paralelo, de 4 muestras de pacientes infectados con diferentes patrones de mutaciones asociadas a resistencia, presentó una diferencia menor de dos veces. Por tanto, el ensayo mostró un gran nivel de reproducibilidad (Tablas 7 y 8), y similar o ligeramente mejor que otros sistemas ya descritos (Petropoulos y col., 2000). Estos resultados demuestran que este test es capaz de discriminar pequeñas diferencias en susceptibilidad (2- a 4- *fold*) a antirretrovirales, y sugieren que puede ser muy útil para realizar ensayos de resistencia fenotípica en pacientes infectados por VIH en fracaso terapéutico. Para finalmente validar el sistema y comprobar su utilidad en la práctica clínica sería necesario analizar un número mayor de muestras de pacientes infectados por el VIH.

2.2. Estudio de los efectos sinérgicos y antagónicos de combinaciones de dos inhibidores análogos a nucleósidos/nucleótidos.

La familia de fármacos de los ITIAN representa la base de todo tratamiento antirretroviral, y en caso de fracaso, en el momento actual la sustitución de estos fármacos supone una decisión compleja. La elección debe basarse idealmente en la sustitución por ITIAN, sin resistencia a la combinación en fracaso terapéutico. Sin embargo, los distintos grados de resistencia cruzada conferida por las mutaciones dificultan esta elección. Por otra parte, determinados estudios (Blanco y col., 2006; Flandre y col., 2007) muestran una actividad de la intensificación con distintos ITIAN en pacientes en fracaso que ya habían sido

tratados previamente con estos fármacos. Esto sugiere una actividad residual o remanente de los fármacos a los que se presenta resistencia, y plantea la posibilidad de que la sinergia de dichas actividades residuales permita controlar al menos parcialmente la replicación viral.

Los efectos sinérgicos, aditivos o antagonísticos entre ITIAN es un tema poco estudiado en la farmacodinámica de esta familia de fármacos, y algunos estudios sugieren que estas interacciones existen (Merrill y col., 1996; Zhu y col., 1996; Hoggard y col., 1997). Por tanto, el análisis del efecto de la combinación de fármacos frente a la replicación del VIH es una cuestión interesante para intentar mejorar la eficacia de los tratamientos. Con este objetivo, el sistema de sensibilidad a antirretrovirales se adaptó para estudiar la combinación de fármacos. En primer lugar, se utilizaron PBMCs como células diana para evitar artefactos debidos a los diferentes niveles de nucleótidos presentes en las líneas tumorales (Keulen y col., 1997). En segundo lugar, se utilizaron pseudotipos virales con la glicoproteína G de VSV para facilitar la infección de los PBMCs y excluir la variabilidad en la infección dependiente de los factores implicados en la entrada viral como los niveles de CXCR4. Estos pseudotipos infectan con la eficiencia necesaria para permitir una medida rápida de la replicación viral mediante la cuantificación de la expresión del gen de la luciferasa. Estos dos aspectos técnicos aseguran la viabilidad del sistema y confieren una mayor relevancia a los datos obtenidos. Dado el alto número de trabajos que han descrito un rápido e inesperado fracaso terapéutico en tratamientos que utilizan determinadas combinaciones de ITIANs (Jemsek y col., 2004; Khanlou y col., 2005; Landman y col., 2005; Maitland y col., 2005; Gallant y col., 2005; Torti y col., 2005; Balestre y col., 2006) analizamos el efecto *in vitro* de las mismas.

Aunque inicialmente la combinación TDF/ddI fue indicada como tratamiento de base del TARGA, las guías actuales de tratamiento antirretroviral no recomiendan su uso en combinación debido a las elevadas tasas de fracaso terapéutico observadas en todos los ensayos en que se ha utilizado esta combinación (Panel de expertos de GESIDA, 2007). De acuerdo con estos datos clínicos, los resultados *in vitro* de este trabajo, muestran un claro efecto antagonístico de esta combinación, con un valor de CI estadísticamente significativo ($p < 0.05$, test de Mann-Whitney) para la ED₅₀ en comparación con el resto de las combinaciones. También se encontraron diferencias significativas en la ED₉₀ al compararla con combinaciones sinérgicas (TFD+ZDV y TDF+d4T) y aditivas (d4T+3TC) ($p < 0.05$, test de Mann-Whitney). Estos datos sugieren que la combinación TDF+ddI podría no proporcionar suficiente actividad antiviral en comparación con otras combinaciones de ITIANs. Nuestros resultados *in vitro* son consistentes con los diferentes estudios clínicos que han mostrado altos porcentajes de fallo terapéutico en pacientes que recibían TDF y ddI

(Jemsek y col., 2004; Balestre y col., 2006; Martin-Carbonero y col., 2006). En particular, los resultados obtenidos en el estudio abierto con pacientes *naïve* que evaluaba la seguridad y eficacia de los tratamientos antirretrovirales que contenían 3TC o TDF administrados en combinación con ddI y EFV, demostró que la combinación de TDF/ddI/EFV resultó tener una menor eficacia (Maitland y col., 2005). Aunque a menor nivel, la combinación 3TC+ddI también mostró un claro antagonismo a todas las concentraciones analizadas. Una diferencia significativa se encontró al comparar esta combinación, con las combinaciones sinérgicas (TFD+ZDV y TDF+d4T) y aditiva (d4T+3TC) ($p < 0.05$, test de Mann-Whitney). Finalmente, otras combinaciones fueron débilmente antagónicas a ED₉₀. En particular, TDF+ABC (ED₉₀=1,16), TDF+3TC (ED₉₀=1,24) y 3TC+ABC (ED₉₀=1,28). Para todas estas combinaciones el CI aumentó en los niveles de ED₅₀ (> 1.30 excepto TDF+ABC, ED₅₀=1,23). Estos resultados sugieren una débil barrera farmacológica para estas combinaciones, particularmente si las concentraciones de fármaco disminuyen debido a un mal cumplimiento o a interacciones con otros fármacos. Estas observaciones se correlacionan con los altos niveles de fracaso terapéutico observados cuando las combinaciones se usan *in vivo* junto con un tercer componente de baja potencia (3 ITIAN o combinaciones de una toma al día de 2ITIAN+1ITINN) (Khanlou y col., 2005; Landman y col., 2005; Maitland y col., 2005; Gallant y col., 2005; Rey y col., 2007). En resumen, tanto los datos *in vitro* mostrados en este trabajo, como la experiencia clínica, recomiendan el uso de un tercer componente de gran potencia cuando se utilizan combinaciones de ITIAN que han mostrado un efecto antagónico.

Por otro lado, se ha observado un efecto sinérgico cuando TDF se combina con AZT o d4T. Los análisis estadísticos realizados muestran una clara diferencia entre TDF+AZT o TDF+d4T y el resto de combinaciones a todas las ED analizadas ($p < 0.05$, test de Mann-Whitney). Estas dos combinaciones muestran *in vitro* rangos de sinergia similares contra el VIH en PBMCs, en contraste con las combinaciones anteriormente mencionadas. Estos datos sugieren el interés por la asociación de TDF con AZT o d4T (Balestre y col., 2006). Del mismo modo, los resultados de un estudio multicéntrico retrospectivo, incluyendo pacientes que empezaron una terapia de rescate con la combinación de d4T y TDF, indican que esta terapia combinada podría ser efectiva como componente de los regímenes de terapia de rescate, en pacientes infectados por VIH previamente expuestos a ITIAN (Antinori y col., 2006). Estos resultados podrían tener una importante aplicación en la clínica, como el beneficio de preservar futuras opciones terapéuticas. Curiosamente en algunas combinaciones de fármacos, los resultados de los CI difieren dependiendo de la ED considerada (ED₅₀, 75, 90). Como ejemplo, d4T actúa sinérgicamente (ED₅₀), aditivamente (ED₇₅) y antagónicamente

(ED₉₀) inhibiendo la replicación viral cuando se usa en combinación con AZT. Este resultado puede indicar una combinación efectiva para concentraciones cercanas a la ED₅₀ y ED₇₅ pero no para concentraciones mayores, que son aquellas que deberían ser alcanzadas en la práctica clínica. De hecho esta combinación ha mostrado ser antagónica *in vitro* (Merrill y col., 1996; Zhu y col., 1996; Hoggard y col., 1997), quizá debido a la competición entre los dos fármacos que comparten la misma enzima durante el proceso de fosforilación.

Como conclusión, este estudio describe un ensayo viable, reproducible y relevante que permite evaluar combinaciones de dos fármacos. Los resultados permiten definir efectos sinérgicos, antagónicos o aditivos entre diferentes combinaciones de ITIANs. Los datos observados correlacionan con los datos clínicos, particularmente cuando combinaciones antagónicas de ITIANs se usan *in vivo* junto con un tercer componente de baja potencia.

2.3. Estudio de la capacidad replicativa de virus resistentes a antirretrovirales.

La replicación del VIH durante el tratamiento antiretroviral provoca la aparición de variantes resistentes en la mayoría de los pacientes. Todos los fármacos antiretrovirales disponibles, tanto los inhibidores de la PR y la RT, como los inhibidores de fusión, seleccionan mutaciones que confieren altos niveles de resistencia (Gallant y col., 2003; Menendez-Arias y Este, 2004). Aunque estas mutaciones proporcionan una ventaja para replicar en presencia de la presión farmacológica, en ocasiones emergen variantes portadoras de mutaciones de resistencia que conllevan una pérdida de la capacidad replicativa (Quinones-Mateu y Arts, 2002). En este sentido, se ha descrito que esta pérdida de capacidad replicativa es un factor importante que contribuye a suprimir parcialmente la replicación durante períodos prolongados de fallo virológico (Deeks y col., 2001). Por tanto, se puede decir que la terapia antirretroviral sigue proporcionando un beneficio clínico a pesar de las elevadas reducciones en susceptibilidad a los fármacos. Un mejor conocimiento de esta correlación entre los datos virológicos y clínicos permitiría el uso de la determinación de la capacidad replicativa viral *in vitro* en beneficio clínico. En concreto, una cuestión sin resolver en pacientes con amplia experiencia farmacológica es, qué fármaco debería mantenerse en presencia de fallo terapéutico para obtener un “cuello de botella” que seleccione virus con menor capacidad replicativa. Igualmente es importante determinar qué fármacos deberían ser retirados por falta de actividad, o por no tener ninguna consecuencia sobre el fitness viral. Con el objetivo de resolver estas cuestiones es necesario superar dos obstáculos: el desarrollo

de métodos que permitan medir el impacto diferenciado de las mutaciones de resistencia, tanto de la PR como de la RT, sobre la capacidad replicativa, y la relación entre pérdida de capacidad replicativa y evolución clínica. En este trabajo hemos afrontado la primera cuestión diseñando un método nuevo que permite valorar de manera indistinta las mutaciones en el gen pol, PR o RT.

Aunque la mayoría de los métodos para medir la capacidad replicativa se basan en ensayos de competición viral (Quinones-Mateu y Arts, 2006), su complejidad y larga duración han favorecido el uso de métodos basados en un solo ciclo de replicación que pueden adaptarse a la práctica clínica. Estos métodos se suelen basar en el clonaje de la región genómica de interés dentro de un clon de referencia, en vez de usar los aislados naturales del paciente infectado por VIH y obtenidos mediante cocultivo en PBMCs. El uso de virus recombinantes, que únicamente presentan las secuencias de los genes diana del tratamiento, elimina el efecto de posibles interacciones epistáticas que previamente se ha descrito modifican el fitness viral (Bleiber y col., 2001; Gatanaga y col., 2002; Robinson y col., 2002). Sin embargo, los resultados con estos sistemas correlacionan en buena parte con las medidas realizadas *in vivo* (Prado y col., 2002; Weber y col., 2003). Además, estos sistemas de virus recombinantes suelen estar basados en vectores de un único ciclo de replicación que contienen un gen indicador como luciferasa o β -galactosidase, que permite cuantificar la replicación viral (Deeks y col., 2001; Wrin y col., 2001).

En esta parte del trabajo hemos adaptado nuestro sistema de virus recombinantes para medir el impacto de las mutaciones en la PR y/o la RT sobre el fitness viral. Como ya se ha descrito, este método combina la sensibilidad de la amplificación del ARN a partir del plasma viral, junto con el clonaje directo de estas secuencias derivadas del paciente dentro de un clon proviral defectivo para dicha secuencia, minimizando la posibilidad de seleccionar subpoblaciones virales. De momento, como el clon de referencia es de subtipo B, sólo se ha comprobado que es eficaz para muestras de este subtipo que es el mayoritario en España. Sin embargo, se está analizando en el laboratorio si se podría adaptar al estudio de otros subtipos del VIH-1.

Las propiedades replicativas de estos virus recombinantes permiten monitorizar la infección viral a través de la actividad luciferasa. Estos ensayos se pueden realizar no sólo en MT-2 sino también en PBMCs, lo que puede representar una ventaja en ciertas situaciones experimentales (Figura 13). Además, hemos sido capaces de determinar pérdidas en la capacidad replicativa de virus con mutaciones de resistencia previamente descritas, tanto introducidas por mutagénesis dirigida como derivadas de pacientes (White y col., 2002; Deval

y col., 2004). Una ventaja de nuestro sistema en comparación con los sistemas de un único ciclo de replicación, es una mayor capacidad para detectar pequeñas diferencias en fitness viral. Como se observa en la figura 20 las diferencias en la capacidad replicativa fueron más evidentes cuando los cultivos se mantuvieron hasta 72 horas que cuando se mantuvieron a 24 horas.

Los cambios descritos en el gen de la envuelta por los inhibidores de fusión, han mostrado resultados contradictorios acerca de su impacto en la capacidad replicativa (Lu y col., 2004; Menzo y col., 2004). En contraste con esto, existen fuertes evidencias de que las mutaciones en el gen pol tienen un gran efecto sobre el fitness viral (Weber y col., 2006). El sistema desarrollado en este trabajo se ha usado para analizar la contribución de las mutaciones en la PR y/o la RT en la capacidad replicativa del VIH. Como ya se ha descrito previamente se obtuvo un amplio rango de valores de capacidad replicativa en virus sensibles a fármacos (Wrin y col., 2001) y consideramos la media de estos valores más apropiada como control, que el clon de referencia del laboratorio. Como era de esperar el análisis de los virus resistentes a fármacos, mostró una fuerte reducción o disminución en la capacidad replicativa en comparación con los virus sensibles a fármacos (Figura 22). Cabe destacar que el clonaje de las poblaciones virales se realizó cuando los pacientes aun estaban bajo tratamiento antiretroviral para evitar la emergencia de virus WT o virus con un menor número de mutaciones que pudieran alterar los resultados de capacidad replicativa. Además, para valorar la estabilidad de las secuencias derivadas de pacientes incluidas en los virus recombinantes, se secuenciaron las poblaciones virales obtenidas en cultivo después de tres pases seriados en MT-2, y no se observó ninguna reversión de las mutaciones asociadas con resistencia (datos no mostrados).

La mayoría de los pacientes analizados presentan mutaciones de resistencia que se han asociado a una disminución de la capacidad replicativa. Sin embargo, en algunos pacientes no se ha observado una clara correlación entre el número o el tipo de mutaciones asociadas a resistencia y la capacidad replicativa, sugiriendo que existen mutaciones compensatorias de la capacidad replicativa aún no descritas. Por lo tanto, estos datos muestran que la secuenciación del gen pol no es suficiente para realizar conclusiones acerca de la capacidad replicativa, y sugieren el uso de ensayos funcionales para definir la capacidad replicativa viral. El análisis realizado mostró diferentes patrones de capacidad replicativa; en unos casos la pérdida de capacidad replicativa fue debida esencialmente a mutaciones en los genes de la PR o de la RT, y en otros, a mutaciones en las dos proteínas. En la literatura existen datos que apoyan ambas posibilidades. Así, algunos autores defienden que las mutaciones que confieren resistencia a

los inhibidores de la PR generan mayores reducciones en la capacidad replicativa que mutaciones con resistencia a los inhibidores de la RT (Croteau y col., 1997; Martínez-Picado y col., 2000), mientras que en otros trabajos se postula lo contrario (Back y col., 1996; Bleiber y col., 2001; Deeks y col., 2005). Sin embargo, hay pocos estudios que hayan descrito la contribución de los genes de la proteasa y de la RT individualmente a los cambios en la capacidad replicativa del VIH (Bleiber y col., 2001; Weber y col., 2003). En este estudio, la pérdida de capacidad replicativa se debió principalmente a mutaciones en la RT en un 50% de los pacientes. Esta información puede ser especialmente importante en pacientes que presentan multiresistencia y tienen limitadas opciones terapéuticas alternativas. Se ha descrito que pacientes con baja capacidad replicativa presentan un mayor incremento en células CD4+ que aquellos en los que la capacidad replicativa no se ha visto tan mermada (Haubrich y col., 2002; Barbour y col., 2004). Así, varios estudios han sugerido que conservando un régimen terapéutico inefectivo con el objetivo de mantener un virus resistente con baja capacidad replicativa, podría reducirse el descenso de células CD4+ asociado con la interrupción del tratamiento y la reaparición de virus WT (Deeks y col., 2001; Barbour y col., 2002). Para evitar efectos tóxicos y retirar los fármacos del tratamiento fallido que no suponen ningún beneficio para el paciente, es necesario averiguar la contribución de las mutaciones de la PR o de la RT a la pérdida de capacidad replicativa, facilitando así la simplificación de los tratamientos. Ensayos clínicos específicos analizando la evolución de pacientes en fallo terapéutico con virus que presentan baja capacidad replicativa o retiradas selectivas de fármacos en tratamientos fallidos podrían demostrar el impacto real de esta pérdida de capacidad replicativa *in vitro* sobre el estado clínico final del paciente como sugieren determinados autores (Deeks y col., 2005).

En resumen, hemos desarrollado un sistema que permite determinar el impacto de las mutaciones de la proteasa y de la RT en el fitness viral. Además, en comparación con otros métodos, presenta la ventaja de generar virus recombinantes infectivos que permiten el seguimiento de la infección y valorar de manera más fiable pequeñas diferencias en la capacidad replicativa. Finalmente, los resultados de este estudio muestran que diferentes patrones de mutaciones tanto en la proteasa como en la RT tienen un fuerte impacto en la capacidad replicativa de los virus de pacientes multitratados.

3. Análisis de la capacidad replicativa de virus portadores de la mutación de resistencia Q151M de forma aislada o en combinación con la mutación K65R.

Como ya hemos descrito, el mantenimiento de una buena supresión viral se fundamenta en la utilización de terapias combinadas en las que dos ITIAN suelen ser la base de todos los tratamientos. La disponibilidad de nuevos ITIAN y su uso en diferentes combinaciones ha permitido diseñar nuevas pautas terapéuticas. Sin embargo, el beneficio potencial de estas nuevas combinaciones podría verse limitado por la selección de variantes virales con resistencia a una o más drogas de esta familia. Este es el caso de las mutaciones: K65R, que confiere resistencia *in vitro* a 3TC, ddI, TDF y ABC, manteniendo únicamente la sensibilidad a ZDV y d4T; y Q151M, que confiere resistencia a todos los ITIAN excepto al 3TC y al TDF. Aunque ambas mutaciones presentan una baja frecuencia *in vivo* (Parikh y col., 2006), curiosamente, existe una alta asociación entre ellas (Winston y col., 2002; Valer y col., 2004; Winston y col., 2004; Segondy y col., 2005). Esta asociación tiene importantes implicaciones para el tratamiento, ya que la presencia de estas dos mutaciones genera un alto grado de resistencia frente a prácticamente todos los ITIAN (Tabla 13), y condiciona, por tanto, el éxito de la respuesta a cualquier fármaco de esta familia.

Se ha estudiado el impacto sobre el fitness viral de la mutación K65R sola, y en combinación con otras mutaciones como M184V (White y col., 2002; Deval y col., 2004). Sin embargo, y a pesar de la fuerte asociación que presenta con la mutación Q151M, no se había estudiado la capacidad replicativa de virus que presentaran estas dos mutaciones. Para ello, analizamos la capacidad replicativa, de mutantes puntuales y de virus derivados de pacientes con dichas mutaciones, con nuestro sistema de virus recombinantes. Además, para confirmar los resultados y evitar posibles alteraciones debidas al gen indicador, realizamos cinéticas de replicación y ensayos de competición con construcciones virales completas carentes de gen indicador. Las cinéticas de replicación se realizaron en dos sistemas celulares, MT-2 y PBMCs, siendo los resultados equiparables. La consistencia de los datos obtenidos con las diferentes técnicas confirmó los siguientes aspectos: una reducción en la capacidad replicativa del 43% para el mutante K65R, del 29% y del 22% para los mutantes Q151M o Q151Mc respectivamente, y del 65% para los que presentan ambas mutaciones. La reducción en la capacidad replicativa generada por la mutación K65R coincide con datos previamente publicados (White y col., 2002; Deval y col., 2004). Sin embargo, la reducción de la mutación Q151M no coincide con lo descrito hasta ahora en la bibliografía (Kosalaraksa y col., 1999;

Matsumi y col., 2003), aunque si existen evidencias de una menor capacidad de incorporación de nucleótidos en ensayos enzimáticos (Deval y col., 2002; Matsumi y col., 2003; Deval y col., 2004). Lo más destacable es la marcada pérdida de capacidad replicativa de la combinación de estas dos mutaciones. Este dato puede tener cierta relevancia clínica, teniendo en cuenta las escasas opciones terapéuticas de pacientes infectados con virus que presenten este patrón de mutaciones. Sería interesante comprobar si, como ocurre con la mutación M184V, esta bajada de fitness podría asociarse con una menor progresión y un mejor pronóstico de la enfermedad (Turner y col., 2004). Por otro lado, es importante destacar la capacidad de nuestro sistema para discernir cambios en el fitness viral. Aunque de las técnicas utilizadas, el ensayo de competición ha sido el método más sensible en la medida relativa del fitness, como han descrito otros autores (Kosalaraksa y col., 1999; Garcia-Lerma y col., 2000), la laboriosidad para mantener una multiplicidad baja de infección que minimice la recombinación y maximice la competición entre las variantes virales, junto con el largo tiempo de ensayo y el coste de la estimación de cada una de las poblaciones, hacen de este sistema una difícil herramienta para la práctica clínica.

En los últimos años, la prevalencia de la mutación K65R ha ido aumentando (Valer y col., 2004; Winston y col., 2004; Parikh y col., 2006) acorde a la introducción del TDF (Kagan y col., 2004) y el mayor uso de otros ITIANs como el ABC. Este incremento en la frecuencia de la mutación K65R y su asociación con Q151M, ha planteando preguntas acerca de la evolución y la asociación al tratamiento de estas dos mutaciones. Se ha planteado si la presencia de la mutación K65R podría favorecer la selección de la Q151M, lo que representaría un escenario muy poco favorable para el futuro. En colaboración con laboratorios *Virco* hemos realizado un análisis de la evolución de frecuencias en sus bases de datos de las mutaciones K65R y Q151M entre los años 2001 y 2006. En dicho análisis se observa que el aumento en la mutación K65R no se asocia con un incremento en el número absoluto ni en la proporción de dobles mutantes, K65R+Q151M. Si la mutación K65R facilitara la emergencia del complejo Q151M, como sugiere la alta asociación de ambas mutaciones en las bases de datos, sería esperable que dicha proporción se mantuviera a lo largo del tiempo. Sin embargo, mientras que en el año 2000, de las muestras con K65R el 48% presentaban el complejo Q151M, en el año 2006 sólo el 21% de las variantes presentaban esta asociación, que no sólo no se mantiene sino que disminuye. Por el contrario, de las muestras con Q151M, el porcentaje de pacientes con K65R fue aumentando de un 17% en 2000 a un 29% en 2006. A partir de estas observaciones nuestra hipótesis es que la aparición previa de la mutación K65R podría dificultar la aparición del complejo Q151M,

pero la presencia de Q151M si permitiría la selección de K65R (Figura 30). Esto implicaría que los dobles mutantes aparecidos antes de la introducción de TDF en la clínica se habrían originado a partir de virus que habían desarrollado previamente la mutación Q151M. Paradójicamente, la introducción de TDF que selecciona la mutación K65R modificaría la evolución de este patrón de resistencias en el VIH al dificultar esta mutación la emergencia del complejo Q151M. Existen otras hipótesis alternativas entre las que hay que considerar que la emergencia del complejo Q151M puede requerir un periodo más largo de exposición a ITIAN o que los fármacos que seleccionan dicho complejo, especialmente ddI, se utilizan menos en el momento actual.

Para apoyar esta hipótesis realizamos una serie de experimentos en colaboración con el Dr. Luis Menéndez-Arias del Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”. Como la mutación Q151M ocurre a través de un intermediario Q151L que replica pobremente en comparación con el virus salvaje o con el virus mutante Q151M (Kosaralaksa y col., 1999; Garcia-Lerma y col., 2000), analizamos el impacto de la mutación K65R en la replicación de un virus portador de la mutación intermedia Q151L para verificar si esta combinación dificulta la selección de Q151M. Para comprobar esta posibilidad se construyó el doble mutante K65R/Q151L y se valoró su capacidad replicativa mediante el sistema de virus recombinantes y mediante cinéticas de replicación. Paralelamente al estudio de nuestros mutantes virales en cultivo, el Dr. Luis Menéndez-Arias valoró la actividad enzimática de la RT de estos mismos mutantes mediante ensayos de elongación y estudios de estado pre-estacionario (Cases-González y Menéndez-Arias, 2005; Mendieta y col., 2007). Los resultados de replicación *in vitro* mostraron que el doble mutante Q151L/K65R era prácticamente inviable y no pudimos detectar replicación del mismo en cultivo. Incluso en presencia de la mutación compensatoria S68G, este mutante presenta una capacidad replicativa por debajo del mutante Q151L (Figura 28). De acuerdo con estos resultados, los experimentos bioquímicos mostraron que la enzima mutante en las posiciones K65R/Q151L presenta una actividad polimerasa menor en comparación con la enzima Q151L (Figura 29A), que viene explicada por la baja eficacia catalítica de la enzima $RT_{65R+Q151L}$, que es tres veces menor que la de la RT_{Q151L} (Figura 29B).

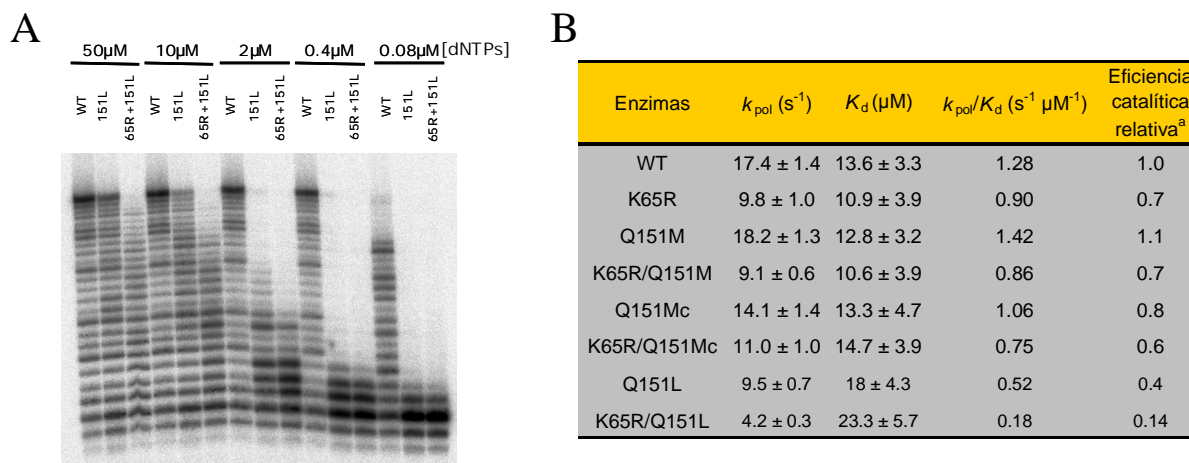


Figura 29. A. Ensayo de elongación del cebador con las RTs WT, Q151L y K65R+Q151L a las concentraciones de dNTPs indicadas. B. ^aLa eficiencia catalítica relativa se calculó dividiendo el valor de k_{pol}/K_d de la enzima mutante entre la k_{pol}/K_d de la enzima WT.

A estos datos se sumaría el hecho de que virus portadores de la mutación Q151L son hipersusceptibles a TDF y que virus que combinan las mutaciones K65R y Q151L son sensibles a Tenofovir (Tabla 13). Esto dificultaría aún más la emergencia de dobles mutantes ya que el intermediario Q151L resensibiliza a TDF el virus resistente K65R, con lo que este intermediario se haría sensible al tratamiento y se dificultaría su replicación hasta generar la variante Q151M sobre una mutación K65R previa. En resumen, estos experimentos y observaciones sugieren que la asociación de las mutaciones K65R y Q151M se producen por emergencia de la mutación K65R a partir de un mutante Q151M que favorecería este cambio por mecanismos aún desconocidos. El itinerario contrario, generación de la mutación Q151M a partir de un virus portador de la mutación K65R, se encontraría paradójicamente dificultado. La introducción de un fármaco que como el TDF selecciona la mutación K65R modificaría la evolución de los patrones de resistencia al VIH como sugieren los análisis de la base de datos de *Virco* (Figura 30).

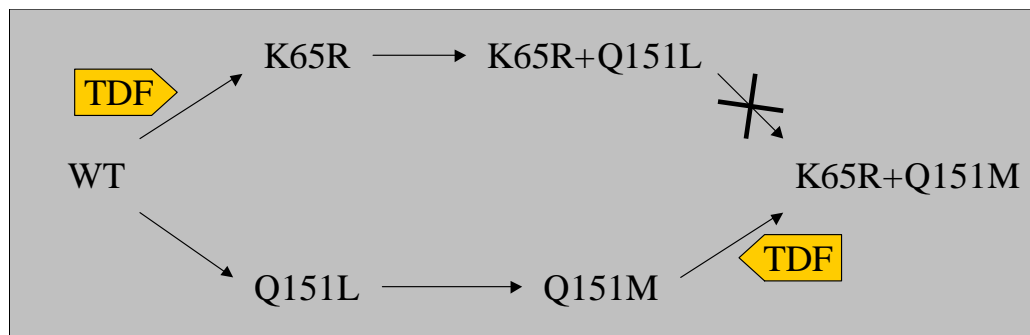


Figura 30. Modelo de las vías de selección de la combinación de mutaciones K65R+Q151M.

CONCLUSIONES

1. Se ha desarrollado un sistema que permite la obtención de virus quiméricos recombinantes de ciclo múltiple portadores del gen *pol* del VIH-1 amplificado a partir de plasma de pacientes.
2. Hemos aplicado este modelo experimental al estudio de resistencias fenotípicas a inhibidores de Transcriptasa Inversa (RT) y Proteasa (PR) desarrollando un sistema que es altamente reproducible, sensible y específico.
3. En estudios de sinergia y antagonismo de inhibidores de la RT hemos observado que las combinaciones entre Tenofovir y ddI, 3TC y ddI presentan un efecto antagónico a las distintas concentraciones inhibitorias analizadas.
4. Por el contrario las combinaciones entre Tenofovir y AZT o Tenofovir y d4T presentan un efecto sinérgico a las distintas concentraciones inhibitorias analizadas.
5. Hemos adaptado el sistema de virus recombinantes al estudio del impacto diferencial de las mutaciones de resistencia a antirretrovirales en la PR o la RT sobre la capacidad replicativa viral.
6. Utilizando este sistema hemos observado que la pérdida de capacidad replicativa en virus quiméricos de pacientes en fracaso terapéutico puede ser debida de forma preponderante a mutaciones en la PR o RT de forma aislada, o al efecto combinado de las mutaciones en las secuencias de ambas proteínas.
7. La combinación de las mutaciones K65R y el complejo Q151M en la RT origina una disminución en la capacidad replicativa del VIH-1 “in vitro”.
8. La combinación de las mutaciones K65R y la mutación intermediaria Q151L origina un virus con una pérdida casi absoluta de su capacidad replicativa que se asocia con una disminución en la eficiencia catalítica de la RT.

9. Nuestros datos sugieren que la emergencia de la combinación K65R y Q151M se produce a partir de la mutación inicial en la posición 151 ya que la existencia previa del mutante K65R dificultaría la emergencia del complejo Q151M.

BIBLIOGRAFÍA

- Acosta EP. (2002). Pharmacokinetic enhancement of protease inhibitors. *J Acquir Immune Defic Syndr.* **29**:S11-8.
- Adachi A, Gendelman HE, Koenig S, Folks T, Willey R, Rabson A, Martin MA. (1986). Production of acquired immunodeficiency syndrome-associated retrovirus in human and nonhuman cells transfected with an infectious molecular clone. *J Virol.* **59**:284-291.
- Alcami J, T. Lain de Lera, L. Folgueira, M. A. Pedraza, J. M. Jacque, F. Bachelerie, A. R. Noriega, R. T. Hay, D. Harrich, R. B. Gaynor, et al. (1995). Absolute dependence on kappa B responsive elements for initiation and Tat-mediated amplification of HIV transcription in blood CD4 T lymphocytes. *EMBO J.* **14**:1552-1560.
- Antinori A, Liuzzi G, Cingolani A, Bertoli A, Di Giambenedetto S, Trotta MP, Rizzo MG, Girardi E, De Luca A, Perno CF. (2001). Drug-resistant mutants of HIV-1 in patients exhibiting increasing CD4 cell count despite virological failure of highly active antiretroviral therapy. *AIDS.* **15**:2325-2327.
- Antinori A, Trotta MP, Nasta P, Bini T, Bonora S, Castagna A, Zaccarelli M, Quirino T, Landonio S, Merli S, Tozzi V, Di Perri G, Andreoni M, Perno CF, Carosi G. (2006). Antiviral efficacy and genotypic resistance patterns of combination therapy with stavudine/tenofovir in highly active antiretroviral therapy experienced patients. *Antivir Ther.* **11**:233-243.
- Back NK, Nijhuis M, Keulen W, Boucher CA, Oude Essink BO, van Kuilenburg AB, van Gennip AH, Berkhout B. (1996). Reduced replication of 3TC-resistant HIV-1 variants in primary cells due to a processivity defect of the reverse transcriptase enzyme. *EMBO J.* **15**:4040-4049.
- Balestre E, Dupon M, Capdepon S, Thiebaut R, Boucher S, Fleury H, Dabis F, Masquelier B; GECSA. (2006). Virological response to HIV-1 nucleoside/nucleotide reverse transcriptase inhibitors-based, tenofovir DF-including regimens in the ANRS Aquitaine Cohort. *J Clin Virol.* **36**:95-99.

- Balvay L, Lopez Lastra M, Sargueil B, Darlix JL, Ohlmann T. (2007). Translational control of retroviruses. *Nat Rev Microbiol.* **5**:128-140.
- Barbour JD, Wrin T, Grant RM, Martin JN, Segal MR, Petropoulos CJ, Deeks SG. (2002). Evolution of phenotypic drug susceptibility and viral replication capacity during long-term virologic failure of protease inhibitor therapy in human immunodeficiency virus-infected adults. *J Virol.* **76**:11104-11112.
- Barbour JD, Hecht FM, Wrin T, Segal MR, Ramstead CA, Liegler TJ, Busch MP, Petropoulos CJ, Hellmann NS, Kahn JO, Grant RM. (2004). Higher CD4+ T cell counts associated with low viral pol replication capacity among treatment-naive adults in early HIV-1 infection. *J Infect Dis.* **190**:251-256.
- Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, Dauguet C, Axler-Blin C, Vezinet-Brun F, Rouzioux C, Rozenbaum W, Montagnier L. (1983). Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science.* **220**:868-871.
- Bates M, Wrin T, Huang W, Petropoulos C, Hellmann N. (2003). Practical applications of viral fitness in clinical practice. *Curr Opin Infect Dis.* **16**:11-18.
- Baxter JD, Mayers DL, Wentworth DN, Neaton JD, Hoover ML, Winters MA, Mannheimer SB, Thompson MA, Abrams DI, Brizz BJ, Ioannidis JP, Merigan TC. (2000). A randomized study of antiretroviral management based on plasma genotypic antiretroviral resistance testing in patients failing therapy. CPCRA 046 Study Team for the Terry Bein Community Programs for Clinical Research on AIDS. *AIDS.* **14**:F83-93.
- Bermejo M, Sanchez-Palomino S, Usan L, Alcamí J. (2004). Dynamics of HIV replication in lymphocytes and the efficacy of protease inhibitors. *J Med Virol.* **73**:502-507.
- Birnboim HC, Doly J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**:1513-1523.

- Blanco JL, Biglia A, De Lazzari E, Mallolas J, Martinez E, Pumarola T, Larrousse M, Milinkovic A, Leon A, Lonca M, Laguno M, Gatell JM. (2006). Antiretroviral activity of didanosine in patients with different clusters of reverse transcriptase mutations. *AIDS*. **20**:1891-1892.
- Bleiber G, Munoz M, Ciuffi A, Meylan P, Telenti A. (2001). Individual contributions of mutant protease and reverse transcriptase to viral infectivity, replication, and protein maturation of antiretroviral drug-resistant human immunodeficiency virus type 1. *J Virol*. **75**:3291-3300.
- Boden D, Markowitz M. (1998). Resistance to human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother*. **42**:2775-2783.
- Bonhoeffer S, Chappey C, Parkin NT, Whitcomb JM, Petropoulos CJ. (2004). Evidence for positive epistasis in HIV-1. *Science*. **306**:1547-1550.
- Boretto J, Longhi S, Navarro JM, Selmi B, Sire J, Canard B. (2001). An integrated system to study multiply substituted human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *Anal Biochem*. **292**:139-147.
- Boucher CA, Keulen W, van Bommel T, Nijhuis M, de Jong D, de Jong MD, Schipper P, Back NK. (1996). Human immunodeficiency virus type 1 drug susceptibility determination by using recombinant viruses generated from patient sera tested in a cell-killing assay. *Antimicrob Agents Chemother*. **40**:2404-2409.
- Bradford MM. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. **72**:248-254.
- Brown A, Gartner S, Kawano T, Benoit N, Cheng-Mayer C. (2005). HLA-A2 down-regulation on primary human macrophages infected with an M-tropic EGFP-tagged HIV-1 reporter virus. *J Leukoc Biol*. **78**:675-685.

- Butsch M, Boris-Lawrie K. (2002). Destiny of unspliced retroviral RNA: ribosome and/or virion?. *J Virol.* **76**:3089-3094.
- Cao Y, Qin L, Zhang L, Safrit J, Ho DD. (1995). Virologic and immunologic characterization of long-term survivors of human immunodeficiency virus type 1 infection. *N Engl J Med.* **332**:201-208.
- Cases-González CE, Menéndez-Arias L. (2005). Nucleotide specificity of HIV-1 reverse transcriptases with amino acid substitutions affecting Ala-114. *Biochem J.* **387**:221-9.
- Chen Z, Li Y, Schock HB, Hall D, Chen E, Kuo LC. (1995). Three-dimensional structure of a mutant HIV-1 protease displaying cross-resistance to all protease inhibitors in clinical trials. *J Biol Chem.* **270**:21433-21436.
- Chen BK, Gandhi RT, Baltimore D. (1996). CD4 down-modulation during infection of human T cells with human immunodeficiency virus type 1 involves independent activities of vpu, env, and nef. *J Virol.* **70**:6044-6053.
- Chen BK, Feinberg MB, Baltimore D. (1997). The kappaB sites in the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat enhance virus replication yet are not absolutely required for viral growth. *J Virol.* **71**:5495-5504.
- Chou TC, Talalay P. (1984). Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv Enzyme Regu.* **22**:27-55.
- Chun T. W., L. Stuyver, S. B. Mizell, L. A. Ehler, J. A. Mican, M. Baseler, A. L. Lloyd, M. A. Nowak, and A. S. Fauci. (1997). Presence of an inducible HIV-1 latent reservoir during highly active antiretroviral therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **94**:13193-13197.
- Cichutek K, Merget H, Norley S, Linde R, Kreuz W, Gahr M, Kurth R. (1992). Development of a quasispecies of human immunodeficiency virus type 1 in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **89**:7365-7369.

- Cingolani A, Antinori A, Rizzo MG, Murri R, Ammassari A, Baldini F, Di Giambenedetto S, Cauda R, De Luca A. (2002). Usefulness of monitoring HIV drug resistance and adherence in individuals failing highly active antiretroviral therapy: a randomized study (ARGENTA). *AIDS*. **16**:369-379.
- Ciuffi A, Bleiber G, Munoz M, Martinez R, Loeuillet C, Rehr M, Fischer M, Gunthard HF, Oxenius A, Meylan P, Bonhoeffer S, Trono D, Telenti A. (2004). Entry and transcription as key determinants of differences in CD4 T-cell permissiveness to human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol*. **78**:10747-10754.
- Clavel F, Guyader M, Guetard D, Salle M, Montagnier L, Alizon M. (1986). Molecular cloning and polymorphism of the human immune deficiency virus type 2. *Nature*. **324**:691-695.
- Coffin JM. (1995). HIV population dynamics in vivo: implications for genetic variation, pathogenesis, and therapy. *Science*. **267**:483-489.
- Cohen CJ, Hunt S, Sension M, Farthing C, Conant M, Jacobson S, Nadler J, Verbiest W, Hertogs K, Ames M, Rinehart AR, Graham NM; VIRA3001 Study Team. (2002). A randomized trial assessing the impact of phenotypic resistance testing on antiretroviral therapy. *AIDS*. **16**:579-588.
- Connor RI, Chen BK, Choe S, Landau NR. (1995). Vpr is required for efficient replication of human immunodeficiency virus type-1 in mononuclear phagocytes. *Virology*. **206**:935-944.
- Cote HC, Brumme ZL, Harrigan PR. (2001). Human immunodeficiency virus type 1 protease cleavage site mutations associated with protease inhibitor cross-resistance selected by indinavir, ritonavir, and/or saquinavir. *J Virol*. **75**:589-594.
- Croteau G, Doyon L, Thibeault D, McKercher G, Pilote L, Lamarre D. (1997). Impaired fitness of human immunodeficiency virus type 1 variants with high-level resistance to protease inhibitors. *J Virol*. **71**:1089-1096.

- Cullen BR. (1993). Does HIV-1 Tat induce a change in viral initiation rights? *Cell*. **73**:417-420.
- Cullen BR. (1998). HIV-1 auxiliary proteins: making connections in a dying cell. *Cell*. **93**:685-692.
- Deeks SG, Barbour JD, Martin JN, Swanson MS, Grant RM. (2000). Sustained CD4+ T cell response after virologic failure of protease inhibitor-based regimens in patients with human immunodeficiency virus infection. *J Infect Dis*. **181**:946-953.
- Deeks SG, Wrin T, Liegler T, Hoh R, Hayden M, Barbour JD, Hellmann NS, Petropoulos CJ, McCune JM, Hellerstein MK, Grant RM. (2001). Virologic and immunologic consequences of discontinuing combination antiretroviral-drug therapy in HIV-infected patients with detectable viremia. *N Engl J Med*. **344**:472-480.
- Deeks SG, Grant RM, Wrin T, Paxinos EE, Liegler T, Hoh R, Martin JN, Petropoulos CJ. (2003). Persistence of drug-resistant HIV-1 after a structured treatment interruption and its impact on treatment response. *AIDS*. **17**:361-370.
- Deeks SG, Hoh R, Neilands TB, Liegler T, Aweeka F, Petropoulos CJ, Grant RM, Martin JN. (2005). Interruption of treatment with individual therapeutic drug classes in adults with multidrug-resistant HIV-1 infection. *J Infect Dis*. **192**:1537-1544.
- De Jong JJ, Goudsmit J, Lukashov VV, Hillebrand ME, Baan E, Huismans R, Danner SA, ten Veen JH, de Wolf F, Jurriaans S. (1999). Insertion of two amino acids combined with changes in reverse transcriptase containing tyrosine-215 of HIV-1 resistant to multiple nucleoside analogs. *AIDS*. **13**:75-80.
- Deval J, Selmi B, Boretto J, Egloff MP, Guerreiro C, Sarfati S, Canard B. (2002). The molecular mechanism of multidrug resistance by the Q151M human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase and its suppression using alpha-boranophosphate nucleotide analogues. *J Biol Chem*. **277**:42097-42104.

- Deval J, Navarro JM, Selmi B, Courcambeck J, Boretto J, Halfon P, Garrido-Urbani S, Sire J, Canard B. (2004). A loss of viral replicative capacity correlates with altered DNA polymerization kinetics by the human immunodeficiency virus reverse transcriptase bearing the K65R and L74V dideoxynucleoside resistance substitutions. *J Biol Chem.* **279**:25489-25496.
- Deval J, White KL, Miller MD, Parkin NT, Courcambeck J, Halfon P, Selmi B, Boretto J, Canard B. (2004). Mechanistic basis for reduced viral and enzymatic fitness of HIV-1 reverse transcriptase containing both K65R and M184V mutations. *J Biol Chem.* **279**:509-516.
- Devereux HL, Emery VC, Johnson MA, Loveday C. (2001). Replicative fitness in vivo of HIV-1 variants with multiple drug resistance-associated mutations. *J Med Virol.* **65**:218-224
- Diallo K, Götte M, Wainberg MA. (2003). Molecular impact of the M184V mutation in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *Antimicrob Agents Chemother.* **47**: 3377-3383.
- Domingo E, Holland JJ. (1997). RNA virus mutations and fitness for survival. *Annu Rev Microbiol.* **51**:151-178.
- Doyon L, Payant C, Brakier-Gingras L, Lamarre D. (1998). Novel Gag-Pol frameshift site in human immunodeficiency virus type 1 variants resistant to protease inhibitors. *J Virol.* **72**:6146-6150.
- Dragic T, Litwin V, Allaway GP, Martin SR, Huang Y, Nagashima KA, Cayanan C, Maddon PJ, Koup RA, Moore JP, Paxton WA. (1996). HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature.* **381**:667-673.
- DuBridge RB, Tang P, Hsia HC, Leong PM, Miller JH, Calos MP. (1987). Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system. *Mol Cell Biol.* **7**:379-387.

- Durant J, Clevenbergh P, Halfon P, Delgiudice P, Porsin S, Simonet P, Montagne N, Boucher CA, Schapiro JM, Dellamonica P. (1999). Drug-resistance genotyping in HIV-1 therapy: the VIRADAPT randomised controlled trial. *Lancet*. **353**: 2195-2199.
- Eastman PS, Mittler J, Kelso R, Gee C, Boyer E, Kolberg J, Urdea M, Leonard JM, Norbeck DW, Mo H, Markowitz M. (1998). Genotypic changes in human immunodeficiency virus type 1 associated with loss of suppression of plasma viral RNA levels in subjects treated with ritonavir (Norvir) monotherapy. *J Virol*. **72**:5154-5164.
- Eckert DM, Kim PS. (2001). Mechanisms of viral membrane fusion and its inhibition. *Annu Rev Biochem*. **70**:777-810.
- Egger M, May M, Chene G, Phillips AN, Ledergerber B, Dabis F, Costagliola D, D'Arminio Monforte A, de Wolf F, Reiss P, Lundgren JD, Justice AC, Staszewski S, Leport C, Hogg RS, Sabin CA, Gill MJ, Salzberger B, Sterne JA; ART Cohort Collaboration. (2002). Prognosis of HIV-1-infected patients starting highly active antiretroviral therapy: a collaborative analysis of prospective studies. *Lancet*. **360**:119-129.
- Emerman M, Malim MH. (1998). HIV-1 regulatory/accessory genes: keys to unraveling viral and host cell biology. *Science*. **280**:1880-1884.
- Feher A, Weber IT, Bagossi P, Boross P, Mahalingam B, Louis JM, Copeland TD, Torshin IY, Harrison RW, Tozser J. (2002). Effect of sequence polymorphism and drug resistance on two HIV-1 Gag processing sites. *Eur J Biochem*. **269**:4114-4120.
- Feng Y, Broder CC, Kennedy PE, Berger EA. (1996). HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science*. **272**:872-877.
- Fisher AG, Ratner L, Mitsuya H, Marselle LM, Harper ME, Broder S, Gallo RC, Wong-Staal F. (1986). Infectious mutants of HTLV-III with changes in the 3' region and markedly reduced cytopathic effects. *Science*. **233**: 655-659.
- Flandre P, Chappey C, Marcelin AG, Ryan K, Maa JF, Bates M, Seekins D, Bernard MC, Calvez V, Molina JM. (2007). Phenotypic susceptibility to didanosine is associated

- with antiviral activity in treatment-experienced patients with HIV-1 infection. *J Infect Dis.* **195**:392-398.
- Gallant JE, Gerondelis PZ, Wainberg MA, Shulman NS, Haubrich RH, St Clair M, Lanier ER, Hellmann NS, Richman DD. (2003). Nucleoside and nucleotide analogue reverse transcriptase inhibitors: a clinical review of antiretroviral resistance. *Antivir Ther.* **8**:489-506.
- Gallant JE, Rodriguez AE, Weinberg WG, Young B, Berger DS, Lim ML, Liao Q, Ross L, Johnson J, Shaefer MS; ESS30009 Study. (2005). Early virologic nonresponse to tenofovir, abacavir, and lamivudine in HIV-infected antiretroviral-naive subjects. *J Infect Dis.* **192**:1921-1930.
- Gao F, Bailes E, Robertson DL, Chen Y, Rodenburg CM, Michael SF, Cummins LB, Arthur LO, Peeters M, Shaw GM, Sharp PM, Hahn BH. (1999). Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes troglodytes*. *Nature.* **397**:436-441.
- Gao Q, Gu Z, Parniak MA, Cameron J, Cammack N, Boucher C, Wainberg MA. (1993). The same mutation that encodes low-level human immunodeficiency virus type 1 resistance to 2',3'-dideoxyinosine and 2',3'-dideoxycytidine confers high-level resistance to the (-) enantiomer of 2',3'-dideoxy-3'-thiacytidine. *Antimicrob Agents Chemother.* **37**:1390-1392.
- Garcia-Lerma JG, Gerrish PJ, Wright AC, Qari SH, Heneine W. (2000). Evidence of a role for the Q151L mutation and the viral background in development of multiple dideoxynucleoside-resistant human immunodeficiency virus type 1. *J Virol.* **74**:9339-9346.
- Gatanaga H, Suzuki Y, Tsang H, Yoshimura K, Kavlick MF, Nagashima K, Gorelick RJ, Mardy S, Tang C, Summers MF, Mitsuya H. (2002). Amino acid substitutions in Gag protein at non-cleavage sites are indispensable for the development of a high multitude of HIV-1 resistance against protease inhibitors. *J Biol Chem.* **277**:5952-5961.

- Gaynor R. (1992). Cellular transcription factors involved in the regulation of HIV-1 gene expression. *AIDS*. **6**:347-363.
- Gendelman HE, Orenstein JM, Baca LM, Weiser B, Burger H, Kalter DC, Meltzer MS. (1989). The macrophage in the persistence and pathogenesis of HIV infection. *AIDS*. **3**:475-495.
- Greene WC. (1991). The molecular biology of human immunodeficiency virus type 1 infection. *N Engl J Med*. **324**:308-317.
- Gulick RM, Ribaud HJ, Shikuma CM, Lustgarten S, Squires KE, Meyer WA 3rd, Acosta EP, Schackman BR, Pilcher CD, Murphy RL, Maher WE, Witt MD, Reichman RC, Snyder S, Klingman KL, Kuritzkes DR; AIDS Clinical Trials Group Study A5095 Team. (2004). Triple-nucleoside regimens versus efavirenz-containing regimens for the initial treatment of HIV-1 infection. *N Engl J Med*. **350**:1850-1861.
- Haertle T, Carrera CJ, Wasson DB, Sowers LC, Richman DD, Carson DA. (1988). Metabolism and anti-human immunodeficiency virus-1 activity of 2-halo-2',3'-dideoxyadenosine derivatives. *J Biol Chem*. **263**:5870-5875.
- Hammer SM, Saag MS, Schechter M, Montaner JS, Schooley RT, Jacobsen DM, Thompson MA, Carpenter CC, Fischl MA, Gazzard BG, Gatell JM, Hirsch MS, Katzenstein DA, Richman DD, Vella S, Yeni PG, Volberding PA; International AIDS Society-USA panel. (2006). Treatment for adult HIV infection: 2006 recommendations of the International AIDS Society--USA panel. *JAMA*. **296**:827-843.
- Hance AJ, Lemiale V, Izopet J, Lecossier D, Joly V, Massip P, Mammano F, Descamps D, Brun-Vezinet F, Clavel F. (2001). Changes in human immunodeficiency virus type 1 populations after treatment interruption in patients failing antiretroviral therapy. *J Virol*. **75**:6410-6417.
- Hanna GJ, D'Aquila RT. (2001). Clinical use of genotypic and phenotypic drug resistance testing to monitor antiretroviral chemotherapy. *Clin Infect Dis*. **32**:774-782.

- Harada S, Koyanagi Y, Yamamoto N. (1985). Infection of HTLV-III/LAV in HTLV-I-carrying cells MT-2 and MT-4 and application in a plaque assay. *Science*. **229**:563-566.
- Harrigan PR, Kinghorn I, Bloor S, Kemp SD, Najera I, Kohli A, Larder BA. (1996). Significance of amino acid variation at human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase residue 210 for zidovudine susceptibility. *J Virol*. **70**:5930-5934.
- Harrigan PR, Bloor S, Larder BA. (1998). Relative replicative fitness of zidovudine-resistant human immunodeficiency virus type 1 isolates in vitro. *J Virol*. **72**:3773-3778.
- Haubrich R, Wrin T, Hellmann N, McCutchan JA, Keiser P, Kemper C, Witt M, Leedom J, Forthal D, Richman D and the CCTG. (2002). Replication capacity as a predictor of immunological and virological benefit despite virological failure of an antiretroviral regimen. *Antivir Ther*. **7**: S101.
- Hazenberg MD, Hamann D, Schuitemaker H, Miedema F. (2000). T cell depletion in HIV-1 infection: how CD4+ T cells go out of stock. *Nat Immunol*. **1**:285-289.
- He J, Choe S, Walker R, Di Marzio P, Morgan DO, Landau NR. (1995). Human immunodeficiency virus type 1 viral protein R (Vpr) arrests cells in the G2 phase of the cell cycle by inhibiting p34cdc2 activity. *J Virol*. **69**:6705-6711.
- Hertogs K, de Bethune MP, Miller V, Ivens T, Schel P, Van Cauwenberge A, Van Den Eynde C, Van Gerwen V, Azijn H, Van Houtte M, Peeters F, Staszewski S, Conant M, Bloor S, Kemp S, Larder B, Pauwels R. (1998). A rapid method for simultaneous detection of phenotypic resistance to inhibitors of protease and reverse transcriptase in recombinant human immunodeficiency virus type 1 isolates from patients treated with antiretroviral drugs. *Antimicrob Agents Chemother*. **42**:269-276.
- Hirsch MS, Brun-Vezinet F, Clotet B, Conway B, Kuritzkes DR, D'Aquila RT, Demeter LM, Hammer SM, Johnson VA, Loveday C, Mellors JW, Jacobsen DM, Richman DD. (2003). Antiretroviral drug resistance testing in adults infected with human

- immunodeficiency virus type 1: 2003 recommendations of an International AIDS Society-USA Panel. *Clin Infect Dis.* **37**:113-128.
- Hoggard PG, Kewn S, Barry MG, Khoo SH, Back DJ. (1997). Effects of drugs on 2',3'-dideoxy-2',3'-dideohydrothymidine phosphorylation in vitro. *Antimicrob Agents Chemother.* **41**:1231-1236.
- Hoover ML, Wentworth DN, Neaton JD, Mayers DL, Merigan . (2000). A blinded comparison of two sequencing assays for resistance mutations in HIV-1 protease and reverse transcriptase genes in the GART Study (CPCRA046) [abstract 78]. *Antivir Ther.* **5**:60.
- Huang H, Chopra R, Verdine GL, Harrison SC. (1998). Structure of a covalently trapped catalytic complex of HIV-1 reverse transcriptase: implications for drug resistance. *Science.* **282**:1669-1675.
- Iga M, Matsuda Z, Okayama A, Sugiura W, Hashida S, Morishita K, Nagai Y, Tsubouchi H. (2002). Rapid phenotypic assay for human immunodeficiency virus type 1 protease using in vitro translation. *J Virol Methods.* **106**:25-37.
- Iversen AK, Shafer RW, Wehrly K, Winters MA, Mullins JI, Chesebro B, Merigan TC. (1996). Multidrug-resistant human immunodeficiency virus type 1 strains resulting from combination antiretroviral therapy. *J Virol.* **70**:1086-1090.
- Jacks T, Power MD, Masiarz FR, Luciw PA, Barr PJ, Varmus HE. (1988). Characterization of ribosomal frameshifting in HIV-1 gag-pol expression. *Nature.* **331**:280-283.
- Jacobsen H, Yasargil K, Winslow DL, Craig JC, Krohn A, Duncan IB, Mous J. (1995). Characterization of human immunodeficiency virus type 1 mutants with decreased sensitivity to proteinase inhibitor Ro 31-8959. *Virology.* **206**:527-534.
- Japour AJ, Mayers DL, Johnson VA, Kuritzkes DR, Beckett LA, Arduino JM, Lane J, Black RJ, Reichelderfer PS, D'Aquila RT, Crumpacker CS, RV-43 Study Group, AIDS Clinical Trials Group, Virology Committee Resistance Working Goup. (1993).

- Standardized peripheral blood mononuclear cell culture assay for determination of drug susceptibilities of clinical human immunodeficiency virus type 1 isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* **37**:1095-1101.
- Jemsek J, Hutcherson P, Harper E. (2004). Poor virologic responses in early emergence of resistance in treatment naive, HIV-infected patients receiving once daily triple nucleoside regimen of didanosine, lamivudine and tenofovir DF. 11th Conference of Retroviruses and Opportunistic Infections, San Francisco, CA. **Abstract 51.**
- Johnson VA, Brun-Vezinet F, Clotet B, Conway B, Kuritzkes DR, Pillay D, Schapiro J, Telenti A, Richman D. (2005). Update of the Drug Resistance Mutations in HIV-1: 2005. *Top HIV Med.* **13**:51-57.
- Kagan RM, Merigan TC, Winters MA, Heseltine PN. (2004). Increasing prevalence of HIV-1 reverse transcriptase mutation K65R correlates with tenofovir utilization. *Antivir Ther.* **9**:827-828.
- Kagan RM, Lee TS, Ross L, Lloyd RM Jr, Lewinski MA, Potts SJ. (2007). Molecular basis of antagonism between K70E and K65R tenofovir-associated mutations in HIV-1 reverse transcriptase. *Antiviral Res.* **75**:210-218.
- Kantor R, Fessel WJ, Zolopa AR, Israelski D, Shulman N, Montoya JG, Harbour M, Schapiro JM, Shafer RW. (2002). Evolution of primary protease inhibitor resistance mutations during protease inhibitor salvage therapy. *Antimicrob Agents Chemother.* **46**:1086-1092.
- Kaplan SS, Ferrari G, Wrin T, Hellmann NS, Tomaras GD, Gyszowka VE, Fiscus SA, Weinhold KJ, Hicks CB. (2005). Longitudinal assessment of immune response and viral characteristics in HIV-infected patients with prolonged CD4(+)/viral load discordance. *AIDS Res Hum Retroviruses.* **21**:13-16.
- Karn J. (1999). Tackling Tat. *J Mol Biol.* **293**:235-254.

- Kaufmann GR, Furrer H, Ledergerber B, Perrin L, Opravil M, Vernazza P, Cavassini M, Bernasconi E, Rickenbach M, Hirschel B, Battegay M; Swiss HIV Cohort Study. (2005). Characteristics, determinants, and clinical relevance of CD4 T cell recovery to <500 cells/microL in HIV type 1-infected individuals receiving potent antiretroviral therapy. *Clin Infect Dis.* **41**:361-372.
- Kellam P, Boucher CA, Tijnagel JM, Larder BA. (1994). Zidovudine treatment results in the selection of human immunodeficiency virus type 1 variants whose genotypes confer increasing levels of drug resistance. *J Gen Virol.* **75**:341-351.
- Kellam P, Larder BA. (1994). Recombinant virus assay: a rapid, phenotypic assay for assessment of drug susceptibility of human immunodeficiency virus type 1 isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* **38**:23-30.
- Keulen W, Back NK, van Wijk A, Boucher CA, Berkhout B. (1997). Initial appearance of the 184Ile variant in lamivudine-treated patients is caused by the mutational bias of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *J Virol.* **71**:3346-3350.
- Khanlou H, Yeh V, Guyer B, Farthing C. (2005). Early virologic failure in a pilot study evaluating the efficacy of therapy containing once-daily abacavir, lamivudine, and tenofovir DF in treatment-naive HIV-infected patients. *AIDS Patient Care STDS.* **19**:135-140.
- Klatzmann D, Champagne E, Chamaret S, Gruest J, Guetard D, Hercend T, Gluckman JC, Montagnier L. (1984). T-lymphocyte T4 molecule behaves as a receptor for human retrovirus LAV. *Nature.* **312**:767-771.
- Klimkait T. (2002). A sensitive replicative system to assess HIV-1 drug resistance. *Am Clin Lab.* **21**:20-24.
- Kohlstaedt LA, Wang J, Friedman JM, Rice PA, Steitz TA. (1992). Crystal structure at 3.5 Å resolution of HIV-1 reverse transcriptase complexed with an inhibitor. *Science.* **256**:1783-1790.

- Korber B, Muldoon M, Theiler J, Gao F, Gupta R, Lapedes A, Hahn BH, Wolinsky S, Bhattacharya T. (2000). Timing the ancestor of the HIV-1 pandemic strains. *Science*. **288**:1789-1796.
- Kosalaraksa P, Kavlick MF, Maroun V, Le R, Mitsuya H. (1999). Comparative fitness of multi-dideoxynucleoside-resistant human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) in an In vitro competitive HIV-1 replication assay. *J Virol*. **73**:5356-5363.
- Kozal MJ, Shah N, Shen N, Yang R, Fucini R, Merigan TC, Richman DD, Morris D, Hubbell E, Chee M, Gingeras TR. (1996). Extensive polymorphisms observed in HIV-1 clade B protease gene using high-density oligonucleotide arrays. *Nat Med*. **2**:753-759.
- Landman R, Descamps D, Peytavin G, Trylesinski A, Katlama C, Girard PM, Bonnet B, Yeni P, Bentata M, Michelet C, Benalycherif A, Brun Vezinet F, Miller MD, Flandre P; TONUS (IMEA 021) Study Group. (2005). Early Virologic Failure and Rescue Therapy of Tenofovir, Abacavir, and Lamivudine for Initial Treatment of HIV-1 Infection: TONUS Study. *HIV Clin Trials*. **6**:291-301.
- Larder BA, Kellam P, Kemp SD. (1993). Convergent combination therapy can select viable multidrug-resistant HIV-1 in vitro. *Nature*. **365**:451-453.
- Larder BA, Kemp SD, Harrigan PR. (1995). Potential mechanism for sustained antiretroviral efficacy of AZT-3TC combination therapy. *Science*. **269**: 696-699.
- Larder BA, Bloor S, Kemp SD, Hertogs K, Desmet RL, Miller V, Sturmer M, Staszewski S, Ren J, Stammers DK, Stuart DI, Pauwels R. (1999). A family of insertion mutations between codons 67 and 70 of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase confer multinucleoside analog resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. **43**:1961-1967.
- Larder BA, Kemp SD, Hertogs K. (2000). Quantitative prediction of HIV-1 phenotypic drug resistance from genotypes: The virtual phenotype (VirtualPhenotype). *Antiviral Therapy*. **5**: 49.

- Ledergerber B, Lundgren JD, Walker AS, Sabin C, Justice A, Reiss P, Mussini C, Wit F, d'Arminio Monforte A, Weber R, Fusco G, Staszewski S, Law M, Hogg R, Lampe F, Gill MJ, Castelli F, Phillips AN; PLATO Collaboration. (2004). Predictors of trend in CD4-positive T-cell count and mortality among HIV-1-infected individuals with virological failure to all three antiretroviral-drug classes. *Lancet*. **364**:51-62.
- Levy JA, Hoffman AD, Kramer SM, Landis JA, Shimabukuro JM, Oshiro LS. (1984). Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San Francisco patients with AIDS. *Science*. **225**:840-842.
- Levy JA. (1993). Pathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *Microbiol Rev*. **57**:183-289.
- Levy DN, Aldrovandi GM, Kutsch O, Shaw GM. (2004). Dynamics of HIV-1 recombination in its natural target cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. **101**:4204-4209.
- Little SJ, Holte S, Routy JP, Daar ES, Markowitz M, Collier AC, Koup RA, Mellors JW, Connick E, Conway B, Kilby M, Wang L, Whitcomb JM, Hellmann NS, Richman DD. (2002). Antiretroviral-drug resistance among patients recently infected with HIV. *N Engl J Med*. **347**:385-394.
- Lorenz WW, McCann RO, Longiaru M, Cormier MJ. (1991). Isolation and expression of a cDNA encoding *Renilla reniformis* luciferase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **88**:4438-4442.
- Lu J, Sista P, Giguel F, Greenberg M, Kuritzkes DR. (2004). Relative replicative fitness of human immunodeficiency virus type 1 mutants resistant to enfuvirtide (T-20). *J Virol*. **78**:4628-4637.
- Maitland D, Moyle G, Hand J, Mandalia S, Boffito M, Nelson M, Gazzard B. (2005). Early virologic failure in HIV-1 infected subjects on didanosine/tenofovir/efavirenz: 12-week results from a randomized trial. *AIDS*. **19**:1183-1188.

- Mammano F, Troupin V, Zennou V, Clavel F. (2000). Retracing the evolutionary pathways of human immunodeficiency virus type 1 resistance to protease inhibitors: virus fitness in the absence and in the presence of drug. *J Virol.* **74**:8524-8531.
- Marin M, Rose KM, Kozak SL, Kabat D. (2003). HIV-1 Vif protein binds the editing enzyme APOBEC3G and induces its degradation. *Nat Med.* **9**:1398-1403.
- Markowitz M, Mo H, Kempf DJ, Norbeck DW, Bhat TN, Erickson JW, Ho DD.(1995). Selection and analysis of human immunodeficiency virus type 1 variants with increased resistance to ABT-538, a novel protease inhibitor. *Virology.* **69**:701-706.
- Martín-Carbonero L, Gil P, García-Benayas T, Barreiro P, Blanco F, de Mendoza C, Maida I, González-Lahoz J, Soriano V. (2006). Rate of Virologic Failure and Selection of Drug Resistance Mutations Using Different Triple Nucleos(t)ide Analogue Combinations in HIV-Infected Patients. *AIDS Res Hum Retroviruses.* **22**:1231-1235.
- Martinez-Picado J, Savara AV, Sutton L, D'Aquila RT. (1999). Replicative fitness of protease inhibitor-resistant mutants of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol.* **73**:3744-3752.
- Martinez-Picado J, Savara AV, Shi L, Sutton L, D'Aquila RT. (2000). Fitness of human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitor-selected single mutants. *Virology.* **275**:318-322.
- Matsumi S, Kosalaraksa P, Tsang H, Kavlick MF, Harada S, Mitsuya H. (2003). Pathways for the emergence of multi-dideoxynucleoside-resistant HIV-1 variants. *AIDS.* **17**:1127-1137.
- Matsuoka-Aizawa S, Sato H, Hachiya A, Tsuchiya K, Takebe Y, Gatanaga H, Kimura S, Oka S. (2003). Isolation and molecular characterization of a nelfinavir (NFV)-resistant human immunodeficiency virus type 1 that exhibits NFV-dependent enhancement of replication. *J Virol.* **77**:318-327.

- Matthews JC, Hori K, Cormier MJ. (1977). Substrate and substrate analogue binding properties of Renilla luciferase. *Biochemistry*. **16**:5217-5220.
- Mendieta J, Cases-González CE, Matamoros T, Ramírez G, Menéndez-Arias L. (2007). A Mg(2+)-induced conformational switch rendering a competent DNA polymerase catalytic complex. *Proteins*. [Epub ahead of print].
- Menendez-Arias L, Martinez MA, Quinones-Mateu ME, Martinez-Picado J. (2003). Fitness variations and their impact on the evolution of antiretroviral drug resistance. *Curr Drug Targets Infect Disord*. **3**:355-371.
- Menendez-Arias L, Este JA. (2004). HIV-resistance to viral entry inhibitors. *Curr Pharm Des*. **10**:1845-1860.
- Menzo S, Castagna A, Monchetti A, Hasson H, Danise A, Carini E, Bagnarelli P, Lazzarin A, Clementi M. (2004). Genotype and phenotype patterns of human immunodeficiency virus type 1 resistance to enfuvirtide during long-term treatment. *Antimicrob Agents Chemother*. **48**:3253-3259.
- Merrill DP, Moonis M, Chou TC, Hirsch MS. (1996). Lamivudine or stavudine in two- and three-drug combinations against human immunodeficiency virus type 1 replication in vitro. *J Infect Dis*. **173**:355-364.
- Meyer PR, Matsuura SE, Mian AM, So AG, Scott WA. (1999). A mechanism of AZT resistance: an increase in nucleotide-dependent primer unblocking by mutant HIV-1 reverse transcriptase. *Mol Cell*. **4**:35-43.
- Meynard JL, Vray M, Morand-Joubert L, Race E, Descamps D, Peytavin G, Matheron S, Lamotte C, Guiramand S, Costagliola D, Brun-Vezinet F, Clavel F, Girard PM; Narval Trial Group. (2002). Phenotypic or genotypic resistance testing for choosing antiretroviral therapy after treatment failure: a randomized trial. *AIDS*. **16**:727-736.
- Miller MD, Lamy PD, Fuller MD, Mulato AS, Margot NA, Cihlar T, Cherrington JM. (1998). Human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase expressing the K70E

- mutation exhibits a decrease in specific activity and processivity. *Mol Pharmacol.* **54**:291-297.
- Miller V, Schuurman R, Clavel F, Harrigan R, Hellmann N, Hertogs K, et al. (2001). Comparison of HIV-1 drug susceptibility (phenotype) results reported by three major laboratories [abstract 169]. *Antivir Ther.* **6**:129.
- Mittler JE, Markowitz M, Ho DD, Perelson AS. (1999). Improved estimates for HIV-1 clearance rate and intracellular delay. *AIDS.* **13**:1415-1417.
- Mocroft A, Ledergerber B, Katlama C, Kirk O, Reiss P, d'Arminio Monforte A, Knysz B, Dietrich M, Phillips AN, Lundgren JD; EuroSIDA study group. (2003). Decline in the AIDS and death rates in the EuroSIDA study: an observational study. *Lancet.* **362**:22-29.
- Muller B, Daecke J, Fackler OT, Dittmar MT, Zentgraf H, Krausslich HG. (2004). Construction and characterization of a fluorescently labeled infectious human immunodeficiency virus type 1 derivative. *J Virol.* **78**:10803-10813.
- Myint L, Matsuda M, Matsuda Z, Yokomaku Y, Chiba T, Okano A, Yamada K, Sugiura W. (2004). Gag non-cleavage site mutations contribute to full recovery of viral fitness in protease inhibitor-resistant human immunodeficiency virus type 1. *Antimicrob Agents Chemother.* **48**:444-452.
- Naldini L, Blomer U, Gallay P, Ory D, Mulligan R, Gage FH, Verma IM, Trono D. (1996). In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science.* **272**:263-267.
- Neumann T, Hagmann I, Lohrengel S, Heil ML, Derdeyn CA, Krausslich HG, Dittmar MT. (2005). T20-insensitive HIV-1 from naive patients exhibits high viral fitness in a novel dual-color competition assay on primary cells. *Virology.* **333**:251-262.
- Nijhuis M, Schuurman R, de Jong D, Erickson J, Gustchina E, Albert J, Schipper P, Gulnik S, Boucher CA. (1999). Increased fitness of drug resistant HIV-1 protease as a result of

- acquisition of compensatory mutations during suboptimal therapy. *AIDS*. **13**:2349-2359.
- Nijhuis M, Deeks S, Boucher C. (2001). Implications of antiretroviral resistance on viral fitness. *Current opinion in infectious diseases*. **14**:23-28.
- Novak RM, Chen L, MacArthur RD, Baxter JD, Huppler Hullsiek K, Peng G, Xiang Y, Henely C, Schmetter B, Uy J, van den Berg-Wolf M, Kozal M; Terry Bein Community Programs for Clinical Research on AIDS 058 Study Team. (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**:468-474.
- Oberlin E, Amara A, Bachelier F, Bessia C, Virelizier JL, Arenzana-Seisdedos F, Schwartz O, Heard JM, Clark-Lewis I, Legler DF, Loetscher M, Baggiolini M, Moser B. (1996). The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1. *Nature*. **382**: 833-835.
- Palella FJ Jr, Delaney KM, Moorman AC, Loveless MO, Fuhrer J, Satten GA, Aschman DJ, Holmberg SD. (1998). Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators. *N Engl J Med*. **338**:853-860.
- Panel de expertos de GESIDA; Plan Nacional sobre el Sida. (2007). Recommendations from the GESIDA/Spanish AIDS Plan regarding antiretroviral treatment in adults with human immunodeficiency virus infection (update January 2007). *Enferm Infecc Microbiol Clin*. **5**:32-53.
- Paolucci S, Baldanti F, Tinelli M, Maga G, Gerna G. (2003). Detection of a new HIV-1 reverse transcriptase mutation (Q145M) conferring resistance to nucleoside and non-nucleoside inhibitors in a patient failing highly active antiretroviral therapy. *AIDS*. **17**:924-927.

- Parkin N, Chappey C, Maroldo L, Bates M, Hellmann NS, Petropoulos CJ. (2002). Phenotypic and genotypic HIV-1 drug resistance assays provide complementary information. *J Acquir Immune Defic Syndr.* **31**:128-136.
- Parikh UM, Bachelier L, Koontz D, Mellors JW. (2006). The K65R mutation in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase exhibits bidirectional phenotypic antagonism with thymidine analog mutations. *J Virol.* **80**:4971-4977.
- Pauwels R, Balzarini J, Baba M, Snoeck R, Schols D, Herdewijn P, Desmyter J, De Clercq E. (1988). Rapid and automated tetrazolium-based colorimetric assay for the detection of anti-HIV compounds. *J Virol Methods.* **20**:309-321.
- Perelson AS, Neumann AU, Markowitz M, Leonard JM, Ho DD. (1996). HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time. *Science.* **271**:1582-1586.
- Petropoulos CJ, Parkin NT, Limoli KL, Lie YS, Wrin T, Huang W, Tian H, Smith D, Winslow GA, Capon DJ, Whitcomb JM. (2000). A novel phenotypic drug susceptibility assay for human immunodeficiency virus type 1. *Antimicrob Agents Chemother.* **44**:920-928.
- Pettit SC, Henderson GJ, Schiffer CA, Swanstrom R. (2002). Replacement of the P1 amino acid of human immunodeficiency virus type 1 Gag processing sites can inhibit or enhance the rate of cleavage by the viral protease. *J Virol.* **76**:10226-10233.
- Phillips AN, Dunn D, Sabin C, Pozniak A, Matthias R, Geretti AM, Clarke J, Churchill D, Williams I, Hill T, Green H, Porter K, Scullard G, Johnson M, Easterbrook P, Gilson R, Fisher M, Loveday C, Gazzard B, Pillay D; UK Collaborative Group on HIV Drug Resistance; UK CHIC Study Group. (2005). Long term probability of detection of HIV-1 drug resistance after starting antiretroviral therapy in routine clinical practice. *AIDS.* **19**:487-494.

- Popovic M, Sarngadharan MG, Read E, Gallo RC. (1984). Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. *Science*. **224**:497-500.
- Prado JG, Wrin T, Beauchaine J, Ruiz L, Petropoulos CJ, Frost SD, Clotet B, D'Aquila RT, Martinez-Picado J. (2002). Amprenavir-resistant HIV-1 exhibits lopinavir cross-resistance and reduced replication capacity. *AIDS*. **16**:1009-1017.
- Preston BD, Poiesz BJ, Loeb LA. (1988). Fidelity of HIV-1 reverse transcriptase. *Science*. **242**:1168-1171.
- Psallidopoulos MC, Schnittman SM, Thompson LM 3rd, Baseler M, Fauci AS, Lane HC, Salzman NP. (1989). Integrated proviral human immunodeficiency virus type 1 is present in CD4+ peripheral blood lymphocytes in healthy seropositive individuals. *J Virol*. **63**:4626-4631.
- Quinones-Mateu ME, Ball SC, Marozsan AJ, Torre VS, Albright JL, Vanham G, van Der Groen G, Colebunders RL, Arts EJ. (2000). A dual infection/competition assay shows a correlation between ex vivo human immunodeficiency virus type 1 fitness and disease progression. *J Virol*. **74**:9222-9233.
- Quinones-Mateu ME, Arts EJ. (2002). Fitness of drug resistant HIV-1: methodology and clinical implications. *Drug Resist Updat*. **5**:224-233.
- Quinones-Mateu ME, Arts EJ. (2006). Virus fitness: concept, quantification, and application to HIV population dynamics. *Curr Top Microbiol Immunol*. **299**:83-140.
- Raboud JM, Montaner JS, Conway B, Rae S, Reiss P, Vella S, Cooper D, Lange J, Harris M, Wainberg MA, Robinson P, Myers M, Hall D. (1998). Suppression of plasma viral load below 20 copies/ml is required to achieve a long-term response to therapy. *AIDS*. **12**:1619-1624.

- Race E, Dam E, Obry V, Paulous S, Clavel F. (1999). Analysis of HIV cross-resistance to protease inhibitors using a rapid single-cycle recombinant virus assay for patients failing on combination therapies. *AIDS*. **13**:2061-2068.
- Reed LJ, Muench H. (1938). A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am. J. Hyg.* **27**:493-497.
- Rey D, Schmitt MP, Hoizey G, Meyer P, Chavanet P, Allavena C, Diemer M, May T, Hoen B, Lang JM. (2007). Early Virologic Non-response to Once Daily Combination of Lamivudine, Tenofovir, and Nevirapine in ART-naive HIV-infected Patients: Preliminary Results of the DAUFIN Study. 14th Conference of Retroviruses and Opportunistic Infections, Los Angeles, CA. **Abstract 503**.
- Rizzardi GP, De Boer RJ, Hoover S, Tambussi G, Chapuis A, Halkic N, Bart PA, Miller V, Staszewski S, Notermans DW, Perrin L, Fox CH, Lange JM, Lazzarin A, Pantaleo G. (2000). Predicting the duration of antiviral treatment needed to suppress plasma HIV-1 RNA. *J Clin Invest.* **105**:777-782.
- Robinson LH, Gale CV, Kleim JP. (2002). Inclusion of full length human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) gag sequences in viral recombinants applied to drug susceptibility phenotyping. *J Virol Methods.* **104**:147-160.
- Rose RE, Gong YF, Greytok JA, Bechtold CM, Terry BJ, Robinson BS, Alam M, Colonna RJ, Lin PF. (1996). Human immunodeficiency virus type 1 viral background plays a major role in development of resistance to protease inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA.* **93**:1648-1653.
- Root MJ, Kay MS, Kim PS. (2001). Protein design of an HIV-1 entry inhibitor. *Science.* **291**:884-888.
- Rosenberg ES, Billingsley JM, Caliendo AM, Boswell SL, Sax PE, Kalams SA, Walker BD. (1997). Vigorous HIV-1-specific CD4+ T cell responses associated with control of viremia. *Science.* **278**:1447-1450.

- Ross L, Scarsella A, Raffanti S, Henry K, Becker S, Fisher R, Liao Q, Hirani A, Graham N, St Clair M, Hernandez J; NZT40012 Study Team. (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**:1107-1115.
- Salemi M, Strimmer K, Hall WW, Duffy M, Delaporte E, Mboup S, Peeters M, Vandamme AM. (2001). Dating the common ancestor of SIVcpz and HIV-1 group M and the origin of HIV-1 subtypes using a new method to uncover clock-like molecular evolution. *FASEB J*. **15**:276-278.
- Sambrook J, Fritsch, E F, Maniatis T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*. **74**:5463-5467.
- Sarafianos SG, Das K, Clark Jr. AD, Ding J, Boyer PL, Hughes SH, et al. (1999). Lamivudine (3TC) resistance in HIV-1 reverse transcriptase involves steric hindrance with b-branched amino acids. *Proc Natl Acad Sci USA*. **96**:10027-10032.
- Sebastian J, Faruki H. (2004). Update on HIV resistance and resistance testing. *Med Res Rev*. **24**:115-125.
- Segondy M, Montes B. (2005). Prevalence and conditions of selection of the K65R mutation in the reverse transcriptase gene of HIV-1. *J Acquir Immune Defic Syndr*. **38**:110-111.
- Shafer RW. (2002). Genotypic testing for human immunodeficiency virus type 1 drug resistance. *Clin Microbiol Rev*. **15**:247-277.
- Shafer RW. (2006). Rationale and uses of a public HIV drug-resistance database. *J Infect Dis*. **194**:S51-58.

- Sharma PL, Crumpacker CS. (1997). Attenuated replication of human immunodeficiency virus type 1 with a didanosine-selected reverse transcriptase mutation. *J Virol.* **71**:8846-8851.
- Sharma PL, Crumpacker CS. (1999). Decreased processivity of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase (RT) containing didanosine-selected mutation Leu74Val: a comparative analysis of RT variants Leu74Val and lamivudine-selected Met184Val. *J Virol.* **73**:8448-8456.
- Sheehy AM, Gaddis NC, Choi JD, Malim MH. (2002). Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein. *Nature.* **418**:646-650.
- Shi C, Mellors JW. (1997). A recombinant retroviral system for rapid in vivo analysis of human immunodeficiency virus type 1 susceptibility to reverse transcriptase inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother.* **41**:2781-2785.
- Shirasaka T, Kavlick MF, Ueno T, Gao WY, Kojima E, Alcaide ML, Choekijchai S, Roy BM, Arnold E, Yarchoan R, Mitsuya H. (1995). Emergence of human immunodeficiency virus type 1 variants with resistance to multiple dideoxynucleosides in patients receiving therapy with dideoxynucleosides. *Proc Natl Acad Sci USA.* **92**:2398-2402.
- Simon V, Padte N, Murray D, Vanderhoeven J, Wrin T, Parkin N, Di Mascio M, Markowitz M. (2003). Infectivity and replication capacity of drug-resistant human immunodeficiency virus type 1 variants isolated during primary infection. *J Virol.* **77**:7736-7745.
- Schock HB, Garsky VM, Kuo LC. (1996). Mutational anatomy of an HIV-1 protease variant conferring cross-resistance to protease inhibitors in clinical trials. Compensatory modulations of binding and activity. *J Biol Chem.* **271**:31957-31963.
- Spence RA, Kati WM, Anderson KS, Johnson KA. (1995). Mechanism of inhibition of HIV-1 reverse transcriptase by nonnucleoside inhibitors. *Science.* **267**:988-993.

- Staszewski S, Keiser P, Montaner J, Raffi F, Gathe J, Brotas V, Hicks C, Hammer SM, Cooper D, Johnson M, Tortell S, Cutrell A, Thorborn D, Isaacs R, Hetherington S, Steel H, Spreen W; CNAAB3005 International Study Team. (2001). Abacavir-lamivudine-zidovudine vs indinavir-lamivudine-zidovudine in antiretroviral-naive HIV-infected adults: A randomized equivalence trial. *JAMA*. **285**:1155-1163.
- Stoddart CA, Liegler TJ, Mammano F, Linnquist-Stepps VD, Hayden MS, Deeks SG, Grant RM, Clavel F, McCune JM. *Nat Med*. (2001). Impaired replication of protease inhibitor-resistant HIV-1 in human thymus. *Nat Med*. **7**:712-718.
- Stuyver L, Wyseur A, Rombout A, Louwagie J, Scarcez T, Verhofstede C, Rimland D, Schinazi RF, Rossau R. (1997). Line probe assay for rapid detection of drug-selected mutations in the human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase gene. *Antimicrob Agents Chemother*. **41**:284-291.
- Sufka SA, Ferrari G, Gryszowka VE, Wrin T, Fiscus SA, Tomaras GD, Staats HF, Patel DD, Sempowski GD, Hellmann NS, Weinhold KJ, Hicks CB. (2003). Prolonged CD4+ cell/virus load discordance during treatment with protease inhibitor-based highly active antiretroviral therapy: immune response and viral control. *J Infect Dis*. **187**:1027-1037.
- Sugiura W, Matsuda Z, Yokomaku Y, Hertogs K, Larder B, Oishi T, Okano A, Shiino T, Tatsumi M, Matsuda M, Abumi H, Takata N, Shirahata S, Yamada K, Yoshikura H, Nagai Y. (2002). Interference between D30N and L90M in selection and development of protease inhibitor-resistant human immunodeficiency virus type 1. *Antimicrob Agents Chemother*. **46**:708-715.
- Svedhem V, Lindkvist A, Lidman K, Sonnerborg A. (2002). Persistence of earlier HIV-1 drug resistance mutations at new treatment failure. *J Med Virol*. **68**:473-478.
- Terwilliger E, Sodroski JG, Rosen CA, Haseltine WA. (1986). Effects of mutations within the 3' orf open reading frame region of human T-cell lymphotropic virus type III (HTLV-III/LAV) on replication and cytopathogenicity. *J Virol*. **60**:754-760.

- Tisdale M, Kemp SD, Parry NR, Larder BA. (1993). Rapid in vitro selection of human immunodeficiency virus type 1 resistant to 3'-thiacytidine inhibitors due to a mutation in the YMDD region of reverse transcriptase. *Proc Natl Acad Sci USA*. **90**:5653-5656.
- Torti C, Quiros-Roldon E, Regazzi M, Antinori A, Patroni A, Villani P, Tirelli V, Cologni G, Zinzi D, Lo Caputo S, Perini P, Carosi G; KARINA-SISTHER Collaboration Group of the MASTER Cohort. (2005). Early virological failure after tenofovir + didanosine + efavirenz combination in HIV-positive patients upon starting antiretroviral therapy. *Antivir Ther*. **10**:505-513.
- Trouplin V, Salvatori F, Cappello F, Obry V, BreLOT A, Heveker N, Alizon M, Scarlatti G, Clavel F, Mammano F. (2001). Determination of coreceptor usage of human immunodeficiency virus type 1 from patient plasma samples by using a recombinant phenotypic assay. *J Virol*. **75**:251-259.
- Tural C, Ruiz L, Holtzer C, Schapiro J, Viciano P, Gonzalez J, Domingo P, Boucher C, Rey-Joly C, Clotet B; Havana Study Group. (2002). Clinical utility of HIV-1 genotyping and expert advice: the Havana trial. *AIDS*. **16**:209-218.
- Turner BG, Summers MF. (1999). Structural biology of HIV. *J Mol Biol*. **285**:1-32.
- Turner D, Brenner BG, Routy JP, Petrella M, Wainberg MA. (2004). Rationale for maintenance of the M184v resistance mutation in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase in treatment experienced patients. *New Microbiol*. **27**:31-39.
- Valer L, Martin-Carbonero L, de Mendoza C, Corral A, Soriano V. (2004). Predictors of selection of K65R: tenofovir use and lack of thymidine analogue mutations. *AIDS*. **18**:2094-2096.
- Van Maarseveen NM, Huigen MC, de Jong D, Smits AM, Boucher CA, Nijhuis M. (2006). A novel real-time PCR assay to determine relative replication capacity for HIV-1 protease variants and/or reverse transcriptase variants. *J Virol Methods*. **133**:185-194.

- Van Baelen K, Vandenbroucke I, Rondelez E, Van Eygen V, Vermeiren H, Stuyver LJ. (2007). HIV-1 coreceptor usage determination in clinical isolates using clonal and population-based genotypic and phenotypic assays. *J Virol Methods*. **146**:61-73.
- Verbiest W, Peeters M, Hertogs K, Schel P, Bloor S, Rinehart A, Graham N, Cohen C, Larder BA. (2000). VirtualPhenotype is concordant with actual phenotype: A retrospective analysis of data from Vira 3001. *Antiviral Therapy*. **5**:62.
- Weber J, Rangel HR, Chakraborty B, Tadele M, Martinez MA, Martinez-Picado J, Marotta ML, Mirza M, Ruiz L, Clotet B, Wrin T, Petropoulos CJ, Quinones-Mateu ME. (2003). A novel TaqMan real-time PCR assay to estimate ex vivo human immunodeficiency virus type 1 fitness in the era of multi-target (pol and env) antiretroviral therapy. *J Gen Virol*. **84**:2217-2228.
- Weber J, Weberova J, Carobene M, Mirza M, Martinez-Picado J, Kazanjian P, Quinones-Mateu ME. (2006). Use of a novel assay based on intact recombinant viruses expressing green (EGFP) or red (DsRed2) fluorescent proteins to examine the contribution of pol and env genes to overall HIV-1 replicative fitness. *J Virol Methods*. **136**:102-117.
- Wensing AM, van de Vijver DA, Angarano G, Asjo B, Balotta C, Boeri E, Camacho R, Chaix ML, 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 EL, Ormaasen V, Paraskevis D, Perrin L, Puchhammer-Stockl E, Ruiz L, Salminen M, Schmit JC, Schneider F, Schuurman R, Soriano V, Stanczak G, Stanojevic M, Vandamme AM, Van Laethem K, Violin M, Wilbe K, Yerly S, Zazzi M, Boucher CA; SPREAD Programme. (2005). Prevalence of drug-resistant HIV-1 variants in untreated individuals in Europe: implications for clinical management. *J Infect Dis*. **192**:958-966.
- Whitcomb JM, Huang W, Fransen S, Limoli K, Toma J, Wrin T, Chappey C, Kiss LD, Paxinos EE, Petropoulos CJ. (2007). Development and characterization of a novel

- single-cycle recombinant-virus assay to determine human immunodeficiency virus type 1 coreceptor tropism. *Antimicrob Agents Chemother.* **51**:566-575.
- White KL, Margot NA, Wrin T, Petropoulos CJ, Miller MD, Naeger LK. (2002). Molecular mechanisms of resistance to human immunodeficiency virus type 1 with reverse transcriptase mutations K65R and K65R+M184V and their effects on enzyme function and viral replication capacity. *Antimicrob Agents Chemother.* **46**:3437-3446.
- Winston A, Mandalia S, Pillay D, Gazzard B, Pozniak A. (2002). The prevalence and determinants of the K65R mutation in HIV-1 reverse transcriptase in tenofovir-naïve patients. *AIDS.* **16**:2087-2089.
- Winston A, Pozniak A, Mandalia S, Gazzard B, Pillay D, Nelson M. (2004). Which nucleoside and nucleotide backbone combinations select for the K65R mutation in HIV-1 reverse transcriptase. *AIDS.* **18**:949-951.
- Wrin T, Gamarnik AV, Whitehurst N, Beauchaine J, Whitcomb JM, Hellmann NS, Petropoulos CJ. (2001). Natural variation of replication capacity measurements in drug-naïve/susceptible HIV-1. 5th International Workshop on HIV Drug Resistance & Treatment Strategies, [abstract 24]. *Antiviral Therapy.* **6**:20.
- Yeni PG, Hammer SM, Hirsch MS, Saag MS, Schechter M, Carpenter CC, Fischl MA, Gatell JM, Gazzard BG, Jacobsen DM, Katzenstein DA, Montaner JS, Richman DD, Schooley RT, Thompson MA, Vella S, Volberding PA. (2004). Treatment for adult HIV infection: 2004 recommendations of the International AIDS Society-USA Panel. *JAMA.* **292**:251-265.
- Yusa K, Song W, Bartelmann M, Harada S. (2002). Construction of a human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) library containing random combinations of amino acid substitutions in the HIV-1 protease due to resistance by protease inhibitors. *J Virol.* **76**:3031-3037.
- Zennou V, Mammano F, Paulous S, Mathez D, Clavel F. (1998). Loss of viral fitness associated with multiple Gag and Gag-Pol processing defects in human

immunodeficiency virus type 1 variants selected for resistance to protease inhibitors in vivo. *J Virol.* **72**:3300-3306.

Zhang H, Zhou Y, Alcock C, Kiefer T, Monie D, Siliciano J, Li Q, Pham P, Cofrancesco J, Persaud D, Siliciano RF. (2004). Novel single-cell-level phenotypic assay for residual drug susceptibility and reduced replication capacity of drug-resistant human immunodeficiency virus type 1. *J Virol.* **78**:1718-1729.

Zhu QY, Scarborough A, Polsky B, Chou TC. (1996). Drug combinations and effect parameters of zidovudine, stavudine, and nevirapine in standardized drug-sensitive and resistant HIV type 1 strains. *AIDS Res Hum Retroviruses.* **12**:507-517.

Zhuang J, Jetzt AE, Sun G, Yu H, Klarmann G, Ron Y, Preston BD, Dougherty JP. (2002). Human immunodeficiency virus type 1 recombination: rate, fidelity, and putative hot spots. *J Virol.* **76**:11273-11282.

ANEXO

El trabajo realizado por el autor de esta tesis en el laboratorio del Dr. José Alcamí Pertejo, en el Instituto de Salud Carlos III, ha servido para publicar los artículos reseñados a continuación, de los cuales, los directamente relacionados con la tesis se señalan en negrita y se incluyen en el anexo;

1. Sanchez Palomino S, Abad MJ, Bedoya LM, García J, Gonzales E, Chiriboga X, Bermejo P, Alcamí J. (2002). "Screening of South American plants against human immunodeficiency virus: preliminary fractionation of aqueous extract from *Baccharis trinervis*". *Biol Pharm Bull.* **25**:1147-1150.
2. Amara A, Vidy A, Boulla G, Mollier K, García-Perez J, Alcamí J, Blanpain C, Parmentier M, Virelizier JL, Charneau P, Arenzana-Seisdedos F. (2003). "G protein-dependent CCR5 signaling is not required for efficient infection of primary T lymphocytes and macrophages by R5 human immunodeficiency virus type 1 isolates". *J Virol.* **77**:2550-2558.
3. Rullas J, Bermejo M, García-Pérez J, Beltán M, González N, Hezareh M, Brown SJ, Alcamí J. (2004). "Prostratin induces HIV activation and downregulates HIV receptors in peripheral blood lymphocytes". *Antivir Ther.* **9**:545-554
4. **García-Perez J, Sanchez-Palomino S, Perez-Olmeda M, Fernandez B, Alcamí J. (2007). A new strategy based on recombinant viruses as a tool for assessing drug susceptibility of human immunodeficiency virus type 1. *J Med Virol.* **79**:127-37.**
5. **García-Perez J, Perez-Olmeda M, Sanchez-Palomino S, Perez-Romero P, and Alcamí J. A New Strategy Based on Recombinant Viruses for Assessing the Replication Capacity of Human Immunodeficiency Virus Type 1. *HIV Med* (Aceptado).**
6. **Perez-Olmeda M, García-Perez J, Mateos E, Spijkers S, Ayerbe M.C., Carcas A, Alcamí J. In Vitro Analysis of Synergism and Antagonism of Different Nucleoside/Nucleotide Analogues Combinations on the Inhibition of Human Immunodeficiency Virus type 1 (HIV-1) replication. *J Med Virol* (Enviado).**

El trabajo de Tesis también ha dado lugar a la solicitud de la patente que se reseña a continuación:

INVENTORES (p.o. de firma): Alcamí J, Sánchez-Palomino S, García J, González N.

TÍTULO: Utilización de virus recombinantes en tests de sensibilidad a fármacos, detección de anticuerpos neutralizantes y cribado y caracterización de compuestos con actividad antiviral

N.º DE SOLICITUD: 200.400.116

PAÍS DE PRIORIDAD: España

FECHA DE PRIORIDAD: 10-05-2004

ENTIDAD TITULAR: FIPSE - ISCIII, ALCAMI J, SÁNCHEZ-PALOMINO S, GARCÍA J, GONZÁLEZ N.