

TD 408

TESIS DOCTORAL

**EVOLUCIÓN NORMAL DE LA INFECCIÓN POR EL
VIH-1 Y SUS MODIFICACIONES POR EL
TRATAMIENTO ANTIVIRAL**

Presentada por D. Antonio Caruz Arcos

R. 15775



10

284

26 JUN. 1997

Francisco Luque

Dep. Genético
Fac. Biología
27/6/97

16/7/97

1 Caruz

Evolución normal de la infección por el VIH-1 y sus modificaciones por el tratamiento antiviral.

A. Caruz

Memoria presentada por el Ldo. Antonio Caruz Arcos
para optar al grado de Dr. en Ciencias Biológicas

Francisco Luque ML

Dirigida por los Dres. Francisco Luque Vázquez, Profesor Titular del Departamento de Biología Experimental de la Univ. de Jaén y Manuel Leal Noval, facultativo del Servicio de Medicina Interna del Hospital Univ. V. Rocío.

Retrovirus y enfermedad: Perspectiva histórica

La familia *Retroviridae* comprende un gran grupo de virus que aparecen preferentemente en los vertebrados aunque también se han encontrado en otros taxones como los moluscos. Están asociados con varias enfermedades como tumores, desórdenes hematoyéticos y neurológicos, inmunodeficiencias, etc... A pesar de la amplia variedad de interacciones con el organismo hospedador, los retrovirus presentan una gran homogeneidad en cuanto a estructura del virión, organización del genomio y mecanismo de replicación. Todos los retrovirus tienen una estructura genética similar, consistente en 3 genes principales denominados *gag*, *pol*, y *env* que codifican para las proteínas de la nucleocápsida, enzimas implicadas en la replicación y proteínas de la envuelta del virión respectivamente. Algunas subfamilias de retrovirus como los lentivirus tienen además otros genes adicionales. Una característica única de la replicación de estos virus es que el genomio de ARN ha de ser retrotranscrito a ADN, este hecho sólo es compartido por otras tres familias de virus, los hepadnavirus (virus de la hepatitis B humano, virus de la hepatitis de la garza, ...), los caulimovirus (virus del mosaico de la coliflor, virus del anillo del clavel, etc...) y los badnavirus (virus baciliforme de la caña de azúcar, virus baciliforme del arroz, etc...). El ADN sintetizado se integra en los cromosomas de la célula hospedadora y se denomina provirus. Los viriones son esféricos de 100nm de diámetro, cubiertos por una envuelta procedente de la célula hospedadora en la cual se ancla la proteína de envuelta viral, responsable de la unión al receptor de la célula hospedadora. En el interior se encuentra la cápsida, formada por varias proteínas que se organizan en una estructura esférica o cónica. Incluida en la cápsida se encuentra la nucleocápsida proteica unida al genomio viral que está constituido por dos moléculas de ARN de sentido positivo, ARNt y algunas proteínas con funciones enzimáticas imprescindibles para la replicación del virus. Son la proteasa, integrasa y transcriptasa inversa (productos del gen *pol*), esta última es la enzima responsable de la síntesis de ADN bicatenario a partir del ARN genómico.

Los primeros retrovirus fueron aislados en la primera década del siglo XX en leucemias de pollos por Ellerman y Bang (1) y en sarcomas por Rous (2). Este autor demostró que el

sarcoma era transmisible a partir de un extracto celular filtrado. También en 1904 se descubrió el virus de la anemia infecciosa equina (EIAV), que induce episodios de anemia hemolítica en caballos (3). A partir de entonces muchos retrovirus de aves se han identificado y asociado con enfermedades como linfomas, mieloblastosis, eritroblastosis y osteopetrosis. El siguiente avance importante se dió en los años 50 con el trabajo de Gross (4) que demostró claramente que el virus de la leucemia murina, retrovirus aislado a partir de una cepa endogámica de ratones podía inducir leucemia en ratones neonatos. Desde entonces varios virus de la leucemia de ratones han sido aislados aunque todos ellos están muy relacionados entre si. También en esta década, Sigurdsson (5) investigó unas enfermedades epidémicas de las ovejas en Islandia denominadas Maedi-Visna que producían una disfunción pulmonar y cerebral. Descubrió que la enfermedad era transmisible y que existía un largo periodo de incubación desde la infección hasta la aparición de los síntomas, posteriores análisis biológicos han demostrado que el virus responsable de esta enfermedad es un retrovirus. A mediados de los años 60, W. Jarrett *et al* (6) encontraron que neoplasias hematopoyéticas en poblaciones silvestres de gatos eran debidas a la infección por un retrovirus, el virus de la leucemia felina. Además, el virus puede causar síndrome de inmunodeficiencia, anemia y aborto espontáneo. Poco después se determinó un origen retroviral para la leucemia de los bovinos gracias al perfeccionamiento de las técnicas de cultivo de las células tumorales (7).

En este punto se produjo una importante inflexión en el conocimiento de esta familia de virus, Temin y Mizutani (8) y Baltimore (9) descubrieron que el genomio viral de ARN era retrotranscrito hasta ADN por una ADN polimerasa viral que se denominó transcriptasa inversa. Esta reversión del flujo normal de información genética que va de ADN→ARN→Proteína, no tenía precedente y llevó a la designación de este grupo de virus como retrovirus. Una consecuencia práctica de este descubrimiento fue que los retrovirus se podían identificar por una actividad enzimática, permitiendo su detección con facilidad.

Debido a que la etiología de muchas leucemias de animales tenían un origen retroviral, había un gran interés en la búsqueda de hipotéticos retrovirus humanos asociados a las leucemias o linfomas. En los años 70 aparecieron leucemias en primates con un retrovirus

como origen (10-12), ello no hizo sino incrementar las expectativas de encontrar un virus equivalente en el hombre. Pero ello no ocurrió porque se asumieron algunas premisas erróneas, como que todos los retrovirus tienen altas tasas de replicación e inducen una gran viremia circulante o que todos los retrovirus se podían cultivar en fibroblastos. Debido a la noción de que el cultivo de las células infectadas es necesario para la hipotética detección de retrovirus humanos a mediados de los años setenta se intentaron encontrar factores de crecimiento que permitieran el crecimiento de células hematopoyéticas. Morgan *et al* (13) descubrieron un factor en el medio de cultivo de células mononucleares de sangre periférica estimuladas con fitohemaglutinina que permitía el cultivo a largo plazo de linfocitos T. Este factor denominado inicialmente TCGF (*T Cell Groth Factor*) se conoce actualmente por interleukina 2 (IL-2) y permitió el cultivo de células T neoplásicas (14). A principios de los años 80 usando estas técnicas de cultivo y métodos muy sensibles de detección de actividad transcriptasa inversa Poesz *et al* (15,16) comunicaron el aislamiento de un retrovirus humano a partir de células de una leucemia de células T. Este virus se denominó HTLV-I de *Human T cell Leukemia Virus type-I*. Se observó que era un virus de transmisión horizontal y que no estaba muy relacionado con los retrovirus previamente conocidos. Usando técnicas similares a las utilizadas para el aislamiento del HTLV-I, Kalyanaraman *et al* (17) aislaron otro virus relacionado con el HTLV-I a partir de las células T de un paciente con una leucemia de células peludas. Fue el segundo retrovirus humano, el HTLV-II.

A principios de la década de los 80 también apareció una nueva enfermedad epidémica que ahora conocemos como SIDA de Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida. Varias observaciones sobre este síndrome hacían que los retrovirus fueran candidatos a agentes etiológicos: el SIDA era una enfermedad de los linfocitos T, y todos los retrovirus humanos conocidos presentaban tropismo por este tipo de células, además retrovirus animales como el virus de la leucemia felina estaban asociados con desórdenes inmunosupresores, y por último la enfermedad tenía un largo periodo de incubación, característica propia de algunos retrovirus como el Maedi-Visna.

Barré-Sinoussi *et al* (18) a partir de un ganglio linfático de un hombre con linfadenopatía persistente (síntoma asociado al SIDA), utilizando técnicas de cultivo de linfocitos T y de detección de actividad transcriptasa inversa aisló un retrovirus que denominó LAV de *Lymphadenopathy-Associated Virus*. Pero pronto se observó que este virus presentaba unas características biológicas diferentes de los otros retrovirus humanos conocidos: crecía hasta alcanzar altas concentraciones en cultivos de linfocitos T CD4+ y era altamente citopático (a diferencia del HTLV que los inmortalizaba). Prácticamente en paralelo otros grupos encontraron virus similares Gallo *et al* (19) identificaron el HTLV-III y Levy (20) el ARV (*AIDS related Retrovirus*). Pronto los tres virus fueron reconocidos como miembros del mismo grupo de retrovirus: los lentivirus y se le asignó el nombre común de HIV de *Human Immunodeficiency Virus*. La subfamilia de los lentivirinae que como veremos posteriormente se caracterizan por su complejo genomio y su mecanismo de regulación de la expresión y de la multiplicación. Poco después el HIV se aisló de la sangre de varios pacientes con SIDA, complejo relacionado al SIDA (estadio de la enfermedad con síntomas de menor gravedad que precede al SIDA), y de individuos sin síntomas clínicos. Reconociéndose la relación causal entre el HIV y el SIDA.

Usando técnicas similares y sondas específicas para el HIV, se han aislado virus relacionados a partir de monos africanos (21) y de humanos del Oeste de Africa (22), este último virus se conoce ahora como el HIV-II y aunque se asocia a una enfermedad similar al SIDA parece tener una menor patogenicidad.

En estos momentos existe un conocimiento muy exacto de la biología de estos virus y aunque en un principio los retrovirus se clasificaron utilizando criterios como la patogenicidad, tipo de estructura del virión, utilización de receptores celulares, etc... , actualmente con el advenimiento de las técnicas de biología molecular, en particular la secuenciación de ADN, se ha trazado un esquema muy exacto de las relaciones filogenéticas de todos los retrovirus conocidos, reconociéndose tres subfamilias y siete grupos principales, que están representados en la tabla 1.

Tabla 1. Clasificación de los retrovirus

<i>Subfamilia</i>	<i>Grupo</i>	<i>Ejemplos</i>	<i>Comentarios</i>
Oncovirinae	Leucemia-Sarcoma de Aves	Virus sarcoma de Rous (RSV)	Contiene oncogén
		Virus amieloblastosis aviar (AMV)	Contiene oncogén
	Tipo C Mamíferos	Virus de la leucemia murina de Moloney (Mo-MLV)	Linfoma células T
		Virus del sarcoma murino de Harvey (Ha-MSV)	Contiene oncogén
		Virus de la leucemia murina de Abelson (A-MuLV)	Contiene oncogén
		Virus leucemia felina (FeLV)	Leucemia células T e inmunodeficiencia
	Tipo B	Virus del sarcoma de simio (SSV)	Contiene oncogén
		Virus de la reticulo endoteliosis (REV)	Endoteliosis en aves
	Tipo D	Virus de la necrosis del bazo (SNV)	Necrosis en aves
		Virus tumor mamario de ratón (MMTV)	Carcinoma de mama
	Tipo HTLV	Virus simio de Mason-Pfizer (MPMV)	Inmunodeficiencia en monos
		Virus de la leucemia células T del hombre (HTLV-I, II)	Linfoma de células T
		Virus leucemia bovina (BLV)	Linfoma de células B
	Lentivirinae	Lentivirus	Virus de la inmunodeficiencia humana tipo-I y II (HIV-I, II)
Virus inmunodeficiencia simio (SIV)			SIDA de monos
Virus inmunodeficiencia felina (FIV)			SIDA en felinos
Virus del Maedi-Visna (MVV)			Enfermedad neurológica y pulmonar en ovejas y cabras
Virus artritis-encefalitis caprina (CAEV)			
Virus anemia infecciosa equina (EIAV)			Anemia infecciosa en caballos
Spumavirinae	Spumavirus	Virus espumoso humano (HFV)	Aparentemente benignos
		Virus espumoso simio (SFV)	

Origen filogenético del HIV-1

El HIV-1 y el HIV-2 pertenecen a la subfamilia de los lentivirinae, familia a la que pertenecen virus aislados a partir de ovejas (Maedi-Visna), cabras (CAEV), caballos (EIAV), gatos (FIV) y monos (SIV), tabla 1. Todos los lentivirus tienen propiedades comunes que los diferencian del resto de los retrovirus como son la morfogénesis, regulación de la transcripción y estructura genética. Todos inducen infecciones persistentes y en algunos casos inmunosupresión. El grupo de virus que está más relacionado con los HIV son los SIV, y todos los datos biológicos sugieren que el origen de los virus humanos hay que buscarlo en virus de monos que han logrado traspasar la barrera interespecífica. Las especies de monos infectadas endémicamente por alguna de las variedades del SIV son especies africanas del género de los Cercopitécidos, como el mangabey manchado (*Cercocebus atys-SIV_{sm}*), mandril (*Papio sphinx-SIV_{mn}*), mono de Sykes (*Cercopithecus mitis albogularis-SIV_{syk}*) y el mono verde africano (*Cercopithecus aethiops-SIV_{agm}*). Análisis de secuencias de los genes *gag* y *pol* han mostrado que los virus SIV y HIV están muy relacionados filogenéticamente. El HIV-1 parece estar situado a la misma distancia genética de todos los subgrupos de SIV, independientemente del método utilizado en los análisis de secuencias. Por el contrario, HIV-2 aparece fuertemente relacionado con el virus SIV_{sm}. La explicación para esta observación experimental, es que el HIV-2 probablemente deriva de esta cepa viral. El HIV-2 es la especie viral encontrada más frecuentemente en el Oeste de Africa y en humanos originarios de esta zona. El mangabey manchado es una especie muy utilizada como animal doméstico y entre el 30-50% tiene anticuerpos para el virus. Además está en contacto directo con humanos, siendo posible la transmisión interespecífica del virus mediante mordedura o consumo de carne infectada. En este sentido, análisis de secuencias de HIV-2 procedentes de individuos de zonas rurales de Liberia, han revelado que los virus aislados de humanos están más cercanos al SIV_{sm} que a otras cepas de HIV-2. El virus puede haber sido transmitido a los humanos durante largo tiempo pero la expansión ha podido ser autolimitada, la incidencia actual de la infección en los países del Oeste de Africa podría atribuirse a un cambio en las propiedades biológicas del virus o a motivos epidemiológicos (movimientos de población, cambios en los sistemas de vida, etc...).

Las hipótesis para explicar el origen del HIV-2 no explican la fuente del HIV-1. Existen dos pistas principales para rastrear el origen del HIV-1, la primera toma como referencia a los chimpancés. En Gabón se identificaron 2 chimpancés salvajes con anticuerpos específicos para el HIV-1, un aislamiento de los virus y su posterior secuenciación revelaron que efectivamente pertenecían al HIV-1. La tasa de incidencia de esta infección entre los chimpancés no es conocida pero parece ser un evento raro. El nivel de interacción entre el hombre y el chimpancé es muy limitado, y aunque no puede descartarse que esta especie sea la cuna del HIV-1, las evidencias parecen ser menos fuertes que para el HIV-2 y el SIV_{sm}. La otra pista nos conduce tras el mono verde africano, este nombre en realidad no se corresponde con una sola especie, sino que representa al menos a cuatro especies aisladas geográficamente: mono verde (*Cercopithecus sabaues*), cercopiteco verde (*C. aethiops*), mono tántalo (*C. tantalus*) y el vervet (*C. pygerythrus*). La diversidad de los SIV's de estas especies puede incluir al HIV-1 como una de sus variantes, y aunque no se ha aislado el HIV-1 de ninguna especie concreta, el grupo de monos verde africanos pudiera ser importante como origen del actual HIV-1.

Estructura genética del HIV-I

El virión del HIV-I al microscopio electrónico presenta un cápsida proteica con forma cónica compuesta por la proteína p25, dentro de la cual se disponen 2 cadenas de ARN genómico al que se asocian la transcriptasa inversa y las proteínas de la nucleocápsida p9 y p6. Rodeando a esta estructura está la matriz formada por la proteína p17. Las proteínas de la cápsida y nucleocápsida son productos del gen *gag*. Rodeando a la matriz hay una envuelta lipídica en la cual se anclan las proteínas de la envuelta (gen *env*), figura 1.

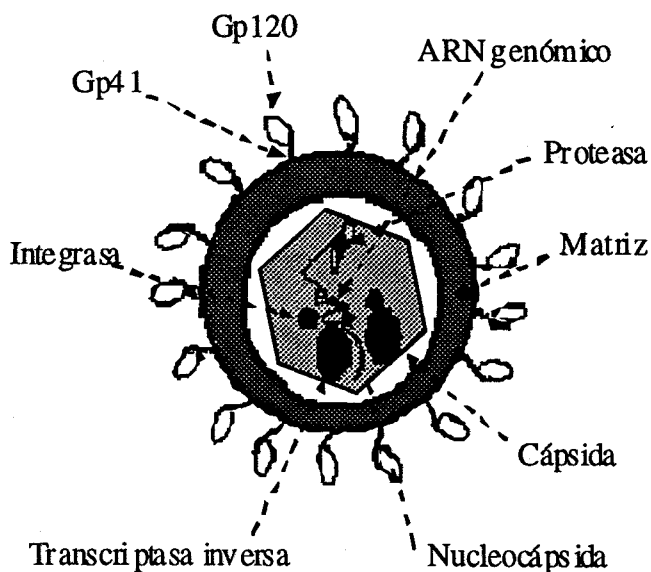


Figura 1: Esquema del virión de HIV-1

La superficie del virus está formada por 72 nudos que contienen trímeros o tetrámeros de las proteínas de envuelta. Estas derivan de una molécula precursora de 160KD que es procesada dando la glicoproteína 120 (gp120) que se dispondrá en la superficie y la glicoproteína 41 (gp41) que formará la proteína transmembrana. La proteína gp120 contiene los sitios de unión para los receptores de la célula hospedadora. El receptor principal es la molécula CD4 que aparece en la superficie de algunos tipos de células pero principalmente en un subtipo de linfocitos T y en monocitos-macrófagos. Es una proteína implicada en el

pueden funcionar varias proteínas de la membrana de la célula, todas funcionan como receptores de quemoquinas, son las proteínas CCR5, CCR2 (receptores de RANTES, MIP1 α y MIP1 β) () y CXCR4 (receptor de SDF1) ().

El genomio de los retrovirus es diploide, lleva dos cadenas de ARN de 9,8 Kb y presenta todas las características de un ARNm celular normal, llevan un *capping* de guanina en el extremo 5' y están poliadenilados en el extremo 3'. Además el ARN está modificado postranscripcionalmente por la metilación de algunos residuos de adenina en la posición 6. Esta modificación es específica de secuencia (22) y parece estar implicada en la regulación de la maduración del ARN (23). El ARN genómico está asociado a otras moléculas de ARNt y ARN ribosómicos pequeños procedentes de la célula hospedadora. Están unidos por complementariedad de bases a una zona situada entre 100-500 bases del extremo 5'. Este ARNt es fundamental en la replicación pues actuará como cebador para la síntesis de ADN. En los lentivirus funciona como tal los ARNt de Lisina 1 y 2.

El genomio del HIV-1 puede dividirse en zonas codificantes y zonas reguladoras en *Cis* implicadas tanto en la síntesis de ADN como en la regulación de la expresión de la transcripción. Desde el extremo 5' podemos distinguir las siguientes zonas reguladoras importantes (figura 2).

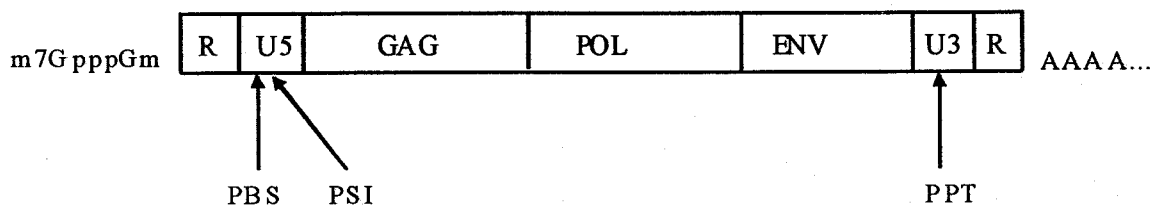


Figura 2: Estructura básica del genomio del HIV-1

R: Secuencia de 98 bases , todos los retrovirus tienen esta zona redundante con idéntica secuencia en los extremos 5' y 3'. Esta secuencia representa un papel fundamental en la transcripción inversa como veremos a continuación.

U5: Aparece en el extremo 5' del virión y tiene 83 bases. Es la primera región retrotranscrita a ADN, y está implicada en el inicio de la síntesis de ADN (24,25). El extremo 3' contiene la región *att* necesaria para la integración del ADN retrotranscrito en los cromosomas de la célula hospedadora. Algunas observaciones la implican también en el empaquetamiento del ARN viral en los viriones (25).

PBS: Son los 18 nucleótidos que forman el *primer binding site* complementarios del ARNt que actúa como iniciador en la síntesis de ADN

Tramo de polipurina (PPT): 9 residuos de purina, que funcionan como sitio de iniciación para la síntesis de la cadena positiva de ADN.

Secuencias Psi: Situadas “corriente abajo” del PBS, son las secuencias de empaquetamiento del ARN genómico en los viriones.

U3: En ARN genómico representa el extremo 3' y tiene 453 bases, contiene una serie de secuencias reguladoras implicadas en la replicación y en el control de la transcripción del provirus. Los extremos 5' y 3' del ARN genómico y del ADN del provirus son distintos, el primero sólo tiene duplicadas las secuencias R, mientras que el provirus tiene en ambos extremos una estructura denominada LTR de *Long Terminal Repeat* constituidas por la sucesión de las secuencias U3, R y U5, y que son generadas durante la síntesis de ADN por la transcriptasa inversa. Son fundamentales para la regulación de la expresión de los genes virales después de la integración del provirus, las LTR funcionan como promotores en una amplia variedad de células, funcionando como un sistema de percepción viral de las condiciones óptimas para el inicio de la replicación.

Las zonas codificantes están organizadas de una manera similar en todos los retrovirus, siendo fundamentales los genes *gag*, *pol* y *env*. El HIV-1 es un retrovirus muy complejo que además tiene otros genes reguladores: *tat*, *rev*, *nef*, *vif*, y *vpr*, figura 3.

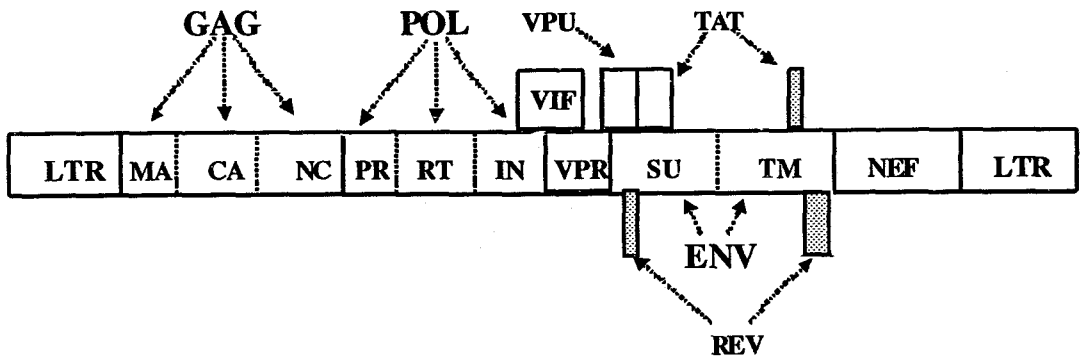


Figura 3: Representación esquemática del provirus del HIV-1, las abreviaturas para las proteínas codificadas por el ADN proviral son: MA, matriz; CA, cápsida; NC, nucleocápsida; PR, proteasa; RT, Transcriptasa inversa; IN, integrasa; SU, glicoproteína de superficie; TM, proteína transmembrana; LTR, *Long Terminal Repeats*.

gag: Es traducido a partir de un ARNm genómico, dando lugar a una poliproteína precursora que es posteriormente madurada para dar lugar a las proteínas de la cápsida (p25), nucleocápsida (p6 y p9) y matriz (p17).

pol: Codifica para tres proteínas, la proteasa, integrasa y transcriptasa inversa.

env: Codifica las dos glicoproteínas de la envuelta, la de superficie (gp120) y la transmembrana (gp41).

tat: Funciona como un transactivador del promotor viral situado en la LTR, estimulando fuertemente la transcripción. La proteína es traducida a partir de un ARNm subgenómico que ha sufrido un splicing dando lugar a la fusión de dos zonas diferentes del genomio ().

rev: Es una pequeña proteína reguladora de la expresión viral, se expresa al igual que *tat* a partir de una pauta de lectura dividida en dos. Funciona como un interruptor molecular que exporta ARNm viral sin madurar al núcleo para que produzca las proteínas estructurales del virión.()

nef: Proteína de función aún no aclarada, aunque parece estar implicada en la represión de la expresión en membrana celular de la molécula CD4 lo que aumenta la calidad de la proteína gp120 sintetizada por la célula y evita la coinfección de la célula. También está

vif: Proteína de función desconocida, aunque parece estar implicada en aumentar la infectividad del virión afectando el procesado de las proteínas virales, el ensamblaje del virión o la maduración del core viral antes del empaquetamiento (). Otros autores sugieren que Vif afecta a la síntesis de ADN proviral ().

vpr: Es una proteína de 96 aminoácidos cuya función no es conocida completamente. Vpr está presente en el virión en un número relativamente alto de copias (). En las células esta proteína se localiza en el núcleo, y las posibles funciones son la del transporte nuclear de los complejos pre-integración, transactivación de genes celulares, o inducción de la diferenciación celular ().

vpu: Es una proteína integral de membrana que induce la degradación de la proteína CD4 en el retículo endoplásmico y potencia la liberación de virus a partir de la superficie celular. La degradación de CD4 es específica y requiere la fosforilación de Vpu. Otros estudios () parecen indicar que esta proteína viral puede interferir con la ruta de secreción celular potenciando la expresión en membrana de proteínas virales.

Ciclo de vida del HIV-1

La infección de la célula comienza con la interacción de la proteína gp120 de la superficie del virión con el receptor CD4 de la membrana del linfocito. También son necesarios otros correceptores que funcionan como receptores de quemokinas, son el CCR5 que funciona como un receptor para una familia de quemokinas (RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β) () y el CXCR4 () que es el receptor de SDF1. Existen virus con diferente tropismo: linfocitos T frente a macrófagos, y depende del tipo de correceptor que son capaces de utilizar para infectar a las células. Los virus con tropismo hacia macrófago utilizan el CCR5 () y los linfotropos el CXCR4 (). La base molecular de estas preferencias se sitúa fundamentalmente en la secuencia de aminoácidos de una región diferente del dominio de unión a CD4 y que mapea en una zona llamada V3.

Después de la entrada en la célula, el virus comienza la retrotranscripción del ARN en el citoplasma, el ADN bicatenario forma el complejo preintegración con las proteínas virales de la matriz y la integrasa. Es transportado al núcleo donde el ADN se integra en un cromosoma celular. La síntesis comienza con la formación de la cadena negativa de ADN, el ARNt que funciona como cebador se une a la zona PBS cerca de U5 en el ARN viral. El ARNt es extendido hasta el extremo 5' de la región R por la transcriptasa inversa. La actividad ribonucleasa H que posee la propia transcriptasa inversa elimina el ARN del híbrido ARN-ADN dejando un trozo de ADN monocatenario con complementariedad de bases con la región R. Se produce a continuación un salto, y esta zona de ADN se une a la región R del extremo 3' del ARN viral, figura 4. La elongación de este ADN por la transcriptasa inversa genera una copia complementaria (cadena negativa) en ADN del ARN del virión.

La cadena positiva de ADN, es elongada a partir del tracto de polipurina, en este punto la actividad ribonucleasa H produce un corte en el extremo 5' de la zona U3 del ARN que genera un punto de elongación por la transcriptasa inversa que genera la cadena positiva de ADN, figura 4.

La transcriptasa inversa está formada por dos subunidades de 66 y 51KD, esta última deriva de la anterior por rotura proteolítica. Contiene una zona flexible no esencial en la mitad, el dominio polimerasa está en el extremo N-terminal, la actividad ribonucleasa H se sitúa en el

extremo C-terminal. La transcriptasa inversa tiene una tasa de error altísima, produce una incorporación errónea cada 2000 a 4000 nucleótidos, siendo la menos exacta de todos los retrovirus ().

El ADN complementario generado es transportado al núcleo donde se integrará en uno de los cromosomas de la célula. La integrasa reconoce un sitio específico en los extremos del ADN viral y elimina uno o dos nucleótidos del extremo 3', exponiendo el grupo OH que será utilizado para la unión al ADN cromosómico diana que ha sido previamente cortado. Después de la unión inicial, los huecos son rellenados, generando una pequeña duplicación en el ADN diana de 5 pares de bases. Existen muchos sitios de integración pero no son completamente aleatorios, no se necesita homología entre el ADN viral y el celular. Ha partir de este momento el provirus pasa a formar parte del genomio de la célula hospedadora y depende de la

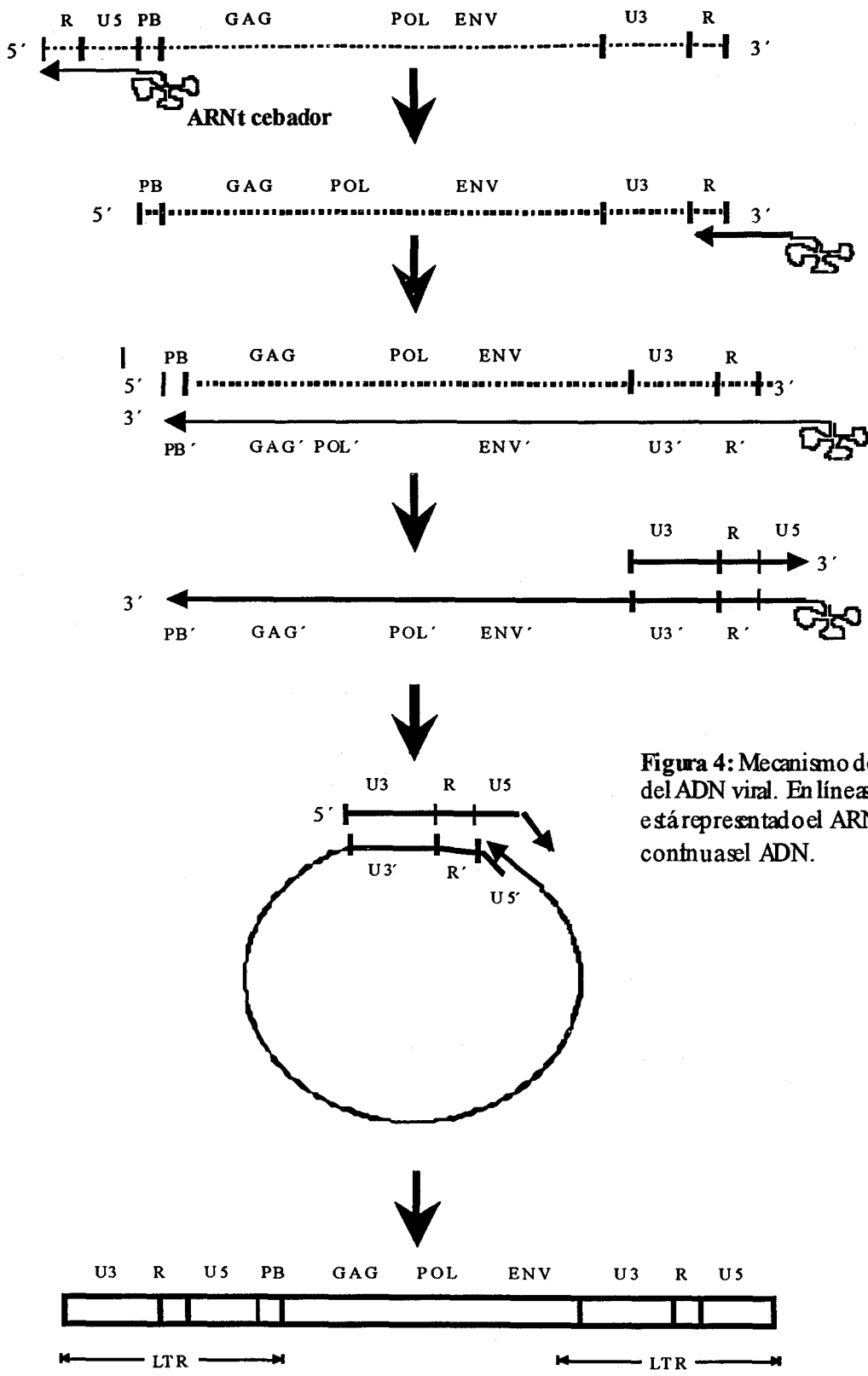


Figura 4: Mecanismo de síntesis del ADN viral. En líneas discontinuas: está representado el ARN y en continuas el ADN.

El provirus regula su transcripción a través de las LTR que incluyen promotores, *enhancers* y represores de la transcripción, figura 5, que funcionan como un sistema de percepción del estado de la célula hospedadora y regulan la iniciación y el mantenimiento de la expresión del virus, que depende del estado de activación y diferenciación celular. En el control de la transcripción aparecen tanto proteínas celulares como la proteína viral Tat que funciona como un transactivador. La LTR puede dividirse en 3 zonas principales:

Moduladora: Región fundamentalmente potenciadora de la transcripción, contiene 6 secuencias de unión a los factores de transcripción: Proteína activadora 1 (AP-1), promotor ovalbúmina de pollo (COUP), factor nuclear células T activadas (NF-AT), factor estimulador corriente-arriba (USF), factor de células T 1A (TCF-1A) y el factor nuclear kappa B (NF-KB). También contiene una zona de unión a un represor el elemento regulador negativo (NRE).

Core: Estructura típica de promotor, tiene tres sitios de unión al factor SP-1, una secuencia consenso TATA y un elemento iniciador. Esta zona es muy similar a las zonas reguladoras de otros genes celulares.

TAR: Es una zona crítica para la activación por la proteína viral Tat. El ARN transcrito forma un bucle al que se unen tat y dos proteínas celulares, una proteína de unión al ARN TAR de 185KD y una proteína celular de 68KD.

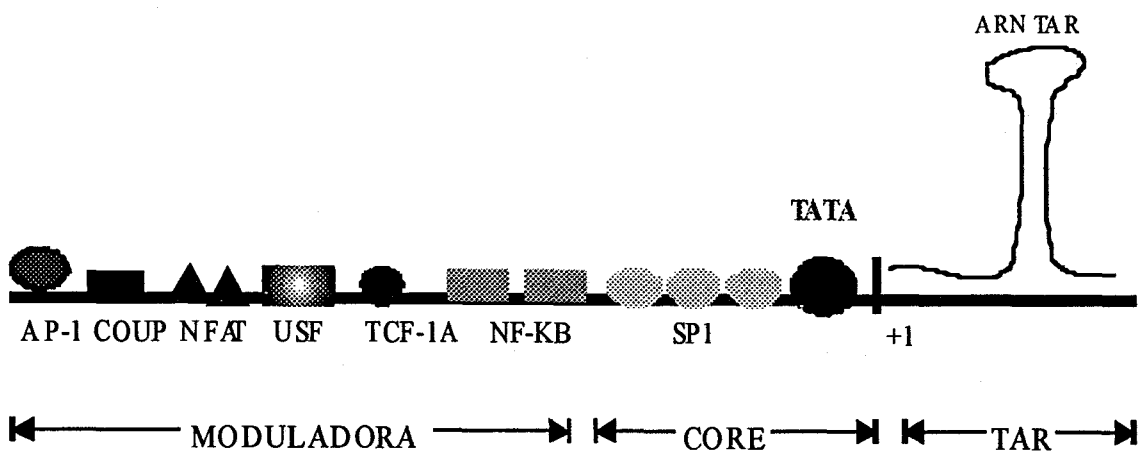


Figura 5: Estructura de la LTR del HIV-1

El provirus es transcrito en un solo precursor de ARNm, pero existen dos fases en la expresión de las proteínas virales, en la temprana se producen las proteínas Tat, Rev y Nef, y en la tardía se sintetizan el resto. El HIV-1 tiene un modo bifásico de expresión que depende de un mismo promotor y de un intrincado mecanismo de control de la expresión que incluye maduración alternativa del ARNm viral, *frameshifting* o cambio de pauta traduccional y procesado de poliproteínas. Todos los primeros transcritos van a ser procesados, exportando al citoplasma ARNm subgenómicos pequeños para la síntesis de las proteínas Tat, Rev y Nef, con funciones de incrementar la transcripción a través de la LTR, regular el procesamiento de los ARN y preparar a la célula para la expresión de las proteínas virales, respectivamente. El punto fundamental es que la actividad de Rev depende de su concentración, sólo cuando alcanza cierto umbral, pasa de estar en forma monomérica inactiva a formar dímeros activos, que se unen a una secuencia del ARNm llamada RRE (*Rev Response Element*) impidiendo su procesamiento y fomentando su exportación al citoplasma. Estos ARNm no procesados van a ser traducidos en las proteínas estructurales del virión: envuelta, cápsida, nucleocápsida, transcriptasa inversa, integrasa y proteasa. En la traducción se produce un fenómeno llamado *frameshifting* traduccional que permite la síntesis del número correcto de cada una de las proteínas del virión. Se basa en el hecho de que las proteínas de la cápsida y las enzimas del virión se sintetizan a partir del mismo ARNm, pero en el virión existen 10 veces más proteínas de cápsida que enzimas de la replicación. El virus consigue una relación correcta entre ambos tipos de proteínas gracias a que los genes *gag* y *pol* aunque están en el mismo ARNm, no están en la misma pauta de lectura, y el ribosoma ha de cambiar de pauta de lectura para poder traducir la proteínas de *pol*. Esto ocurre sólo en el 10% de los casos, lo que determina el número relativo final de cada tipo de proteína. Para conseguirlo el ARNm viral tiene una secuencia de 7pb en el sitio donde se produce el cambio de pauta y el ARN forma una estructura secundaria corriente abajo del sitio, figura 6. La secuencia favorece el cambio de apareamiento en el ARNt y el bucle ralentiza al ribosoma aumentando la probabilidad de que se produzca el salto.

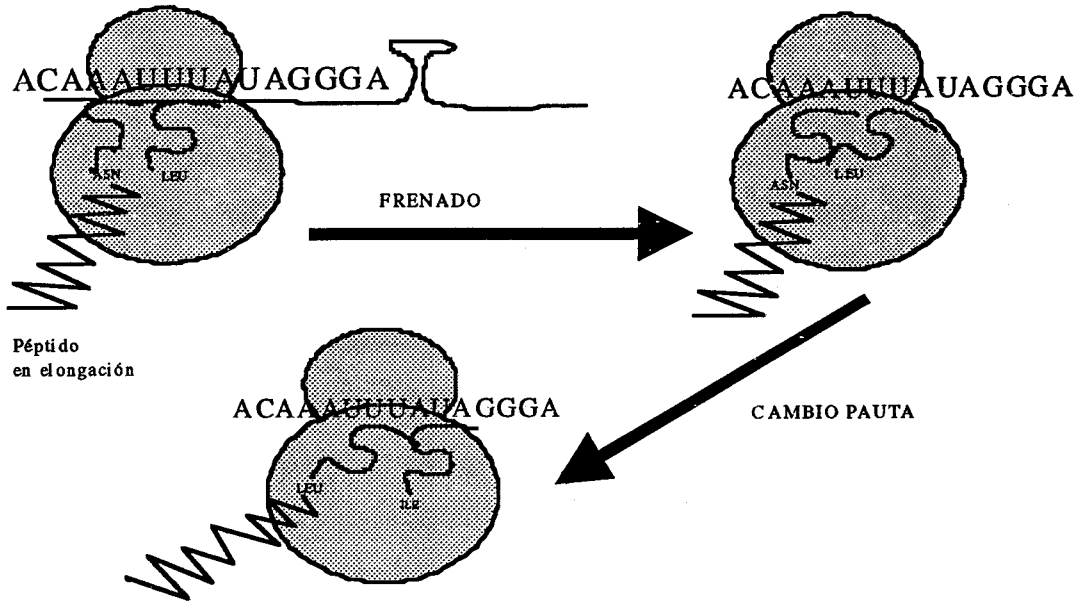


Figura 6: Proceso de frameshifting

El producto generado incluye poliproteínas de Gag y de Gag-Pol, la proteasa se encarga de liberar a cada una de las proteínas individuales que formarán la nueva progenie de viriones. Las proteínas de la envuelta se sintetizan a partir de un ARNm subgenómico específico y posteriormente se modifican postraduccionalmente mediante glicosilación N-dependiente y roturas proteolíticas. A continuación se produce la formación de los viriones y el empaquetamiento del ARNm genómico. Los viriones se liberan por gemación a partir de la membrana de la célula hospedadora, completándose el ciclo biológico del virus.

Patogénesis e historia natural de la infección por el HIV-1

Los linfocitos T CD4 son específicamente infectados y destruidos por el HIV-1, aunque se ha observado que otros tipos celulares pueden ser infectados: macrófagos, monocitos, células de Langerhans, linfocitos B, células de la microglía y células endoteliales. Muchos de estos tipos celulares son infectados pero no destruidos por el virus y pueden representar un reservorio de la infección. Virus infecciosos pueden ser aislados fundamentalmente a partir de sangre, semen, lágrimas y secreciones vaginales. El virus se transmite por vía sexual (bidireccionalmente), madre-hijo (antes y después del parto) y parenteralmente.

La historia natural de la infección por el HIV-1 puede dividirse en 3 fases, definidas por el nivel de linfocitos CD4 y manifestaciones clínicas.

Fase aguda:

Inicialmente el virus infecta a linfocitos T CD4 activados, macrófagos o células de la mucosa situadas cerca del lugar de entrada, produciendo en pocos días una infección aguda caracterizada por una masiva replicación viral que se refleja en la aparición de antigenemia para la proteína del core viral p25 en plasma y alta carga viral. El cuadro clínico se asemeja a una mononucleosis en el 30-70% de los casos, aunque frecuentemente pasa desapercibida. El virus se puede aislar tanto de suero como de líquido cefalorraquídeo. Los niveles de linfocitos T CD8 aumentan (al igual que ocurre con otras infecciones virales), los de linfocitos T CD4 disminuyen fuertemente, llegando a producir incluso una inmunodeficiencia transitoria, caracterizada por la aparición de algunas infecciones oportunistas como candidiasis esofágica. En este momento puede aparecer también una linfadenopatía moderada o severa, que ya se mantendrá persistente a lo largo de todo el curso de la enfermedad. Este periodo de la infección se caracteriza por una gran homogeneidad de la población viral. A lo largo de la infección

crónica se producirá una diversificación genética (deriva antigénica) debido a las presiones selectivas impuestas por el sistema inmunitario.

Fase crónica:

Después de tres o cuatro meses desde la infección primaria, el número de linfocitos T CD4 aumentan hasta alcanzar los niveles normales, pero esta recuperación es transitoria, lentamente la concentración de estas células irá disminuyendo a un ritmo de 25 a 60 células/ μ l por año. Generalmente en el espacio de unas semanas la carga viral se reduce significativamente como consecuencia de una potente respuesta inmune, encabezada por los linfocitos T CD8 y anticuerpos neutralizantes. La respuesta inmune humoral es fuerte, detectándose altos niveles de anticuerpos desde las 2 ó 3 semanas después de la exposición al virus. La glicoproteína de la envuelta es la proteína más antigénica, siendo los anticuerpos frente a estas los primeros en aparecer. También existe respuesta frente a otras proteínas tanto estructurales (p25) como reguladoras (Nef, ...).

Fase terminal (SIDA):

La fase terminal sintomática comienza normalmente cuando el número de linfocitos desciende por debajo de 300 por μ l. La carga viral se incrementa fuertemente, detectándose infección viral en órganos no linfoides como el cerebro, pulmón, colón o hígado. El estado general del individuo se degrada, apareciendo una fuerte caquexia, infecciones oportunistas, algunos tipos de tumores, trastornos neurológicos, etc... Es a partir de este momento cuando el paciente tiene un SIDA. La probabilidad de supervivencia a los 3 años del diagnóstico de SIDA no suele ser superior al 15-30%.

Paradójicamente, el grado de heterogeneidad de la población viral disminuye, unas pocas cepas virales se imponen desplazando al resto. Estas suelen tener unas propiedades biológicas diferentes con respecto a las cepas virales predominantes durante la infección persistente, tienen un tropismo celular expandido, alta velocidad de replicación y capacidad de formación de sincitios, fundamentalmente. Estas tres fases se representan en la figura 7.

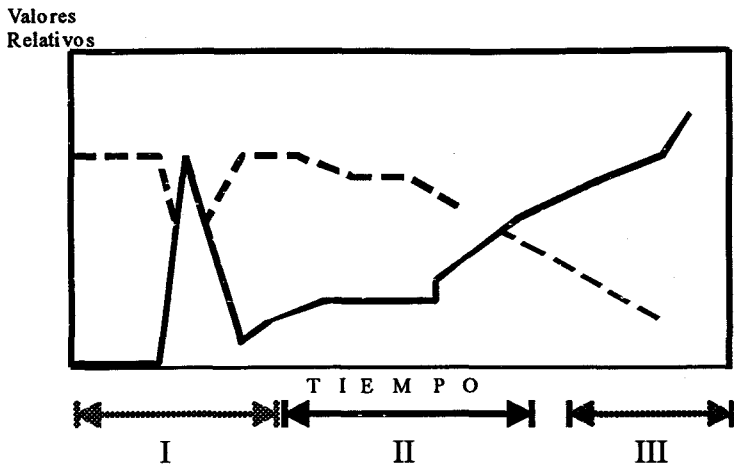


Figura 7: Fases de la historia natural de la infección por el HIV-1. I: aguda, II: crónica, III: terminal (SIDA). En línea continua está representada la antigenemia, y en discontinua los niveles de linfocitos CD4

Terapia antiviral

Los virus son organismos altamente evolucionados, aunque por su tamaño pudiese parecer lo contrario. Como parásitos obligados con un genomio limitado, están entre las formas de vida más eficientes y económicas. Debido precisamente a que utilizan de manera generalizada la maquinaria celular para replicarse, cuentan con muy pocas proteínas propias, en el caso del HIV-1 solamente son nueve. Con lo cual las posibilidades de actuación terapéutica se ven disminuidas con respecto a otros parásitos como las bacterias, las cuales dependen totalmente (salvo excepciones) de su propio genomio para organizar su metabolismo y replicación. El caso de los retrovirus es incluso más llamativo, ya que después de la integración del provirus en el genomio de la célula hospedadora, este pasa a comportarse como un gen celular. La célula y el virus han unido para siempre sus destinos, siendo muy difícil interferir con la replicación viral sin influir negativamente en la célula hospedadora. A pesar de que el abanico de posibilidades es reducido, en los últimos años se ha realizado un gran trabajo identificando algunas moléculas que inhiben específicamente al HIV-1. Las estrategias terapéuticas posibles están representadas en la tabla 2.

Actualmente sólo seis fármacos antirretrovirales pueden ser utilizados en clínica de forma rutinaria, bien solos o combinados entre ellos. Son los análogos de nucleósido inhibidores de la transcriptasa inversa AZT, DDI, DDC, D4T y 3TC, y también los inhibidores de proteasas saquinavir y ritonavir, figura 8.

Tabla 2: Terapias potenciales para la infección por el HIV-1

<i>Etapa</i>	<i>Tipo</i>	<i>Molécula</i>
Inhibidores de la retrotranscripción	Análogos de nucleósidos	AZT DDI DDC D4T 3TC
	No-nucleósidos	Foscarnet Loviride Nevirapina Delavirdina Etc...
Inhibidores de la fusión	Antagonistas CD4	rCD4 soluble rCD4+Toxina
	Antagonistas correceptores	Análogos de Rantes Análogos de SDF1
Inhibidores de la integración	Inhibidores integrasa	
Inhibidores de la expresión ARNm y producción proteínas virales	Inhibidores tat	
	Inhibidores proteasa	Saquinavir Ritonavir Indinavir
	Otros	Oligonucleótidos antisentido Ribavirina Alfa interferón Ribozimas
Potenciadores de la respuesta inmunitaria	Interleukinas	rIL-2
	Factores estimuladores colonias	rHuEPO G-CSF

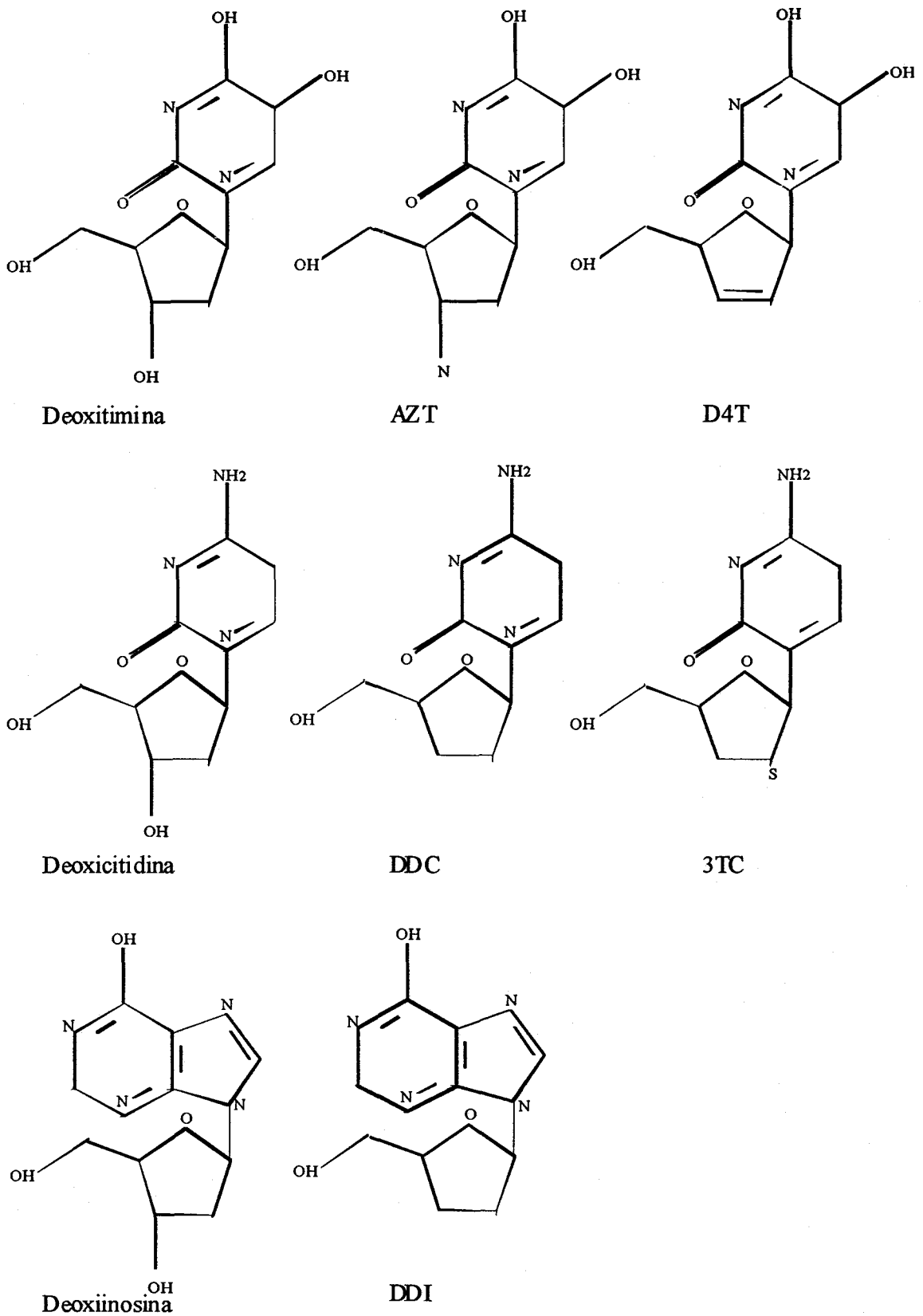


Figura 8: Estructura química de los nucleótidos deoxitimiina, deoxicitidina y deoxiinosina y algunos de sus análogos utilizados como fármacos antivirales.

La transcriptasa inversa y los dideoxínucleósidos

La transcriptasa inversa presenta tres actividades enzimáticas distintas: ADN polimerasa ARN dependiente, ribonucleasa H, y ADN polimerasa dependiente de ADN. La transcriptasa inversa del HIV-1 es un heterodímero formado por dos subunidades distintas p66 y p51, con un extremo N-terminal de 440 aminoácidos común. Ambas contienen el dominio polimerasa. El fragmento C-terminal (ribonucleasa H) es eliminado en p51, figura 9.

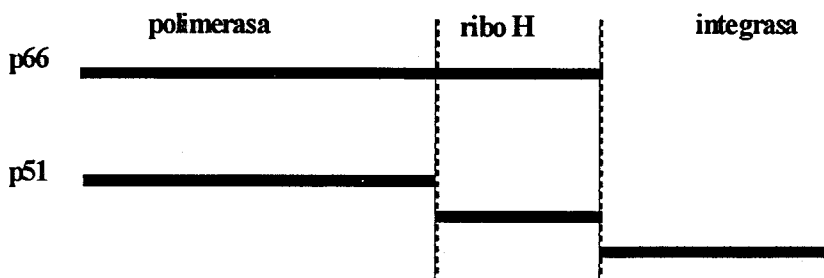


Figura 9: Dominios y relación de subunidades de la transcriptasa inversa y la integrasa

El papel de cada subunidad ha sido estudiado reconstituyendo “in vitro” el heterodímero y en el cual una de las dos subunidades está mutada en los sitios catalíticos. Estos experimentos sugieren que p51 no influye de manera fundamental en la procesividad del enzima, siendo su función de mantenimiento de la estructura adecuada para la actividad catalítica. La mutación de p66 bloquea totalmente la actividad enzimática. La estructura tridimensional ha sido descrita (1), la región polimerasa se divide en 4 subdominios denominados *finger*, *palm*, *thumb* y *connection*, figura 9.

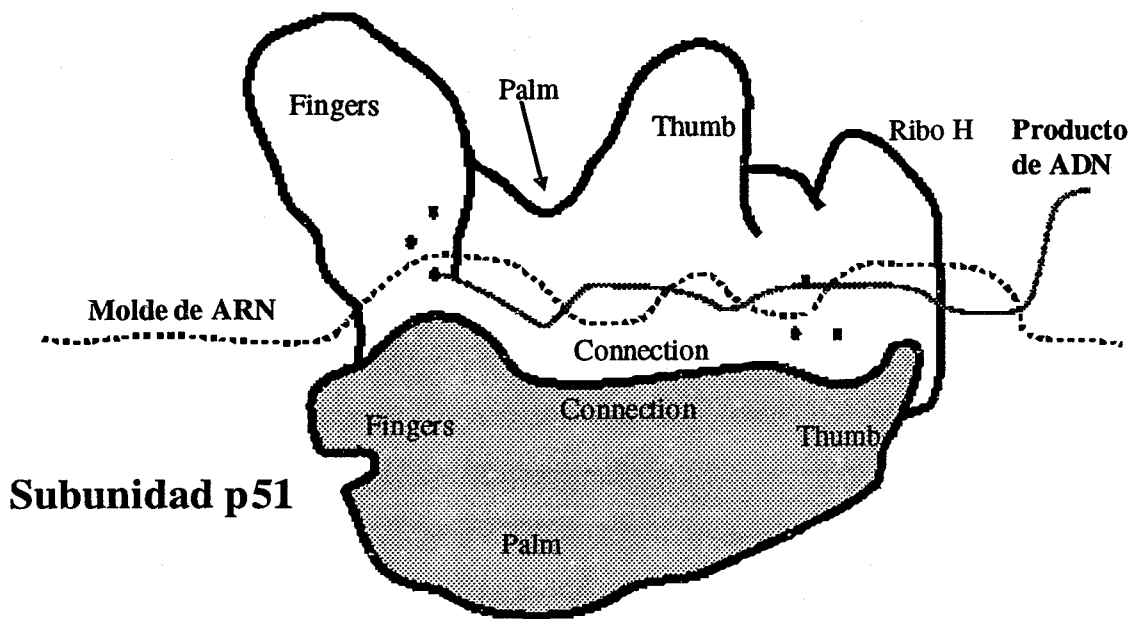


Figura 9: Estructura de la transcriptasa inversa del HIV-1 con sus dominios funcionales. Los dos grupos de círculos representan los residuos altamente conservados, componentes de los dos sitios activos. El grupo de la derecha se corresponde con los residuos D110, D185, D186.

En p66, *finger*, *palm* y *thumb* forman un hueco donde presumiblemente se une el cebador y el molde. La ordenación de p66 muestra cierta homología con la región polimerasa del fragmento Klenow de *E.coli* y con la ARN polimerasa de T7. La unión de p66 y p51 ocurre a lo largo de la zona *connection*. Comparaciones de secuencias de proteínas frecuentemente revelan aminoácidos conservados que son fundamentales para la actividad del enzima. Hay dos motivos comunes a todas las polimerasas, ya sean de ADN o ARN, son aspárticos embebidos en una región hidrofóbica, se denominan motivos A y B. Otro motivo fundamental es la secuencia YXDD (motivo C). En las enzimas retrovirales, los motivos A y C se corresponden con los aminoácidos D110, D185 y D186. Estos residuos parece que funcionan uniendo los iones metálicos, unión a los dNTPs o actuando en la catálisis. Alineamientos de transcriptasas inversas virales han mostrado que existen otros dominios específicos conservados entre los retrovirus, y que están situados fundamentalmente en el extremo N-terminal de la región polimerasa. Otros dominios importantes en la actividad del enzima son los de unión al cebador. En el HIV-1 funciona como tal el ARN t de Lys 3, la zona implicada se correspondería con los aminoácidos 288-307.

Los análogos de los nucleótidos modificados en el azúcar o en la base nitrogenada son reconocidos por las ADN polimerasas e incorporados en la cadena en síntesis de ADN, pero bloquean la posterior elongación de la cadena o interfieren con el correcto funcionamiento del ADN. Dentro de estos análogos se sitúan los terminadores de la síntesis, los 2'3'dideoxiribonucleósidos que al ser trifosforilados por la maquinaria enzimática celular pueden ser incorporados al ADN, y debido a que carecen de un grupo OH en el extremo 3' impiden la incorporación de nuevos nucleótidos. Algunas de estas moléculas son potentes inhibidores de la replicación del HIV-1, bloqueando la acción de la transcriptasa inversa. El primer dideoxinucleósido utilizado fue el 3'azido 2'3'dideoxitimidina (AZT), compuesto sintetizado en 1964 por Horwitz *et al* () como potencial droga antitumoral. Posteriormente se observó que inhibía la replicación in vitro de los retrovirus del tipo C (), sin embargo no se encontró aplicación a esta molécula hasta que en el año 1985 Mitsuya *et al* () descubrieron que el AZT inhibía la replicación in vitro del HIV-1. Dependiendo del tipo de ensayo y la línea celular utilizada el AZT podía inhibir la replicación a concentraciones de 0,01-10 μM (). Esta molécula es un análogo de la timina, que difiere de esta en que un grupo azida (N_3) sustituye al grupo OH en el átomo 3' del anillo de ribosa, figura 8. El AZT entra en la célula por difusión pasiva y es fosforilado por tres quinasas celulares hasta la forma activa trifosforilada. En el primer paso la timidina quinasa fosforila al AZT hasta AZT monofosfato, el segundo paso está más limitado e implica al enzima timidilato quinasa. Por último la pirimidina nucleósido difosfato quinasa da lugar al compuesto trifosforilado activo. La tasa de transformación del AZT hasta el compuesto trifosforilado depende del tipo celular, el nivel citoplasmático de AZT-3P determina la capacidad de inhibición de la replicación del HIV por el AZT. El AZT inhibe la transcriptasa inversa entre 50 a 100 veces más eficientemente que a las ADN polimerasas alfa y beta humanas. Sin embargo la ADN polimerasa gamma (mitocondrial) es inhibida a concentraciones tan bajas como $1\mu\text{M}$, estas concentraciones son alcanzadas in vivo y como consecuencia se puede producir una disfunción mitocondrial. Este efecto se manifiesta fundamentalmente en una miopatía del músculo esquelético y ocasionalmente del miocardio. Eficacia clínica del AZT, pendiente de alguna bibliografía de Manolo.

El otro dideoxinucleósido más ampliamente utilizado en la práctica clínica es el 2'3'dideoxiinosina (DDI), un análogo de la inosina. El metabolito intracelular es la 2'3'dideoxiadenosina, por ello actúa como un competidor con el dATP en la síntesis de ADN. El DDI entra en la célula por difusión pasiva, donde posteriormente será transformado por la 5'nucleotidasa en DDI monofosfato, el cual se transformará en 2'3'dideoxiadenosina monofosfato por la acción de la adenilsuccinato sintetasa-liasa. Dos fosforilaciones posteriores darán lugar a la dideoxiadenosina trifosfato (DDA-3P) que es la forma activa del DDI. Este compuesto es un potente inhibidor de la transcriptasa inversa del HIV-1 actuando de la misma manera que el AZT. Una característica importante del metabolismo del DDI es que las enzimas que lo transforman en el compuesto activo permanecen constantes a lo largo de todo el ciclo celular. El AZT es transformado hasta el compuesto activo sólo en células en división, la timidina quinasa es activa exclusivamente en la fase S de la división celular. El DDI afecta poco a las ADN polimerasas eucarióticas, pero si inhibe la síntesis de ADN por la ADN polimerasa mitocondrial, como consecuencia puede producir neurotoxicidad.

Eficacia clínica del DDI: Pendiente de alguna bibliografía de Manolo

Desarrollo de resistencias al AZT y DDI

La resistencia a los análogos de nucleósidos se desarrollan después de un tratamiento prolongado. La tabla 3 muestra la localización de algunas mutaciones de resistencia a estos compuestos. La resistencia cruzada no es frecuente entre los análogos de nucleósidos, exceptuando, L74V y V75T confieren resistencia al DDI y DDC (), y M184V produce resistencia cruzada a DDI, DDC y 3TC (). El patrón de mutaciones de resistencia suele ser específico de cada compuesto. La base molecular de la resistencia de las proteínas mutantes no está muy clara, fundamentalmente debido a que no hay un modelo tridimensional de alta resolución de la transcriptasa inversa unida al cebador-molde, análogo de nucleósido o a los diferentes dNTP. Las mutaciones de resistencia no se centran en el sitio de unión a los dNTP, están dispersadas a lo largo del subdominio *finger*. Algunos estudios () sugieren que la resistencia resulta de la influencia de la cadena lateral del aminoácido mutado en la capacidad

del enzima de seleccionar o rechazar los dNTPs. Otras mutaciones como I135T, se sitúan en la zona de contacto entre las dos subunidades siendo el dominio p51 el afectado por la mutación.

Tabla 3: Mutaciones de resistencia de la transcriptasa inversa a los análogos de nucleósidos.

Mutación	AZT	DDI	DDC	3TC	D4T
M41L	+				
I50T					+
K65R			+		
D67N	+				
T69D			+		
K70R	+				
L74V	*	+	+		
V75T		+	+		
M184V	*	+	+	+	
Y215C			+		
T215F/Y	+				
K219Q/E	+				

* Mutaciones que suprimen la resistencia al AZT de la mutación T215Y

Un aspecto intrigante de la resistencia a los análogos de nucleósidos reside en que mutaciones de resistencia frente a un compuesto pueden suprimir la resistencia frente a otra droga. Por ejemplo, la mutación L74V de resistencia al DDI, puede revertir el fenotipo resistente al AZT de la mutación T215Y (). Los mecanismos de supresión de la resistencia primaria no son conocidos, pero pueden ser debidos a efectos compensatorios de cierta combinación de mutaciones en el sitio de unión del cebador-molde. La selección de genotipos mutantes durante el tratamiento puede llegar a desplazar completamente a las cepas silvestres y parece que está asociada con una pérdida de eficacia clínica.

Materiales y Métodos

Tampones y soluciones

Tampón PBS

Disolver 8 g de NaCl, 0,2 g de KCl, 14,4 g de Na₂HPO₄ en 800 ml de agua, ajustar el pH a 7,4 con HCl y añadir agua hasta 1 litro. Dispensar la solución en alícuotas y esterilizarlas por autoclavado.

Tampón TE (pH 7,4)

10 mM de Tris-HCl pH 7,4; 1 mM EDTA pH 8.

Solución BE

Guanidina tiocianato 4,2 M; n-Lauroil sarcosina sódica 0,5%; Tris-HCl 25 mM pH 7,4; Beta-mercaptoetanol 0,7 M.

Solución BEF (solución madre 10X)

Tris-HCl pH 8,0 1 M; EDTA 0,1 M; SDS 10%.

Solución lisis para extracción de ARN celular

Tris HCl 10 mM (pH 7,5); NaCl 0,14 mM; KCl 5 mM; Tritón X-100 1%.

Agua destilada-DEPC

Añadir 1 µl de DEPC por cada 100 ml de agua destilada, agitar fuertemente; incubar 1 hora a 37 °C y autoclavar.

Tampón TAE (50X)

Tris-Cl 242 g (2 M); Acético glacial 57,1 ml; EDTA 0.5 M (pH 8) 100 ml y completar con agua hasta 1 l.

Tampón de carga de electroforesis en agarosa (6X)

Azul de bromofenol 0,25 % y 15 % de ficoll 400 (Pharmacia).

Tampón de PCR

Tris-HCl, 10 mmol/l; MgCl₂, 15 mmol/l; KCl 500 mmol/l; gelatina 1 mg/ml; pH 8,3.

Solución de bromuro de etidio

Bromuro de etidio a 0,5 µg/ml

Solución de desoxiribonucleótidos para PCR

dATP, dCTP, dGTP y dTTP a 10 mM

Tampón de síntesis de ADN complementario (ADNc)

KCl 500 mM; Tris-HCl 100 mM pH 8,3.

Medio de cultivo LB-Ampicilina para E.coli (500ml)

Bactotripton 5 g, extracto levadura 2,5 g, NaCl 5 g, ajustar el pH hasta 7,5 con NaOH. Añadir agar 7,5 g y agua hasta 500 ml. Autoclavar y añadir la ampicilina cuando la temperatura del frasco baje hasta 60 °C, el antibiótico va a una concentración de 100 µg/ml.

Medio de cultivo SOC para E.coli (100 ml)

Tripton 2 g; extracto de levadura 0,5 g; NaCl 0,05 g; 1 ml de KCl 250 mM; añadir 90 ml de agua y ajustar el pH a 7, llevar hasta 100 ml con agua destilada y autoclavar. Justo antes de usar añadir 0,5 ml de una solución estéril de MgCl₂ 2M (19 g de MgCl₂ en 100 ml de agua), y 2 ml de una solución de glucosa estéril 1 M (por filtración con filtros Millipore de un poro de 0,22 µm).

Soluciones para el aislamiento de ADN plasmídico

Solución I: 50 mM glucosa, 25 mM Tris-HCl (pH 8), 10 mM EDTA.

Soluciones para la purificación de ADN plasmídico por cromatografía de intercambio iónico (Quiagen)

P1: ARN-asa 100 µg/ml; Tris-HCl 50 mM; EDTA 10 mM (pH 8,0) y almacenar a 4°C.

P2: NaOH 200 mM; SDS 1 %

P3: Acetato potásico 2,55 M pH 4,8

QBT: NaCl 750 Mm; MOPS 50 mM; etanol 15 % ajustar el pH a 7,0 y añadir tritón x-100 hasta el 0,15 %.

QC: NaCl 1 M; MOPS 50 mM; Etanol al 15 % ajustar el pH a 7,0

QF: NaCl 1,25 M; MOPS 50 mM; Etanol 15 % ajustar el pH a 8,2

Tampón TBE(10X)

Tris 1 M, 0,83 M de ácido bórico y 10 mM de EDTA. Esta solución nunca ha de ser autoclavada.



Geles de acrilamida para secuenciación de alta resolución

Acrilamida/bisacrilamida 29:1 (premezclada y prepesada, Biorad) 11 ml, TBE 10X 6 ml, Urea (Alf grade, Pharmacia) 21 g. Disolver en agua hasta 50 ml y filtrar a través de un poro de 0,22 µm. Después desgasificar utilizando una bomba de vacío. En el momento de cargar las placas de secuenciación añadir a esta solución 40 µl de TEMED y 150 µl de persulfato amónico al 10 %.

Geles de acrilamida de secuenciación normal

Solución A: Urea 137,5 g en 150 ml de agua desionizada, disolver 61 g de acrilamida/bisacrilamida 19:1 (Biorad), añadir 2 cucharadas de la resina Amberlita MB-1 (Pharmacia), agitar lentamente durante 3 horas y dejar a 4 °C durante toda la noche.

Solución B: Disolver 225 g de urea en 500 ml de agua. Añadir 2 cucharadas de Amberlita MB-1 agitar lentamente durante 3 horas y guardar a 4 °C durante toda la noche.

Ambas soluciones han de ser filtradas al vacío para eliminar la resina y almacenadas a 4 °C hasta su uso.

Solución de acrilamida 6 %-urea 7 M: Mezclar 24 ml de solución A y 51,2 ml de solución B, añadir 4,8 ml de TBE 10X y filtrar la solución mediante una bomba de vacío para desgasificar

la mezcla. Trasvasar la solución a un vaso de precipitados y añadir 70 ml de TEMED y 280 ml de persulfato amónico al 10 %, agitar suavemente y cargar las placas de secuenciación con una jeringuilla. El gel ha de polimerizar en un tiempo de 15 minutos y se puede cargar a las 2 horas.

Solución de bind silane para geles de secuenciación

Etanol 2 ml; 7,5 μ l de bind silane (Pharmacia) y 0,5 ml de ácido acético al 10 %.

Buffer de secuenciación 5X (Kit de secuenciación femtomol de Promega)

Tris-HCl (pH 9,0) 250 mM, MgCl₂ 10 mM

Solución de parada de secuenciación

Formamida desionizada 95 %, azul de dextrano 0,05 %, NaOH 10 mM

Composición de las mezclas de dideoxynucleótidos de secuenciación

Componente	Deaza mezcla nucleótidos	G de de nucleótidos	A mezcla de nucleótidos	T mezcla de nucleótidos	C mezcla de nucleótidos
ddGTP	30 μ M				
ddATP		350 μ M			
ddTTP			600 μ M		
ddCTP				200 μ M	
dGTP	20 μ M	20 μ M	20 μ M	20 μ M	20 μ M
dATP	20 μ M	20 μ M	20 μ M	20 μ M	20 μ M
dTTP	20 μ M	20 μ M	20 μ M	20 μ M	20 μ M
dCTP	20 μ M	20 μ M	20 μ M	20 μ M	20 μ M

Oligonucleótidos de amplificación de ADN por PCR y de secuenciación

Diana	Secuencia (5'→3')	Referencia
Gen <i>gag</i> del HIV-1	SK104 CCTTTGGTCCTTGCTTATGTC SK145 AGTGGGGGGACATCAAGCAGCCATGCAAAT SK38 ATAATCCACCTATCCCAGTAGGAGAAAT SK39 TTTGGTCCTTGCTTATGTCCAGAATGC	D.Kellogg and Kwok, Detection of HIV virus. PCR protocols methods and applications. Ed M. Innis; D. Gelfand; J Sninsky and T. White; Academic Press Inc, San Diego California (1990).
Gen <i>nef</i> del HIV-1	SE30 TTCGCCACATACCTAGAAGAATAAGA SE31 AGGGAGGCGTGGCCTGGGCGGG SE32 TTGCTATAAGATGGGTGGCAAGTGG SE33 GAGCTTGCTACAAGGGACTTTC	
Gen <i>pol</i> del HIV-1 Determinación de mutaciones de resistencia a AZT y DDI	NE-1(35) CCTACTAACTTCTGTATGTCATTGACAGTCCAGCT A (35) TTGGTTGCACITTAATTTTCCCATTAGTCCATT SE1 TTCCCATTAGTCCATT SE2 TCATTGACAGTCCAGCT SE3 GGATGGAAAGGATCACC SE4 ATGTTTTTCTCTGGTGTGGT SE5 ATGTTTTTGTCTGGTGTGAA	BA Larder <i>et al</i> , AIDS 1991, 5; 137-144
Gen <i>pol</i> del HIV-1 Codones 28-247 de la transcriptasa inversa (en cursiva sitios de unión de <i>M13</i>)	POL1 TGTA AACGACGGCCAGT GT TAAACAATGGCCATTGACAG POL2 GCAGGAAACAGCTATGACC ACAGTCCAGCTGTCTTTTTCTGG	Esta tesis
Oligonucleótidos de secuenciación de <i>M13</i>	Forward TGTA AACGACGGCCAGT Reverse GCAGGAAACAGCTATGACC	

Métodos de Biología Molecular

Extracción de ADN genómico humano

Se utilizó el kit de extracción de ADN de la marca REAL, que contiene: tampón de lisis, enzima proteolítica, solución de extracción (con fenol), solución salina, tampón de dilución y tubos con un polímero de silicagel. Además se necesita alcohol etílico absoluto y al 70 %, agua bidestilada, PBS y tampón TE (pH 7,4).

Se partió de muestras de linfocitos congeladas en nitrógeno líquido, que eran descongeladas a 37 °C. Se centrifugaban a 12000 rpm durante 5 min, y se resuspendía el precipitado en 1 ml de PBS. Se lavaban dos veces con 1 ml de PBS, centrifugando la muestra a 12000 RPM 30 s. Posteriormente se centrifugaba 1 min a 12000 rpm, se resuspendía el precipitado en 180 µl de tampón de dilución. Se añadía 200 µl de tampón de lisis y la mezcla se pasaba a un tubo con polímero, el cual se agitaba suavemente y se añadía 20 µl de solución con enzima proteolítica. Tras incubar a 65 °C durante 1-2 horas, se añadía 400 µl de solución de extracción con fenol. Se centrifugaba durante 1 min a 12000 rpm, tomándose la fase acuosa. A continuación se precipitaba el ADN añadiendo la mitad del volumen de solución salina y 1 ml de etanol absoluto frío. Se incubaba a -20°C durante 30 min. Las muestras eran entonces centrifugadas 20 min a 14000 rpm. Tras decantar el sobrenadante y se lavaba con 1 ml de etanol al 70 %. Y se secaba al vacío. El ADN se resuspendía en 200 µl de tampón de dilución, y se trataba con ARN-asa pancreática a una concentración de 20 µg/ml a 37 °C durante 30 min. Después se eliminaba el exceso de proteína mediante una extracción con fenol, para ello tratabamos con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (450 µl) y después con cloroformo-alcohol isoamílico. A diferencia de las anteriores no se usaban tubos con polímero y las centrifugaciones serán de 15 min. El ADN se volvía a precipitar añadiendo 1/10 del volumen de acetato sódico 3 M (pH 5.2) y dos volúmenes de etanol absoluto frío, incubando a -20 °C y lavando como en la precipitación anterior.

A continuación, se cuantificaba y determinaba la pureza del ADN mediante espectrofotometría a 260 nm y 280 nm.

Los materiales necesarios son: medio LB+ampicilina, soluciones de extracción I, II, III, fenol-cloroformo-isoamilalcohol(25/24/1), cloroformo-Isoamilico (24/1), etanol 100%, TE y ARN-asa.

El método consiste en: tomar 1,5-3 ml de cultivo bacteriano en LB+ampicilina y centrifugar 1 min a 14000 rpm, decantando el sobrenadante a continuación. Se resuspenden las células en el volumen residual, se añaden 100 µl de solución I y se incuba 5 min en hielo. A continuación se añade 200 µl de solución II incubándose 5 min en hielo, y se añade 150 µl de solución III incubándose como mínimo 15 min en hielo. Se mezclaba con 450 µl de fenol-cloroformo-isoamilalcohol, se agitaba fuertemente y centrifugaba 5 min a máxima rpm. Posteriormente se extraía el fenol con 450 µl de cloroformo-isoamílico, seguido de agitación fuerte y centrifugación 1 min a 14000 rpm. Se toma la parte acuosa y se precipitaba el ADN con 1ml de etanol al 100%, resuspendiendo finalmente en 250 µl de TE+1 µl de ARNasa (20 µg/ml) e incubando 30 min a 37 °C.

Purificación de ADN plasmídico por cromatografía de intercambio iónico (Quiagen)

El material necesario incluye: medios de cultivo bacteriano LB y Soc, tampones P1, P2, P3, QBT, QC, QF y TE y columnas de silicagel de Quiagen.

En este método se parte de 3 ml de cultivo bacteriano, se centrifuga y el precipitado se resuspende en 300 µl de tampón P1, se añade 300 µl de tampón P2 se mezcla muy suavemente y se incuba a temperatura ambiente 5 min, se añade 300 µl de tampón P3, y se centrifuga a 4°C durante 15 min a 14000 rpm. El sobrenadante se añade a una columna de Quiagen equilibrada con 1 ml de tampón QBT. La columna se lava 4 veces con 1 ml de tampón QC y se eluye el ADN con 800 µl de QF, forzando la salida del resto del tampón con una pipeta. El ADN es precipitado con 0,5 volúmenes de isopropanol tras lo cual se centrifuga 30 min a 14000 rpm. Se decanta con cuidado, intentando no alterar el precipitado que se ha formado en el fondo del tubo de centrifuga. Se lava el precipitado con etanol al 70 % al menos 3 veces, los restos de

etanol que puedan permanecer se eliminan por evaporación durante 10 min a temperatura ambiente. El ADN es finalmente resuspendido en un volumen adecuado de agua o tampón TE.

Extracción de ADN de un gel de agarosa (método A)

Se utilizó el kit de “genclean” de la marca BIO 101 Inc, que contiene: NaI (1M), glassmilk y new wash; además es necesario tampón TE.

Después de separar por electroforesis la banda de ADN del peso molecular adecuado, se cortaba dicha banda con un bisturí limpio, el trozo de agarosa se incubaba con el doble de su peso de NaI a 55 °C hasta que la agarosa se fundía completamente. A continuación se añadía 7 µl de glassmilk, se agitaba fuertemente y centrifugaba 1 min a 14000 rpm. Se decantaba el sobrenadante y se lavaba 3 veces con 1 ml de new wash, para ello se resuspendía el precipitado con new wash y se centrifugaba 1 min a 14000 rpm, decantando el sobrenadante. El ADN se extraía finalmente del glassmilk con 10 µl de TE a 55 °C durante 5 min. Se centrifugaba 1 min a máxima rpm y se separaba el sobrenadante conteniendo el ADN. La extracción con el TE se repetía una vez más y se cuantificaba por electroforesis el rendimiento de la extracción.

Purificación de ADN amplificado por PCR (Método A)

Se aplicaba cuando el producto de PCR no estaba contaminado con amplificaciones inespecíficas. Se utilizó el kit de purificación de fragmentos de PCR “Wizard’s PCR preps” de Promega, necesitándose además isopropanol 80% y jeringuillas de 2 ml.

El método consiste en añadir al producto de PCR (100 µl aproximadamente) 100 µl de solución de extracción (Promega) y 1 ml de resina (Wizard’s DNA purification resin de Promega, que contiene guanidina tiocianato). Se Agita y dispensa el contenido dentro de unos filtros que retienen la resina utilizando para ello jeringuillas de 2 ml. Los contaminantes se eliminan mediante lavados de las columnas con isopropanol al 80 %. El ADN se eluye de las columnas con 50 µl de agua o tampón TE mediante centrifugación 20 s a 14000 rpm. A continuación, se precipita el ADN con etanol al igual que en métodos anteriores. El ADN

finalmente ser resuspende en 13 μ l de agua. Se utilizaban 3 μ l para verificar la concentración de ADN por electroforesis en agarosa.

Purificación de ADN amplificado por PCR (Método B)

Se empleaba cuando el producto amplificado está contaminado por bandas de peso molecular distintos del ADN problema. La base del método es la misma que en el protocolo anterior, sólo que se aísla la banda de ADN del peso molecular exacto mediante un paso previo de electroforesis en gel de agarosa de bajo punto de fusión.

El método consiste en separar el ADN amplificado en agarosa de bajo punto de fusión al 1 %, cortar la banda de ADN del peso molecular adecuado usando un bisturí limpio. Transferir la banda a un tubo de 1,5 ml e incubar a 70 °C hasta que la agarosa esté fundida. Entonces se añadía 1 ml de resina Wizard's y se mezclaba durante 20 s. La mezcla se introducía en una columna de purificación y se procedía como en el método A.

Extracción de ARN celular

Se necesitan las siguientes soluciones: BE, BEF, fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25/24/1), isopropanol, acetato sódico 3 M (pH 5,2), dextrano (10 mg/ml) agua-DEPC, PBS, tampón de lisis para extracción de ARN.

Se descongelan las células a 37°C y se pasan a hielo. Se lavan las células con PBS frío, para ello se centrifuga a 14000 rpm 5 min y se elimina el sobrenadante. Después se transfieren a un tubo de centrifuga y se mantiene en hielo. Las células se resuspenden en 200 μ l de tampón de lisis. Se centrifuga durante 1 min a 14000 rpm y se transfiere el sobrenadante a un nuevo tubo con: 400 μ l de BE, 50 μ l de BEF y 500 μ l de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico. Se incuba a 65 °C durante 30 min, se centrifuga 10 min a 14000 rpm y se transfiere el sobrenadante a un nuevo tubo con 500 μ l de cloroformo-alcohol isoamílico. Se centrifuga 10 min a 14000 rpm y se pasa el sobrenadante a un tubo con 50 μ l de acetato sódico 3 M (pH 5,2), 2 μ l de dextrano, y 500 μ l de isopropanol. Se deja precipitando toda la noche a -20 °C. Y

se centrifuga durante 15 min a 14000 rpm, se lava el precipitado con 1 ml de etanol al 70 %. Finalmente se seca al vacío y se resuspende en 9 μ l de agua-DEPC.

Extracción de ARN de suero plasmático

Es un protocolo más corto que el anterior, a 200 ml de suero (como máximo) se añade la solución de BE, BEF y fenol-cloroformo-isoamílico, y se continúa del mismo modo que el protocolo anterior.

PCR nested del gen *gag* de HIV-1

Los materiales necesarios son: desoxinucleótidos trifosfato 10 mM (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), oligonucleótidos de la zona *gag* SK104, SK145, SK38, SK39 (los dos primeros corresponden a la primera amplificación y SK38 y SK39 a la segunda, diluidos a 100 pmoles/ μ l), $MgCl_2$ 25 mM, Taq polimerasa (5 unidades/ μ l), agarosa multipurpose (Boehringer Mannheim), tampón de PCR 10X y ADN a una concentración de 50 ng/ μ l.

La mezcla de reacción de la primera amplificación consiste en: agua 29.75 μ l tampón PCR 10X 5 μ l, dNTP 2 μ l, SK104 y SK145 0,5 μ l, $MgCl_2$ 25 mM 2 μ l, Taq ADN polimerasa 0,25 μ l y 10 μ l de ADN.

Los ciclos de PCR son:

95 °C 5 min
35 ciclos de 95 °C 30 s, 45 °C 30 s, 72 °C 1 min
72 °C 10 min
4 °C indefinidamente

La mezcla de reacción para la segunda amplificación tiene: agua 38,75 μ l tampón PCR 5 μ l, dNTP 2 μ l, SK38 y SK39 0,5 μ l, $MgCl_2$ 25 mM 2 μ l, Taq ADN polimerasa 0,25 μ l y 1 μ l del producto de la primera amplificación.

Los ciclos de PCR son:

95 °C 5 min.
30 ciclos de 95 °C 30 s, 52 °C 30 s, 72 °C 60 s
72 °C 10 min
4 °C indefinidamente

El resultado de la amplificación se visualiza por electroforesis en agarosa “Multipurpose” de Boehringer Mannheim al 4%. Las muestras positivas dan lugar a una banda de ADN de 115 pares de bases.

PCR nested del gen *nef* del HIV-1

Los materiales necesarios son los mismos que en el protocolo anterior exceptuando los oligonucleótidos que son: SE30, SE31, SE32, SE33.

La mezcla de reacción de la primera amplificación consiste en: agua 27,5 µl tampón PCR 10X 5µl, dNTP 2 µl, SE30 y SE31 0,5 µl, MgCl₂ 25 mM 4 µl, *Taq* ADN polimerasa 0,5 µl y 10 µl de ADN.

La reacción de PCR se ejecuta según los siguientes ciclos:

95 °C 5 min
35 ciclos de 95 C 1 min, 57 C 1 min, 72 C 2 min
72°C 10 min
4°C indefinidamente

La mezcla de reacción de la segunda amplificación lleva: agua 36,5 µl, tampón PCR 5 µl, dNTP 2 µl, SE32 y SE33 0,5 µl, MgCl₂ 25 mM 4 µl, *Taq* ADN polimerasa 0,5 µl y 1 µl de ADN de la primera amplificación. La reacción de PCR se ejecuta según los mismos ciclos que la primera. Los resultados de la amplificación se revelan por electroforesis en agarosa “Multipurpose” de Boehringer Mannheim al 2 %. Las muestras positivas dan lugar a una banda de ADN de 660 pares de bases aproximadamente.

Detección por PCR de la mutación T215Y de la transcriptasa inversa del HIV-1

Se utilizan los oligonucleótidos NE1, A35, SE3 (común para genotipos silvestres y mutantes), SE4 (específico para silvestre) y SE5 (específico para mutante).

La detección se realizaba mediante una PCR nested en la que en la primera PCR se amplifica un fragmento de 800 pb aproximadamente del gen *pol* que codifica para la transcriptasa inversa. La mezcla de reacción está formada por: agua 61,5 μ l, tampón PCR 10 μ l, dNTP 2 μ l, A35 y NE1 1 μ l, $MgCl_2$ 25 mM 4 μ l, *Taq* ADN polimerasa 0,5 μ l, glicerol 10 μ l y 10 μ l de ADN (50 ng/ μ l). Se amplifica según los siguientes ciclos:

95 °C 3 min
35 ciclos de 90°C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 1 min
72 °C 10 min
4 °C indefinidamente

El resultado de la segunda reacción de PCR permite determinar el genotipo viral en el codón 215 de la transcriptasa inversa, para cada determinación de genotipo se realizan dos PCR, una utilizando un oligonucleótido que permite la amplificación del genotipo silvestre y otro oligonucleótido específico para el mutante. Ambas reacciones comparten un oligonucleótido común situado en dirección 5'. Debido a que altas concentraciones de ADN la amplificación no discrimina los distintos alelos, frecuentemente es necesario diluir el ADN de partida procedente de la primera amplificación (usualmente entre 1 y 1000 veces) hasta conseguir que se pierda la banda en una de las dos versiones, la silvestre o la mutante. Por lo tanto el diagnóstico definitivo del genotipo se determina observando con que oligonucleótido se produce amplificación al diluir el ADN de partida suficientemente. Si la amplificación desaparece con ambos oligonucleótidos simultáneamente, se considera que existe una mezcla de virus con ambos genotipos.

La mezcla de reacción de la segunda amplificación es: agua 41,5 μ l, tampón PCR 10X 5 μ l, dNTP 1 μ l, SE3 (común) y SE4 (silvestre) ó SE5 (mutante) 0,5 μ l, *Taq* ADN polimerasa 0,5 μ l, y 1 μ l de ADN de la primera amplificación (diluido o no).

Los ciclos de amplificación son los siguientes:

95 °C 5 min
30 ciclos de 95 °C 1 min, 45 °C 30 s, 72 °C 30 s
72 °C 10 min
4 °C indefinidamente

Detección por PCR de la mutación V74L de la transcriptasa inversa del HIV-1

Se utilizan los oligonucleótidos A35, EN1, SE6 (común), 74W (silvestre) y 74M (mutante). Se realiza utilizando una estrategia similar al protocolo anterior. La primera amplificación es la misma sólo cambia la segunda que es específica del codón 74.

La mezcla de reacción de esta es: agua 34,5 µl, tampón PCR 10X 5 µl, MgCl₂ 25 mM 7 µl, dNTP 1 µl, SE1 (común) y 74W (silvestre) ó 74M (mutante) 0,5 µl, *Taq* ADN polimerasa 0,5 µl, y 1 µl de ADN de la primera amplificación (diluido o no). Los ciclos también son iguales a los de la segunda amplificación para la detección de la mutación en el codón 215 de la transcriptasa inversa.

PCR para la amplificación del gen pol del HIV-1

PCR de ARN

Los materiales necesarios son: reactivos de PCR (protocolos anteriores), ARN extraído según los protocolos de extracción de ARN de células o suero, retrotranscriptasa de AMV (virus de la amieloblastosis aviar, Boehringer Mannheim), inhibidor de ARN-asa de placenta humana (Boehringer Mannheim), hexanucleótidos de secuencia aleatoria que sirven como oligonucleótidos cebadores y tampón de ADNc.

Se calienta el ARN a 70 °C durante 10 min. En paralelo se prepara una mezcla de reacción para la síntesis del ADNc que consiste en: MgCl₂ 4 µl, 10X tampón de ADNc 2 µl, dNTP (10 mM) 2 µl, inhibidor de ARN-asa 1 µl retrotranscriptasa 1 µl, hexanucleótidos aleatorios 1 µl y muestra de ARN 1 µl. La reacción se incuba a 42°C durante 60 min, después

se inactivan las enzimas calentando la muestra a 95 °C durante 5 min. Después de haber finalizado esta reacción, directamente sobre el producto se vierte 80 µl de la mezcla de reacción de la PCR, pero con la modificación de que no hay que añadir dNTP ya que van incorporados a la mezcla de reacción de ADNc.

Preparación de células de *Escherichia coli* competentes para transformación

La preparación de las células se llevaba a cabo por el método del cloruro cálcico (O). Se utilizó la estirpe XL-1 Blue MR de *E. coli*, que se crecía en medio LB durante 15 horas. Luego se diluía 100 veces el cultivo en el mismo medio LB y se incubaba a 37 °C durante 2-4 horas hasta que el cultivo alcanzaba una densidad óptica a 600 nm de 0,5. En ese momento el cultivo se enfriaba en hielo durante 10 min, al termino de los cuales se centrifugaban a 10000 rpm durante 10 min y se resuspendían en la mitad del volumen inicial de CaCl₂ 50 mM frío. A continuación se mantenía en hielo durante 30 min transcurrido ese tiempo, la suspensión se centrifugaba y se resuspendía en 1/100 del volumen inicial de CaCl₂ 50 mM y glicerol al 15% frío, en este momento se mantenía en hielo un mínimo de 2 horas tras lo cual las células estaban competentes para la transformación. Y se alicuotaban en tubos de 1,5 ml añadiendo 200 µl a cada tubo y se congelaban en nitrógeno líquido hasta su uso. Estas células permanecían en estado competente durante 6 meses. Para comprobar el nivel de eficiencia se procedía a transformarlas con plásmidos a concentraciones conocidas. Además de estas células competentes preparadas en nuestro propio laboratorio también se utilizaron células supercompetentes suministradas por la empresa Stratagene (Epicurian supercompetent cells strain XL-Blue MR).

Transformación de *Escherichia coli*

La transformación se realizaba descongelando en hielo un vial de células competentes, y se mezclaba 100 µl de la suspensión bacteriana con 2 µl del ADN plasmídico correspondiente y se incubaba en hielo durante 30 min. Pasados los cuales se procedía a someter a las bacterias a un choque térmico a 42 °C durante 45 s. La suspensión bacteriana se incubaba a continuación

en medio SOC durante 1 hora a 37 °C. A continuación se centrifugaban las células 30 s a 14000 rpm y se sembraban en medio LB + el antibiótico apropiado.

Clonación de ADN amplificado por PCR

Se utilizó el kit de clonación de fragmentos de PCR "Sureclone" de Pharmacia, que contiene: ADN polimerasa klenow, polinucleótido quinasa del fago T4, ligasa de T4, *EcoRI*, *HindIII* y sus tampones específicos, ditiotretitol (200 mM), sephacryl s-200 (resuspendida en 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7,6 y 1 mM EDTA) de Pharmacia, columnas de microspin de polipropileno con filtro (Pharmacia), células de *Escherichia coli* estirpe XL-1 Blue MR (Stratagene) supercompetentes, X-Gal, IPTG, agarosa de bajo punto de fusión y "Multipurpose" de Boerihnger Mannheim, medios LB y SOC, ampicilina, y el plásmido pUC18 (50 µg/ml) cortado con *SmaI* y desfosforilado (para evitar que religue consigo mismo).

El método se divide en varias partes diferentes:

Preparación del ADN amplificado: Consiste en hacer extremos romos con Klenow y fosforilarlos con la polinucleótido quinasa. Se utiliza entre 20 y 200 ng de ADN dependiendo del tamaño del fragmento de ADN amplificado:

Tamaño (pb)	Cantidad de ADN (ng)
100-300	20-60
301-500	60-100
501-700	100-140
701-1000	140-200

La reacción se realiza con: Klenow 1 µl, tampón de quinasa 2 µl, polinucleótido quinasa 1 µl, agua destilada + ADN hasta 20 µl. Se mezcla y se centrifuga 20 s a 14000 rpm. Se incuba a 37 °C durante 30 min. Se añade 20 µl de fenol-cloroformo-alcohol isoamilico, se agita fuertemente

y se centrifuga 1 min a 14000 rpm. Se recoge la fase superior y se purifica por cromatografía en sephadex.

Ligación: Se prepara la mezcla de ligación que lleva: efluente de columna de sephadex: 2 µl, vector desfosforilado 1 µl, tampón de ligación 10 µl, DTT 1 µl, ligasa de T4 1 µl y agua destilada hasta 20 µl. Se incuba a 16 °C durante 1-2 horas.

Transformación: Se transforman células competentes con 2-5 µl del producto de la ligación. Se siembran en placas de Petri con medio LB con ampicilina, X-gal e IPTG. Analizándose algunas de las colonias blancas (transformantes) que crecieron en las placas de Petri.

Separación y congelación en nitrógeno líquido de células mononucleares de sangre periférica

Este método parte de sangre heparinizada, y los materiales requeridos son: PBS, BSA, suero fetal bovino, L-glutamina, medio de cultivo RPMI, solución de Turk, Ficoll-400 (Pharmacia) con 1077 de densidad (ajustada con plenigriff) y dimetilsulfóxido (DMSO).

Se dispensa la sangre en tubos de 50 ml y se añade un volumen igual de PBS, se agita con una pipeta y se añade 1/3 del volumen de la mezcla de Ficoll 1077 (10 g en 100 ml de agua). Se baja el nivel de Ficoll hasta 9 ml manualmente con la pipeta. A continuación se centrifuga 30 s a 1000 g a 18 °C sin freno. Se recoge el halo de linfocitos que se encuentra en la interfase de suero y Ficoll. Se centrifuga a 2500 rpm durante 10 min (con freno) a 4 °C. Se decantan los tubos y resuspenden las células con agitación manual, se añade 10 ml de PBS-BSA y se cuentan las células, para ello se mezclan bien las células con los 10 ml de PBS. Se cojen 5 µl de suspensión celular y se le añaden 45 µl de solución de Turk, se agita bien y se carga en el hemocitómetro y se cuentan las células. A continuación se congelan alícuotas de 5 millones de células por criotubo, llevando cada uno 1ml de la siguiente mezcla:

500 µl. de suspensión celular.

500 µl de suero fetal bovino + 20 % de DMSO + RPMI1640 (30 %) + L-Gln añadida gota a gota

Los criotubos se congelan a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ al menos un día y después se guardan en nitrógeno líquido. Alternativamente al paso por $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, se pueden congelan los criotubos con vapores de nitrógeno líquido en un Nicool.

Cuantificación del número de linfocitos CD4+

Cuantificación de la antigenemia p24

Secuenciación cíclica con femtomol (Promega)

Se utilizó el kit de secuenciación cíclica “femtomol” de Promega, y ADN altamente purificado, ya sea plasmídico o producto de PCR. El kit contiene lo siguiente: tampón de secuenciación 5X, solución de parada, mezclas de los distintos dideoxiribonucleótidos (ver sección de tampones y soluciones) y *Taq* ADN polimerasa grado secuenciación (5 unidades/ μl). Se utiliza también un cebador marcado en el extremo 5' con fluoresceína, a una concentración de 1,5 pmoles/ μl .

Para cada reacción de secuenciación se marcan 4 tubos de 0,5 ml (A,C,G,T) y se añade 2 μl de cada una de las mezclas de ddNTP, cerrar los tubos y mantener en hielo. A continuación se prepara la siguiente mezcla de reacción por cada reacción de secuenciación:

ADN altamente purificado:	1-2 μg
tampón de secuenciación 5X:	5 μl
Cebador marcado con fluoresceína:	1,5 μl
Agua bidestilada:	hasta 16 μl
<i>Taq</i> ADN polimerasa grado secuenciación:	1 μl (5 unidades)

De esta mezcla (volumen final de 17 μl) se añaden 4 μl a cada uno de los cuatro tubos que contienen las mezclas de los distintos dideoxinucleósidos. Introducir los tubos en el termociclador 9600 de Perkin-Elmer que está previamente calentado a 95°C y comenzar los ciclos de secuenciación. Las temperaturas de *annealing* de los oligonucleótidos han de ser optimizadas para cada caso teniendo en cuenta la temperatura de *melting* (fusión). Como norma se puede tomar la siguiente:

95 °C 3-5 min

35 ciclos de 95 °C 30 s, 50 °C 30 s (esta temperatura depende de cada oligonucleótido), 70 °C 30 s

70°C 5 min

4°C indefinidamente

Después de que el programa del termociclador ha concluido se añade a cada tubo 3 µl de tampón de parada de secuenciación, y se calientan los tubos a 95°C durante 3-5 min. Se utiliza todo el volumen para cargar en el gel de secuenciación (9 µl totales).

Para realizar la secuenciación de ADN se utilizó el secuenciador automático ALF DNA Sequencer (*Automated laser sequencer*) de Pharmacia.

Secuenciación con Autoread (Pharmacia)

Se utilizó el kit Autoread de Pharmacia, que contiene además de las mezclas de ddNTP los siguientes elementos: *T7* ADN polimerasa, tampón de *annealing*, tampón de extensión, tampón de dilución de la enzima, DMSO, solución de parada y ADN plasmídico de pUC18 (diluido en tampón TE). Además se necesita NaCl 1M y HCl 1M.

Hay que ajustar la concentración de ADN a 5-10 µg/10 µl, a continuación en un tubo de 1,5 ml se añade: ADN 10 µl, 2 µl de oligonucleótido marcado con fluoresceína (4-6 pmoles/µl) 2 µl, 1,5 µl NaOH 1 M, siendo el volumen total de 13,5 µl. Se mezclan suavemente y se centrifugan 15 s. Se incuban 5 min a 65 °C y se transfiere el tubo a 37 °C, añadiéndole 1,5 µl de HCl 1 M y 2 µl de tampón de *annealing*. Se agita el tubo, e incuba a 37 °C 10 min y a 25 °C otros 10 min. Tras un nuevo pulso de centrifugación se añade 1 µl de tampón de extensión y 3,5 µl de DMSO. Se mezcla suavemente y se procede a las reacciones de secuenciación.

Reacciones de secuenciación: Se diluye la enzima ADN polimerasa de *T7* a 6 unidades/2 µl utilizando para ello el tampón de dilución del enzima. Se marcan 4 tubos con A,C,G y T, dispensando 2,5 µl de cada una de las mezclas de los distintos ddNTP en sus

tubos correspondientes y manteniendo en hielo. Después de que la reacción de *annealing* se ha enfriado a temperatura ambiente se centrifuga para que todo el volumen se encuentre en el fondo. Se calientan los tubos con los ddNTP a 37 °C durante 1 min. Se añade 2 µl de polimerasa de *T7* a la mezcla de reacción donde se ha realizado el *annealing* y se mezcla bien. Se dispensa 4,5 µl de la mezcla en cada uno de los tubos que contienen los ddNTP. Incubando a continuación a 37 °C durante 5 min. Por último se añade 5 µl de solución de parada, agitando y mezclando bien. Hay que usar una punta de pipeta para cada acto de parada. Se calientan las reacciones a 90°C durante 2-3 min y se transfieren inmediatamente a hielo. En el gel de secuenciación se cargan entre 4-6 µl.

Electroforesis en acrilamida para secuenciación automática

Las reacciones de secuenciación de ADN se sometían a electroforesis en el secuenciador automático ALF (*Automated Laser Fluorescent*) de Pharmacia. Los geles de secuenciación de alta resolución se sometían a un voltaje de 1600 mV, una intensidad de corriente de 25 W, la potencia del laser era de 3 mV, temperatura del gel de 50 °C y el tiempo de toma de datos de 2,5 s. Los geles de secuenciación normales se sometían a un voltaje de 1500 mV, una intensidad de corriente de 25 W, potencia de laser de 3 mV, temperatura del gel de 50 °C y tiempo de toma de datos de 2,0 s. Los datos generados por la electroforesis fueron recogidos directamente por un ordenador Compac 486 100Mhz, e interpretados por el programa ALF manager (pharmacia).



Cuantificación de la carga viral circulante (Amplicor HIV monitor Test, Roche Molecular Systems)

Se utilizó el kit de cuantificación de la carga viral “Amplicor HIV monitor test” de Roche Molecular Systems (Hoffmann-La Roche, Basel, Suiza), que consta de:

Reactivos de preparación de las muestras	Reactivos de PCR	Reactivos de detección
Solución de lisis ARN control de cuantificación Controles positivos y negativos Solución de dilución de muestras	Mezcla de reacción de PCR Solución de manganeso	Solución de desnaturalización Tampón de hibridación Conjugado de avidina-HRP Sustratos A y B Solución de parada Concentrado de lavado 10X Placa de microtiter de ELISA

Adicionalmente se requiere isopropanol y etanol al 70%.

El protocolo se divide en varias fases:

Recogida de los especímenes:

El material es altamente infeccioso y ha de ser manejado según normas de seguridad biológica. Se requiere como mínimo unos 200 µl de plasma, tratados con ACD o EDTA como anticoagulante, aquellas muestras recogidas en heparina no se pueden utilizar con este sistema de cuantificación de carga viral. La sangre total ha de mantenerse a temperatura ambiente hasta el momento de su separación (no se pueden refrigerar las muestras). El plasma ha de ser separado en el plazo de 6 horas después de la extracción de la sangre. Utilizar técnicas convencionales *?* para extraer el plasma de la sangre y congelarlo a -20°C alicuotado en viales de 250 µl hasta su uso.

Preparación de los reactivos:

Preparar la mezcla de reacción de PCR añadiendo 100 µl de solución de manganeso a la mezcla de reacción de PCR, mezclar con cuidado unas 10-15 veces. Dispensar 50 µl de la mezcla de reacción+manganeso a cada tubo de PCR. Conservar a 4°C hasta que se ha efectuado la extracción de ARN del plasma. La reacción de amplificación ha de realizarse en el plazo de 4 horas desde la preparación de la mezcla de reacción.

Preparar etanol al 70% (15 ml) y solución de lisis añadiendo 70 µl de ARN control de cuantificación (688 copias de ARN control totales y 86 copias por cada reacción de amplificación).

Preparación de los especímenes:

Descongelar las alícuotas de plasma a temperatura ambiente y mezclar en el vortex 3-5 segundos. Centrifugar la muestra durante 10 sg para concentrar el plasma en el fondo del tubo. Dispensar 600 µl de solución de lisis a cada tubo y añadir 200 µl de plasma o de solución control (positiva o negativa), mezclar en el vortex 3-5 segundos e incubar a temperatura ambiente 10 min. Añadir 800 µl de isopropanol y mezclar en el vortex. Centrifugar durante 15 min a 16000Xg a temperatura ambiente.

Eliminar el sobrenadante sin tocar el precipitado del fondo, añadir 1 ml de etanol al 70% y agitar en vortex 5 segundos.

Centrifugar 5 min a 16000Xg a temperatura ambiente.

Eliminar el sobrenadante y añadir 400 µl de solución de dilución de muestras. Agitar en vortex durante 10 sg para resuspender el ARN extraído.

Dispensar 50 µl de las muestras así preparadas y de los controles en los tubos de PCR.

Amplificación:

Se realiza según los siguientes ciclos:

50°C	2 min	
60°C	30 min	
4 ciclos de	95°C	10 sg
	55°C	10 sg
	72°C	10 sg
26 ciclos de	90°C	10 sg
	60°C	10 sg
	72°C	10 sg
72°C	15 min	
4°C	indefinidamente	

Después de concluidos los ciclos de amplificación, se añade 100 µl de solución de desnaturalización a cada tubo de PCR, mezclando con la pipeta 5 veces. Incubar a temperatura ambiente 10 min. Este material puede ser almacenado a 4°C hasta un máximo de 1 semana, aunque conviene procesarlo lo antes posible.

Detección:

Los reactivos han de estar a temperatura ambiente antes de proceder a la detección.

Preparar la solución de lavado añadiendo 1 volumen de solución de lavado concentrada 10X a 9 volúmenes de agua destilada, mezclando bien. Esta solución de trabajo es estable a temperatura ambiente hasta un máximo de 2 semanas.

Añadir 100 μ l de tampón de hibridación a cada pocillo de la placa de ELISA "Monitor", la fila A-F tiene los pocillos recubiertos con un oligonucleótido específico para el HIV, las filas G y H tienen unido un oligonucleótido específico para el control de cuantificación de ARN. Añadir 25 μ l de la reacción de PCR desnaturalizada al pocillo A de la placa de ELISA, y hacer diluciones seriadas de 1/5 en los pocillos B-F.

Añadir 25 μ l de las reacciones de PCR desnaturalizadas a los pocillos G y H, y realizar diluciones seriadas de 1/5 del volumen como en los pocillos anteriores.

Cubrir la placa e incubar a 37°C durante 1 hora.

Lavar la placa 5 veces con la solución de lavado y añadir 100 μ l de conjugado de avidina-HRP a cada pocillo, cubrir la placa e incubar a 37°C durante 15 min. Lavar la placa nuevamente. Preparar el sustrato para la reacción colorimétrica, para cada pocillo de la placa de ELISA mezclar 12 ml de sustrato A con 3 ml de sustrato B (proteger la solución de sustrato de la luz directa). Añadir 100 μ l de sustrato a cada pocillo, e incubar a temperatura ambiente durante 10 min en la oscuridad. Añadir 100 μ l de solución de parada a cada pocillo y medir la densidad óptica a 450 nm.

Interpretación de los resultados:

Las diluciones seriadas de los productos de PCR representan diluciones de 5, 25, 125, 625 y 3125 respectivamente. La absorbancia debe decrecer con las diluciones seriadas, siendo el pocillo A el que presente el máximo de intensidad y el F el que tenga la mínima. Elegir un pocillo en el cual la densidad óptica esté comprendida entre 0,200 y 2,00 unidades, si hay más de un pocillo que cumpla esta condición, elegir el de menor densidad óptica. Sustraer la absorbancia de fondo que equivale a 0,07 unidades.

Calcular el total de densidades ópticas HIV multiplicando el valor de densidad óptica del pocillo elegido por el factor de dilución del pocillo.

Elegir el valor más adecuado del control de cuantificación de ARN, para ello tomar el valor de densidad óptica que esté comprendido entre 0,300 y 2,0. Sustraer la absorbancia de fondo del valor de densidad óptica elegido (0,07 unidades).

Calcular el total de densidades ópticas del control de cuantificación (CC) de ARN multiplicando el valor de densidad óptica (DO) por el factor de dilución del pocillo.

Calcular el número de copias de ARN de HIV-1/ml de plasma mediante la siguiente fórmula:
(total HIV DO/total CC DO) X copias de control por reacción X 40

Cuantificación de la carga proviral

Se realizó utilizando los reactivos de la PCR *nested* del gen *gag* del HIV-1.

Que detecta una sola copia de provirus de HIV-1 en una muestra contaminada por el virus (). Se amplifican cantidades distintas del mismo ADN problema. A partir de la menor cantidad de ADN que produjo una PCR positiva, se amplifica nuevamente 8 tubos en paralelo, obteniéndose un cierto número de PCR positivas y de PCR negativas. Dado que las PCR negativas corresponden a los tubos en los que no habrá ningún provirus, la concentración de copias de ADN de HIV-1 puede ser estimada usando la clase nula de la distribución de Poisson. Dado que 1 mg de ADN corresponde aproximadamente con 150000 PBMC, se puede obtener como estima del número de provirus por cada 10000 PBMC del paciente.

Análisis de secuencias de ADN y proteínas

Los resultados de las distintas secuenciaciones fueron analizados utilizando varios programas informáticos. Para interpretar directamente las curvas de la electroforesis de acrilamida se utilizó el programa Alf Manager (Pharmacia), para el análisis de secuencias se utilizaron los programas Seqaid II () y DNAsis (Hitachi). Las comparaciones de secuencias fueron realizadas con los programas Macaw () y Clustal V (). Los arboles filogenéticos fueron generados utilizando el paquete informático de análisis de filogenia Phyllip 3,57 (*Phylogeny Inference Package*)(). Para el análisis de las secuencias de proteínas se utilizaron los programas

Profilegraph () y Anthepro (). Estos programas fueron obtenidos por cesión gratuita de sus autores a partir del banco de software relacionado con la biología molecular del EMBL (*European Molecular Biology Laboratory*) o del servidor Phyllip ().

Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos fue realizado utilizando el paquete estadístico RSIGMA () y el programa Microsoft Access 1.0 ().

El conocimiento de la evolución natural de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (HIV-1) es importante para predecir el curso de la enfermedad en los pacientes infectados y sobre todo es fundamental para conocer el efecto de las distintas terapias antivirales, ya que sólo comparando la evolución natural con la evolución bajo tratamiento podemos determinar el efecto real de las distintas drogas. También es importante para conocer el momento más idóneo para el inicio del tratamiento. Al comienzo de esta tesis, algunos estudios habían demostrado que existe una correlación directa entre la carga viral y el estadio de la enfermedad (), sin embargo se trataba de estudios transversales que no permitían establecer firmemente la relación entre la evolución de la carga viral, la situación inmunológica y estadio clínico. Además, las técnicas empleadas para la medición de la carga viral estaban muy limitadas, como la detección de los antígenos virales (poco sensible), o los cultivos virales cuantitativos (sesgados por la selección de ciertas cepas virales en los cocultivos). Tan solo un estudio () relacionaba carga proviral y progresión de la enfermedad, pero aún se necesitaban más datos para conocer si esta es un marcador importante del pronóstico de la infección y de monitorización de la respuesta de los pacientes a los fármacos antivirales. Por esta razón se estudió la cinética de la carga proviral de 22 pacientes que recibieron placebo y posteriormente se utilizó esta información para comprobar el efecto sobre otro grupo de pacientes que recibieron AZT.

Se determinó la carga proviral en la primera muestra congelada de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y en la última o previa a al inicio de tratamiento con AZT en pacientes que recibieron el fármaco después del periodo en placebo. El tiempo medio entre la primera y la última muestra fue de 21 ± 8 meses. En pacientes con un seguimiento de más de 18 meses, se cuantificó además la carga proviral a los 15 meses del inicio. Todos los pacientes estaban en el estadio A propuesto por el *Centers for Disease Control* (CDC) en 1992 (), con unos niveles de linfocitos CD4+ $>300/\text{ml}$.

Los criterios utilizados para definir enfermedad progresiva fueron: SIDA fue definido según el sistema propuesto por el CDC en 1992 (), se definió enfermedad progresiva como estadio B de la clasificación del CDC y un descenso mantenido de la concentración de linfocitos CD4+ de $<75\%$ del valor inicial (definido como la media aritmética del recuento de linfocitos CD4+ en el momento de inicio del estudio y de un mes anterior).

También se consideró enfermedad progresiva un descenso mantenido de los linfocitos CD4+ por debajo del 50% del valor inicial.

La tasa de incremento de la carga viral con el tiempo fue calculada mediante un parámetro utilizado en ecología de poblaciones denominado tasa intrínseca de crecimiento de la población (r), se representa por “ r ”. Y representa la dinámica demográfica de los individuos de una población por unidad de tiempo, se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$r = \ln(N_t/N_0)/t$$

Donde t es el tiempo en meses, N_0 es la carga proviral a tiempo cero y N_t es la carga proviral a tiempo t . Este parámetro muestra el incremento del número de provirus de HIV-1/ 10^4 linfocitos CD4+ por mes. Un valor negativo de r representa un descenso neto de la carga proviral por unidad de tiempo y viceversa, un valor positivo representa un incremento.

Carga viral basal y estado inmunológico

Como está plenamente establecido, se observó una correlación estadística significativa entre los niveles de linfocitos CD4+ de los pacientes y la evolución a SIDA o enfermedad progresiva. Siendo el nivel medio al comienzo del seguimiento de 418 ± 113 linfocitos CD4+/ml en los pacientes progresores y de 774 ± 256 en los no-progresores ($p < 0,001$), figura 10.

Linfocitos CD4+/ml

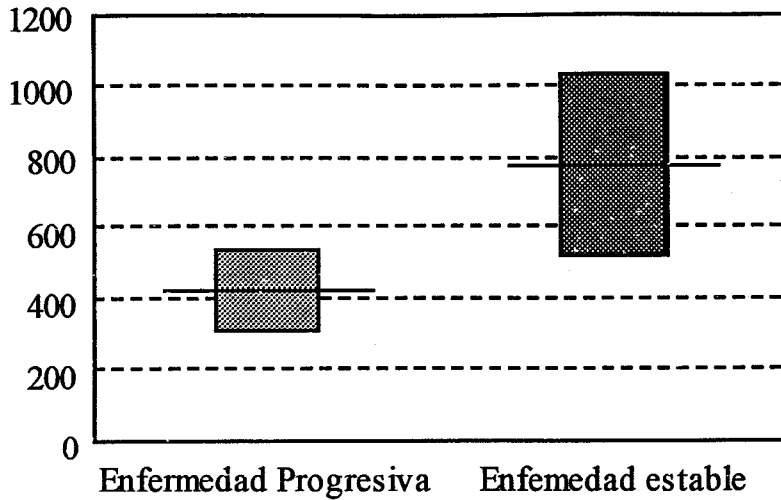
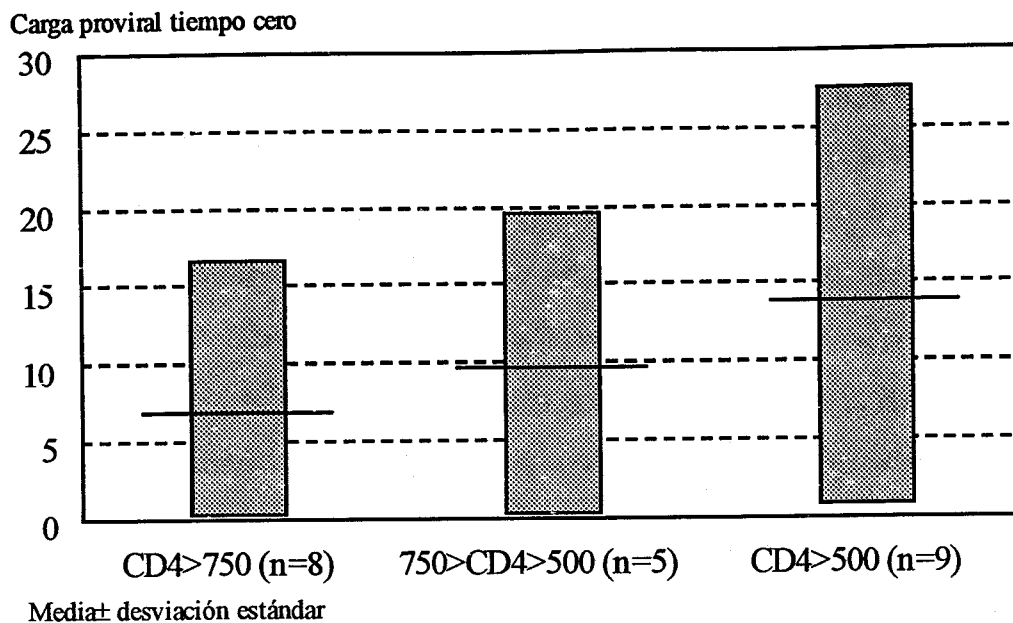
Media \pm desviación estándar

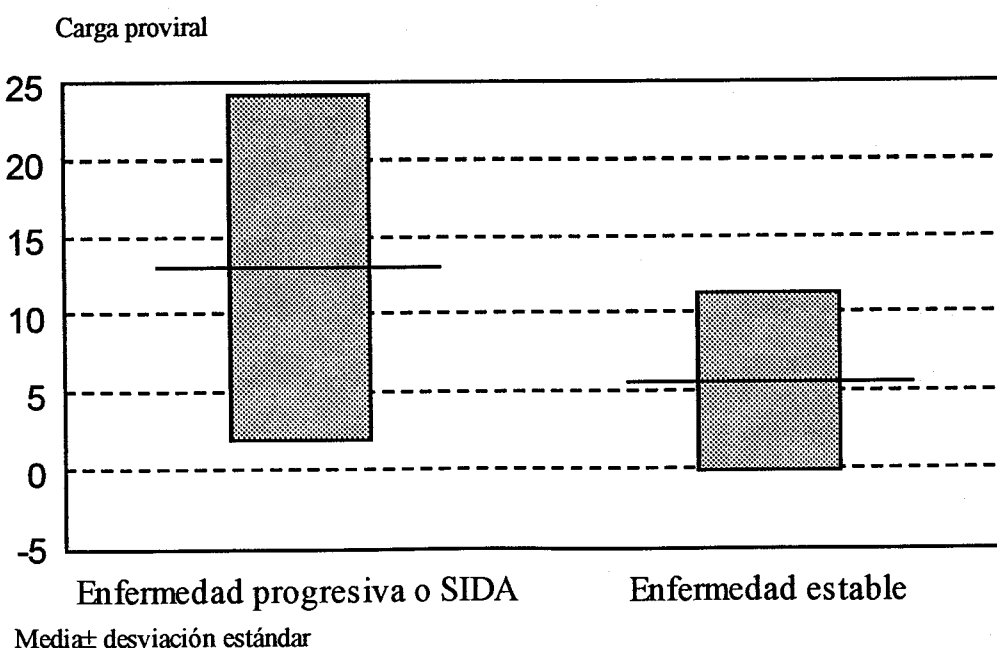
Figura 10: Relación entre los linfocitos CD4+ al inicio y el desarrollo de enfermedad progresiva

La relación entre la carga viral y los linfocitos CD4 está representada en la figura 11, se observa que aquellos pacientes con menores niveles de linfocitos presentan la carga proviral más elevada. Aunque a diferencia del caso anterior no se alcanza significación estadística por las grandes diferencias observadas entre los distintos pacientes.

Media \pm desviación estándar

Figura 11: Relación entre la carga viral inicial y el nivel de linfocitos CD4+

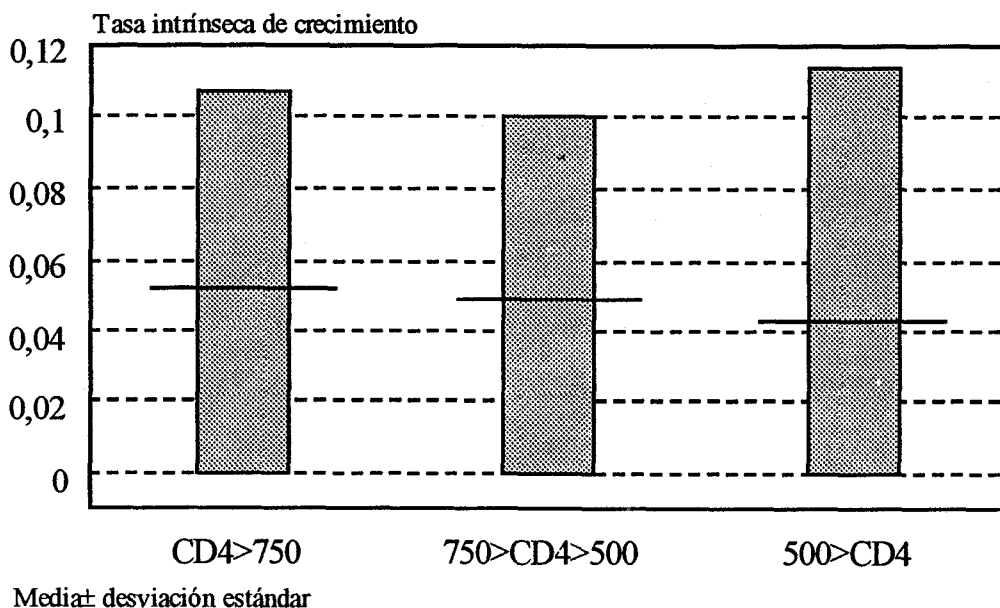
De la misma manera, no se encontró significación estadística a la relación entre la carga viral inicial y la progresión clínica, aunque aquellos pacientes que tuvieron una evolución a SIDA o enfermedad progresiva presentaron unos niveles mayores de carga viral que los no progresores ($13,08 \pm 11,03$ provirus/ 10^4 linfocitos CD4+ frente a $5,63 \pm 5,67$).

Figura 12: Relación entre la carga proviral y enfermedad progresiva o SIDA

Evolución de la tasa intrínseca de crecimiento de la carga proviral en relación con el estado inmunológico y la progresión clínica

La tasa de crecimiento de la carga proviral fue independiente del estado inmunológico de partida de los pacientes, figura 13. Produciéndose replicación activa viral en fases tempranas de la infección. Este nivel de replicación es similar o incluso mayor que la observada en pacientes con una infección más avanzada, aunque existen grandes diferencias entre distintos pacientes. Aunque la replicación viral medida por la tasa intrínseca de crecimiento r fue mayor en los progresores ($0,093 \pm 0,96$ frente a $0,040 \pm 0,055$ de los pacientes clínicamente estables, $P=0,119$).

Figura 13: Relación entre r y situación inmunológica



Evolución de la carga proviral en los pacientes no tratados

Los resultados se muestran en la tabla 4, la r fue positiva en la mayoría de los pacientes (17 de 22) durante los primeros 15 meses, y en aquellos en fue negativa esta situación no fue mantenida durante los meses siguientes de seguimiento. El valor de r durante el periodo de estudio sigue una distribución normal ($P=0,237$). Permittedo definir un intervalo de confianza (IC) del 90% (media $\pm 1,96XDS$): $-0,062$ a $+0,178$. Ningún paciente presentó un valor de r por debajo de este intervalo y solamente el paciente 21 uno tuvo un valor superior, tabla 4.

Tabla 4: Cambios en la carga proviral (CPV) y su tasa intrínseca de crecimiento (r) en los pacientes no tratados, ND: no determinado. Los pacientes 15, 21 y 22 presentaron alguna enfermedad diagnóstica de SIDA. Los pacientes 11, 16, 18 y 20 presentaron enfermedad progresiva.

Paciente	CD4+ células/ml	CPV t =0	CPV t =1	tiempo (t1-t0)	r1	CPV t =2	tiempo (t2-t1)	r2
1	1200	0,4	1,86	17	+0,090	0,78	17	-0,051
2	1181	15,95	14,08	15	-0,008	26,52	8	+0,079
3	1134	0,26	0,41	15	+0,030	+0,71	20	+0,027
4	970	3,98	43,80	17	+0,141	ND	ND	ND
5	828	0,56	0,53	15	-0,001	1,04	6	+0,112
6	794	3,14	19,92	17	+0,109	ND	ND	ND
7	786	0,86	1,75	16	+0,044	3,27	15	+0,042
8	786	2,07	2,38	16	+0,009	11,28	15	+0,104
9	728	9,40	43,80	15	+0,103	ND	ND	ND
10	689	9,22	7,16	15	-0,017	13,27	11	0,056
11	630	0,37	1,56	17	+0,085	ND	ND	ND
12	616	3,00	3,40	12	+0,010	ND	ND	ND
13	537	6,87	8,00	17	+0,009	18,88	8	+0,107
14	536	16,20	42,72	15	+0,065	ND	ND	ND
15	468	11,43	63,80	17	+0,101	ND	ND	ND
16	459	23,60	25,71	15	+0,006	181,92	15	+0,130
17	446	0,38	1,11	13	+0,082	ND	ND	ND
18	392	0,81	7,21	13	+0,168	ND	ND	ND
19	388	12,25	5,55	15	-0,053	9,50	16	+0,034
20	356	30,33	58,75	15	+0,044	ND	ND	ND
21	315	10,65	319,5	13	+0,262	ND	ND	ND
22	306	14,41	12,64	11	-0,012	ND	ND	ND

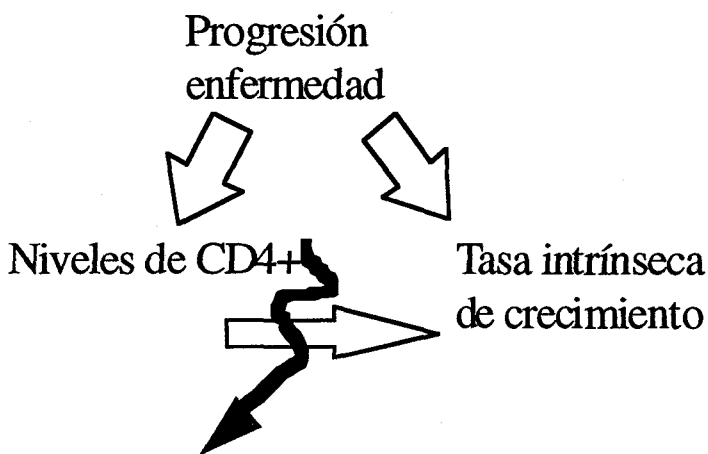
Discusión

La dinámica de la carga viral del HIV-1 en la infección asintomática no tratada ha sido abordada utilizando como herramienta un parámetro matemático comúnmente aplicado en ecología de poblaciones. Este estudio nos ha permitido demostrar que existe replicación viral efectiva en todas las fases de la infección por el HIV-1, la carga proviral aumenta en pacientes en fases iniciales con un buen estado inmunológico. Aunque esto había sido previamente sugerido en estudios transversales en los cuales observaron expresión de ARN viral en pacientes asintomáticos con poco deterioro inmunitario (). Entrando en conflicto con la visión que en esos momentos se tenía de la enfermedad y con trabajos que sugerían un bloqueo de la replicación (latencia) durante las primeras etapas de la infección (baltimore). Estos resultados expuestos muestran que existe un nivel de replicación similar en diferentes fases dentro del periodo asintomático de la enfermedad, si bien, en este trabajo no se han abordado pacientes muy deteriorados inmunológicamente, por lo cual no se puede concluir si el nivel de replicación viral en la fase asintomática es diferente del de fases terminales. Estos resultados no justifican un tratamiento farmacológico tardío de la infección, esquema terapéutico surgido de la idea errónea de que el virus está en un estado latente hasta el momento en que se produce un descenso brusco de los linfocitos CD4+ y aparecen las primeras infecciones oportunistas propias del SIDA. El virus está constantemente replicándose a un mayor o menor nivel dependiendo del paciente, por ello es necesario recurrir a los fármacos antivirales desde el momento mismo de diagnóstico de la infección por el HIV-1. Esta visión está imponiéndose tras haberse medido una muy alta tasa de replicación en estadios precoces de la enfermedad (Ho, Coffin).

Un descubrimiento importante es que la tasa intrínseca de crecimiento en los pacientes no tratados sigue una distribución normal, permitiendo definir unos intervalos de confianza que predecirían la evolución de la mayoría de los pacientes si no fuesen tratados y por tanto permitiendo comprobar la respuesta frente a la terapia antiviral. La carga viral tiene relación con el estadio clínico y su dinámica en el tiempo tiene valor predictivo pero sólo relativamente. Pacientes muy deteriorados inmunológicamente pueden tener niveles relativamente bajos de carga proviral y viceversa. Estos datos sugieren que en la patogénesis de la infección por el HIV puedan influir otros elementos distintos de la carga viral como puede ser el fenotipo viral

(formador o no de sincitios en cultivo) o el tropismo por distintas líneas celulares del sistema inmunitario (linfocitos frente a macrófagos) y que estas características biológicas del virus sean factores independientes que condicionan la velocidad de evolución a SIDA.

En los datos expuestos se observa una aparente contradicción, la progresión de la enfermedad está relacionada con el nivel de linfocitos CD4 al inicio del seguimiento y con la tasa de incremento de la carga proviral (r). Pero este mismo parámetro no está relacionado con los niveles de linfocitos CD4+.



Pacientes con distintos niveles de linfocitos CD4+ tienen una r similar. Pero los progresores presentan un valor de r más elevado y son los que tienen menor nivel de linfocitos. Este hecho tiene varias explicaciones posibles, por un lado que el número de pacientes que han sido estudiados sea insuficiente para extraer conclusiones significativas. Esta aparente paradoja también puede representar una realidad biológica, aunque en líneas generales no exista relación entre el valor de r y el estado inmunológico (durante el periodo asintomático), en la progresión clínica se puedan producir incrementos en tasa de replicación viral. Este cambio en las propiedades biológicas en el momento de la progresión clínica hacia SIDA ha sido ampliamente observado () y parece estar correlacionado con un cambio en el tropismo viral y con un derrumbe del sistema inmunológico. Otra posibilidad es que cuanto menor sea el recuento de linfocitos CD4+ más cercano está el derrumbe del sistema inmunológico y por tanto el SIDA,

mientras que r , indicaría el grado de virulencia de la infección y por consiguiente la tasa de destrucción de linfocitos CD4+ y la velocidad de progresión a SIDA. En definitiva, cuanto menor sea el recuento de linfocitos CD4+ o mayor sea el valor de r más probabilidad de que observemos algún deterioro inmunológico durante el periodo de observación.

Capítulo 2

Evolución del gen *nef* del HIV-1
durante historia natural de la infección

La variabilidad de la secuencia de los virus de ARN es la más alta de todos los organismos conocidos, y el HIV-1 presenta el grado de variabilidad más elevado dentro de los virus de ARN. Es tan alta que se considera que está en el límite de lo que se considera como “catástrofe del error” (). La fuente de esta heterogeneidad está en las enzimas responsables de la replicación del material genético viral: la ARN polimerasa II y la transcriptasa inversa. También, la recombinación entre distintos virus tiene un papel fundamental en la aparición de genotipos nuevos (). Otros mecanismos se encargan posteriormente de seleccionar los genotipos con un *fitness* más elevado. Principalmente es la presión selectiva ejercida por el sistema inmunitario, que selecciona las proteínas con menores capacidades antigénicas, aunque también es fundamental la competición viral y la adaptación a un ambiente cambiante. Se ha medido la variabilidad genética del HIV-1 a partir de virus obtenidos del mismo individuo (), de individuos relacionados () y no relacionados entre si (). El grado de variabilidad depende también del gen viral analizado, siendo el gen *env* el más heterogéneo (). El grado de variabilidad representa el potencial genético para el desarrollo de virus con diferente tropismo, capacidad de replicación, virulencia o evasión del sistema inmunitario.

La mayoría de los estudios de evolución han sido llevado a cabo sobre genes estructurales como *env* (), los datos sobre otros genes de función potencialmente reguladora como *nef* son más escasos. Se ha estudiado la evolución secuencial a lo largo del tiempo en uno () y tres () individuos infectados respectivamente. También se ha analizado la variación de secuencia entre muchos virus no relacionados entre si (). En este capítulo se analiza la evolución de *nef* en el tiempo en dos pacientes que presentaron una evolución de la carga viral diferente, uno de ellos se mantuvo estable y el otro presentó una gran elevación de la carga viral en el mismo periodo de seguimiento. Ambos pacientes no recibieron ningún tratamiento durante el tiempo de estudio ya que pertenecían al brazo placebo del estudio ACTG 020 () que evaluó la eficacia y tolerancia del AZT. Los datos que se presentan permiten analizar la relación entre la variabilidad genética y la carga viral para determinar si es sólo el tamaño de la población el parámetro responsable de la heterogeneidad molecular poblacional. También nos permite aportar datos sobre la relación entre la variación de la población viral y la progresión de la enfermedad medida como aumento de la carga viral.

El gen *nef* está localizado en el extremo 3' del genomio del HIV-1 e incluye un trozo de secuencia de la LTR (). La proteína está miristoilada () y se localiza fundamentalmente en las membranas internas de las células infectadas (). La función de *Nef* ha sido uno de los grandes problemas de la investigación sobre el HIV-1 durante los últimos años. Dado que es una proteína dispensable para el crecimiento del virus en cultivo () se consideró que presataba un papel muy secundario en el ciclo vital del virus. Pero esta idea cambió radicalmente cuando un experimento () con el modelo simio del HIV-1 (*SIV_{mac}*) demostró que *Nef* es fundamental para la progresión de la enfermedad y para el mantenimiento de una alta carga viral in vivo. *Nef* es capaz de reprimir la expresión en membrana de la molécula CD4. También se ha observado que reprime la expresión del MHC-I e interleukina 2. Actualmente existe aun alguna controversia sobre este gen y su función no está aclarada completamente. La evolución de la secuencia in vivo puede suministrar información sobre los aminoácidos más invariables y determinar las zonas de la proteína fundamentales para su actividad biológica.

Características de los pacientes

Las secuencias de nucleótidos de los distintos alelos del gen *nef* fueron determinadas a partir de ADN procedente de células mononucleares de sangre periférica de dos pacientes no sometidos a tratamiento antiviral. De cada paciente se analizaron una media 18 alelos, la mitad procedentes de virus a tiempo inicial y el resto de virus con 15 meses de evolución. El paciente 21 (tabla 4 capítulo 1) sufrió un fuerte incremento de la carga proviral en los 13 meses de seguimiento elevandose de 10,65 a 319,5 provirus/10⁴ linfocitos CD4+, la tasa de incremento de la carga proviral fue de 0,262. Durante el periodo de observación este paciente presentó varias enfermedades definitivas de SIDA. Por el contrario el paciente 5 a penas si sufrió variaciones en los 15 meses de evolución, pasó de 12,25 a 5,55 provirus/10⁴ linfocitos CD4+, siendo su tasa de incremento de la carga proviral de -0,053. El estado clínico de este paciente fue muy estable durante todo el tiempo de observación.

Evolución de la variabilidad genética en relación con la carga viral

Las secuencias de los alelos *nef* están representados en las tablas x-x para el paciente 1 y y-y para el paciente 2. En las figuras x e y se representa el alineamiento de secuencias de los distintos alelos de *nef*. Durante los 15 meses de seguimiento se produce un incremento muy notable de la variabilidad genética del gen *nef*. El paciente 1 presenta un incremento de variabilidad genética (posiciones heterogéneas/nucleótidos totales) desde 35 hasta 95 con un incremento de la carga viral importante (figura x). El paciente 2 presenta incrementos de la variabilidad genética más pronunciados, pero su carga viral permanece estable durante todo el periodo de observación (figura y). Los alelos *nef* a tiempo inicial son mucho más homogéneos, al final se observan no sólo más cambios de la secuencia en sitios puntuales sino inserciones o deleciones en fase de uno o dos codones, esto ocurre en ambos pacientes. También es de destacar que aparecen muchos virus con genes *nef* defectivos por aparición de codones de fin de mensaje o por la inserción o deleción de algún nucleótido que altera la pauta abierta de lectura.

Figura 17: Alineamientos de secuencias del gen nef del paciente 2 a tiempo inicial

Clon	Secuencia
3301	ATGGGTGGCAAGTGGTCAAAACATAGTGGGGATAGATGGACTGCTGTAAG
3308	ATGGGTGGCAAGTGGTCAAAACGTAGTGGGGATAGATGGACTGCTGTAAG
3316	ATGGGTGGCAAGTGGTCAAAACGTAGTGTGGATAGATGGACTGCTGTAAG
3320	ATGGGTGGCAAGTGGTCAAAACGTAGTGGGGATAGATGGACTACTGTAAG
3331	ATGGGTGGCAAGTGGTCAAAACGTAGTGGGGATAGATGGACTACTGTAAG
3333	ATGGGTGGCAAGTGGTCAAAACGTAGTGGGGATAGATGGACTGCTGTAAG
3334	ATGGGTGGCAAGTGGTCAAAACGTAGTGC GGATAGATGGCTGCTGTAAG
3335	ATGGGTGGCAAGTGGTCAAAACC TAGTGGGGATAGATGGACTGCTGTAAG
3336	ATGGGTGGCAAGTGGTCAAAACATAGTGGGGATAGATGGACTGCTGTAAG *****
3301	GGAAAGAATGAGACGAGCTGAGCCACAAGCTGAGCCAGCGGCAGCTGGGG
3308	GGAAAGAATGAGACGAGCTGAGCCACAAGCTGAGCCAGCGGCAGCTGGGG
3316	GGAAAGAATGAGACGAGCTGAGCCACAAGCTGAGCCAGCGGCAGCTGGGG
3320	GGAAAGAATGAGACAAGCTGAGCCACAAGCTGAGCCAGCGGCAGCTGGGG
3331	GGAAAGAATGAGACAAGCTGAGCCACAAGCTGAGCCAGCGGCAGCTGGGG
3333	GGAAAGAATGAGACGAGCTGAGCCACAAGCTGAGCCAGCGGCAGCTGGGG
3334	GGAAAGAATGAGACGAGCTGAGCCACAAGCTGAGCCAGCGGCAGCTGGGG
3335	GGAAAGAATGAGACGAGCTGAGCCACAAGCTGAGCCAGCGGCAGCTGGGG
3336	GGAAAGAATGAGACGAGCTGAGCCACAAGCTGAGCCAGCGGCAGCTGGGG *****
3301	TGGGAGCAGTATCTCGAGACCTGGAAAGACATGGAGCAATCACAAGTAGC
3308	TGGGAGCAGTATCTCGAGACCTGGAAAGACATGGAGCAATCACAAGTAGC
3316	TGGGAGCAGTATCTCGAGACCTGGAAAGACATGGAGCAATCACAAGTAGC
3320	TGGGAGCAGTATCTCGAGACCTGGAAAGACATGGAGCAATCACAAGTAGC
3331	TGGGAGCAGTATCTCGAGACCTGGAAAGACATGGAGCAATCACAAGTAGC
3333	TGGGAGCAGTATCTCGAGACCTGGAAAGACATGGAGCGATCACAAGTAGC
3334	TGGGAGCAGTATCTCGAGACCTGGAAAGACATGGAGCGATCACAAGTAGC
3335	TGGGAGCAGTATCTCGAGACCTGGAAAGACATGGAGCAATCACAAGTAGC
3336	TGGGAGCAGTATCTCGAGACCTGGAAAGACATGGAGCAATCACAAGTAGC *****
3301	AATACAAACAATGCTGCTTGTGCCTGGCTAGAAGCACAGAGGAGGAGGA
3308	AATACAAACAATGCTGCTTGTGCCTGGCTAGAAGCACAGAGGAGGAGGA
3316	AATACAAACAATGCTGCTTGTGCCTGGCTAGAAGCACAGAGGAGGAGGA
3320	AATACAAACAATGCTGCTTGTGCCTGGCTAGAAGCACAGAGGAGGAGGA
3331	AATACAAACAATGCTGCTTGTGCCTGGCTAGAAGCACAGAGGAGGAGGA
3333	AATACAAACAATGCTGCTTGTGCCTGGCTAGAAGCACAGAGGAGGAGGA
3334	AATACAAACAATGCTGCTTGTGCCTGGCTAGAAGCACAGAGGAGGAGGA
3335	AATACAAACGATGCTGCTTGTGCCTGGCTAGAAGCACAGAGGAGGAGGA
3336	AATACAAACAATGCTGCTTGTGCCTGGCTAGAAGCACAGAGGAGGAGGA *****
3301	GGTGGGTTTTCCAGTCAAACCTCAGGTACCTCTAAGACCAATGACTTACA
3308	GGTGGGTTTTCCAGTCAAGACCTCAGGTACCTCTAAGACCAATGACTTACA
3316	GGTGGGTTTTCCAGTCAAGACCTCAGGTACCTCTAAGACCAATGACTTACA
3320	GGTGGGTTTTCCAGTCAAGACCTCAGGTACCTCTAAGACCAATGAAATTACA
3331	GGTGGGTTTTCCAGTCAAGACCTCAGGTACCTCTAAGACCAATGAAATTACA
3333	GGTGGGTTTTCCAGTCAAGACCTCAGGTACCTCTAAGACCAATGACTTACA
3334	GGTGGGTTTTCCAGTCAAGACCTCAGGTACCTCTAAGACCAATGACTTACA
3335	GGTGGGTTTTCCAGTCAAGACCTCAGGTACCTTTAAGACCAATGAAATTACA
3336	GGTGGGTTTTCCAGTCAAACCTCAGGTACCTCTAAGACCAATGACTTACA *****

Clon

Secuencia

3301 AGGGAGCTTTAGATCTTAGCCACTTTTTAAAAGAAAAGGGGGGAC-TGGA
 3308 AGGGAGCTTTAGATCTTAGCCACTTTTTAAAAGAAAAGGGGGGAC-TGGA
 3316 AGGGAGCTTTAGATCTTAGCCACTTTTTAAAAGAAAAGGGGGGACCTGGA
 3320 AAGGAGCTTTAGATCTTAGCCACTTTTTAAAAGAAAAGGGGGGAC-TGGA
 3331 AAGGAGCTTTAGATCTTAGCCACTTTTTAAAAGAAAAGGGGGGAC-TGGA
 3333 AGGGAGCTTTAGATCTTAGCCACTTTTTAAAAGAAAAGGGGGGAC-TAGA
 3334 AGGGAGCTTTAGATCTTAGCCACTTTTTAAAAGAAAAGGGGGGAC-TGGA
 3335 AGGGAGCTTTAGATCTTAGCCACTTTTTAAAAGAAAAGGGGGGAC-TAGA
 3336 AGGGAGCTTTAGATCTTAGCCACTTTTTAAAAGAAAAGGGGGGAC-TGGA

* ***** ** * ***** * **

3301 AGGG-CTAATTTACTCCCAAAAAGACAAGATATCCTTGATCTGTGGGTC
 3308 AGGG-CTAATTTACTCCCAAAAAGACAAGATATCCTTGATCTGTGGGTC
 3316 AGGGGCTAAATTTCCCCCAAAAAGACAAGATATCCTTGATCTGTGGGTC
 3320 AGGG-CTAATTTACTCCCAAAAAGACAAGATATCCTTGATCTGTGGGTC
 3331 AGGG-CTAATTTACTCCCAAAAAGACAAGATATCCTTGATCTGTGGGTC
 3333 AGGG-CTAATTTACTCCCAAAAAGACAAGATATCCTTGATCTGTGGGTC
 3334 AGGG-CTAATTTACTCCCAAAAAGACAGGATATCCTTGATCTGTGGGTC
 3335 AGGG-CTAATTTACTCCCAAAAAGACAAGATATCCTTGATCTGTGGGTC
 3336 AGCG-CTAATTTACTCCCAAAAAGACAAGATATCCTTGATCTGTGGGTC

** * **** * * ***** *****

3301 TACCACACACAAGGATACTTCCCTGATTGGCAGAACTACACACCAGGGCC
 3308 TACCACACACAAGGATACTTCCCTGATTGGCAGAACTACACACCAGGGCC
 3316 TACCACACACAAGGATACTTCCCTGATTGGCAGAACTACACACCAGGGCC
 3320 TACCACACACAAGGATACTTCCCTGATTGGCAGAACTACACACCAGGGCC
 3331 TACCACACACAAGGATACTTCCCTGATTGGCAGAACTACACACCAGGGCC
 3333 TACCACACACAAGGATACTTCCCTGATTGGCAGAACTACACACCAGGGCC
 3334 TACCACACACAAGGATACTTCCCTGATTGGCAGAACTACACACCAGGGCC
 3335 TACCACACACAAGGATACTTCCCTGATTGGCAGAACTACACACCAGGGCC
 3336 TACCACACACAAGGATACTTCCCTGATTGGCAGAACTACACACCAGGGCC

***** **

3301 AGGGATCAGATTCCCCT-GACATTTGGATGGTGCTTCAAGCTAGTACCA
 3308 AGGGATCAGATACCCCT-GACACTTGGATGGTGCTTCAAGCTAGTACCA
 3316 AGGGATCAGATACCCCTTGACACTTGGATGGTGCTTCAAGCTAGTACAA
 3320 AGGGATCAGATTCCCCT-GACATTTGGATGGTGCTTCAAGCTAGTACCA
 3331 AGGGATCAGATTCCCCT-GACATTTGGATGGTGCTTCAAGCTAGTACCA
 3333 AGGGATCAGATACCCCT-GACATTTGGATGGTGCTTCAAGCTAGTACCA
 3334 AGGGATCAGATACCCCT-GACATTTGGATGGTGCTTCAAGCTAGTACCA
 3335 AGGGATCAGATTCCCCT-GACATTTGGATGGTGCTTCAAGCTAGTACCA
 3336 AGGGATCAGATTCCCCT-GACATTTGGATGGTGCTTCAAGCTAGTACCA

***** ***** ** ***** *

3301 GTTGAGCCAGAGAAGATAGAAGAGGCCAATGAAGGAGAGAACAACAGCTT
 3308 GTTGAGCCAGAGAAGATAGAAGAGGCCAATGAAGGAGAGAACAACAGCTT
 3316 GTTGAGCCAGAGAAGATAGAAGAGGCCAATGAGGGAGAGAACAACAGCTT
 3320 GTTGAGCCAGAGAAGATAGAAGAGGCCAATGAAGGAGAGAACAACAGCTT
 3331 GTTGAGCCAGAGAAGATAGAAGAGGCCAATGAAGGAGAGAACAACAGCTT
 3333 GTTGAGCCAGAGAAGATAGAAGAGGCCAATGAAGGAGAGAACAACAGCTT
 3334 GTTGAGCCAGAGAAGATAGAAGAGGCCAATGAAGGAGAGAACAACAGCTT
 3335 GTTGAGCCAGAGAAGATAGAAGAGGCCAATGAAGGAGAGAACAACAGCTT
 3336 GTTGAGCCAGAGAAGATAGAAGAGGCCAATGAAGGAGAGAACAACAGCTT

***** *****

Clon	Secuencia
3301	ATTACACCCCTATGAGCCTGCATGGGATGGATGACCCGGAGAAAAGAAGTGT
3308	ATTACACCCCTATGAGCCTGCATGGGATGGATGACCCGGAGAAAAGAAGTGT
3316	ATTACACCCCTATGAGCCTGCATGGGATGGATGACCCGGAGAAAAGAAGTGT
3320	ATTACACCCCTATGAGCCTGCATGGGATGGATGACCCGGAGAAAAGAAGTGT
3331	ATTACACCCCTATGAGCCTGCATGGGATGGATGACCCGGAGAAAAGAAGTGT
3333	ATTACACCCCTATGAGCCTGCATGGGATGGATGACCCGGAGAAAAGAAGTGT
3334	ATTACACCCCTATGAGCCTGCATGGGATGGATGACCCGGAGAAAAGAAGTGT
3335	ATTACACCCCTATGAGCCTGCATGGGATGGATGACCCGGAGAAAAGAAGTGT
3336	ATTACACCCCTATGAGCCTGCATGGGATGGATGACCCGGAGAAAAGAAGTGT *****
3301	TACAGTGGAAAGTTTGACAGCCGCC TAGCATTTTCATCACGTGGCCCCGAGAG
3308	TACAGTGGAAAGTTTGACAGCCGCC TAGCATTTTCATCACATGGCCCCGAGAG
3316	TACAGTGGAAAGTTTGACAGCCGCC TAGCATTTTCATCACATGGCCCCGAGAG
3320	TACAGTGGAAAGTTTGACAGCCGCC TAGCATTTTCATCACGTGGCCCCGAGAG
3331	TACAGTGGAAAGTTTGACAGCCGCC TAGCATTTTCATCACGTGGCCCCGAGAG
3333	TACAGTGGAAAGTTTGACAGCCGCC TAGCATTTTCATCACATGGCCCCGAGAG
3334	TACAGTGGAAAGTTTGACAGCCGCC TAGCATTTTCATCACATGGCCCCGAGAG
3335	TACAGTGGAAAGTTTGACAGCCGCC TAGCATTTTCATCACGTGGCCCCGAGAG
3336	TACAGTGGAAAGTTTGACAGCCGCC TAGCATTTTCATCACGTGGCCCCGAGAG ***** ***** *****
3301	CTGCATCCGGAGTACTACAAGAACTGATGACACCGAGCTTGCTACAAGGG
3308	CTGCATCCGGAGTACTACAAGAACTGATGACACCGAGCTTCCTACAAGGG
3316	CTGCATCCGGAGTACTACAAGAACTGATGACACCGAGCTTGCTACAAGGG
3320	CTGCATCCGGAGTACTACAAGAACTGATGACACCGAGCTTGCTACAAGGG
3331	CTGCATCCGGAGTACTACAAGAACTGATGACACCGAGCTTGCTACAAGGG
3333	CTGCATCCGGAGTACTACAAGAACTGATGACACCGAGCTTGCTACAAGGG
3334	CTGCATCCGGAGTACTACAAGAACTGATGACACCGAGCTTGCTACAAGGG
3335	CTGCATCCGGAGTACTACAAGAACTGATGATACCGAGCTTGCTACAAGGG
3336	CTGCATCCGGAGTACTACAAGAACTGATGACACCGAGCTTCCTACAAGGG ***** ***** *****
3301	ACGTTCCGGG
3308	ACTTTCCGGG
3316	ACTTTCCGGG
3320	ACTTTCCGGG
3331	ACTTTCCGGG
3333	ACTTTCCGGG
3334	ACTTTCCGGG
3335	ACTTTCCGGG
3336	ACTTTCCGGG ** *****

Figura 18: Secuencias de nef del paciente 2 después de 15 meses de seguimiento

Clon	Secuencia
3521	ATGGGTGGCAAGTGGTCAAAACGTAGTAGGGAT---TGGACTGATGTAAG
3520	ATGGGTGGCAAGTGGTCAAAACATAGTAGGGATAGATGGACTGATGTAAG
3513	ATGGGTGGCAAGTGGTCAAAACGTAGTGGGGATAGATGGACTGATGTAAG
3510	ATGGGTGGCAAGTGGTCAAAACGTAGTGAGGGTAGATGGACTGATGTAAG
3508	ATGGGTGGCAAGTGGTCAAAACGTAGTGGGAATAAAATAAACTGCTGTAAG
3507	ATGGGTGGCAAGTGGTCAAAACGTAGTAAGGAT---TAGACTGATGTAAG
3503	ATGGGTGGCAAGTGGTCAAAACGTAGTGGGGATAGATGGACTACTGTAAG
3502	ATGGGTGGCAAGTGGTCAAAACGTAGTGGGGATAGATGGACTACTGTAAG ***** * * * * *
3521	GGAAAGAATGAGACGAGCTGAGCCACAAGCTGAGCCAGCGGCAGCTGGGG
3520	GGAAAGAATGAGACGAGCTGAGCCACAAGCTGAGCCAGCGGCAGCTGGGG
3513	GGAAAGAATGAGACGAGCTGAGCCACAAGCTGAGCCAGCGGCAGCTGGGG
3510	GGAAAGAATGAGACGAGCTGAGCCACAAGCTGAGCCAGCGGCAGCTGGGG
3508	AAAAAAAAATAAACGAGCTAAGCCACAAGCTAAGCCAGCGGCAGCTAGGG
3507	AGAAAGAATGAGACGAGCTGAGCCACAAGCTGAGCCAGCGGCAGCTGAGG
3503	GGAAAGAATGAGACAAGCTGAGCCACAAGCTGAGCCAGCGGCAGCTGGGG
3502	GGAAAGAATGAGACCAGCTAAGCCACA-GCTGAGCCAGCGGCAGCTGGTG *** ** * ** ***** ** ***** *
3521	TGGGAGCA-GTATCTCGAGACCTGGAAAGACATGGAGCAATCACAAGTAG
3520	TGGGAGCA-GTATCTCGAGACCTGGAAAGACATGGAGCAATCACAAGTAG
3513	TGGGAGCA-GTATCTCGAGACCTGGAAAGACATGGAGCAATCACAAGTAG
3510	TGGGAGCA-GTATCTCGAGACCTGGAAAGACATGGAGCAATCACAAGTAG
3508	TAGAAGCA-GTATCTCAAAACCTGAAAAGACATAGAGCAATCACAAGTAG
3507	TAGGAGCA-GTATCTCGAGACCTGGAAAGACATAGAGCAATCACAAGTAG
3503	TGGGAGCA-GTATCTCGAGACCTGGAAAGACATGGAGCAATCACAAGTAG
3502	GGAAGCCAAGTATCTCGAGACCTGGAAAGACATGGAGCAATCACAAGTAG ** ***** * ***** ***** ***** *
3521	CAATACAAACAATGCTGCTTGTGCCTGGCTAGAAGCACAAGAGGAGGAGG
3520	CAATACAAACAATGCTGCTTGTGCCTGGCTAGAAGCACAAGAGGAGGAGG
3513	CAATACAAACAATGCTGCTTGTGCCTGGCTAGAAGCACAAGAGGAGGAGG
3510	CAATACAAACAATGCTGCTTGTGCCTGGCTAGAAGCACAAGAGGAGGAGG
3508	CAATACAAACAATGCTGCTTGTGCCTGGCTAAAAGCACAAGAGAAGAAGA
3507	CAATACAAACAATGCTGCTTGTGCCTGGCTAGAAGCACAAGAGGAGGAAG
3503	CAATACAAACAATGCTGCTTGTGCCTGGCTAGAAGCACAAGAGGAGGAGG
3502	CAATACAAACAATGCTGCTTGTGCCTGGCTAAAAGCACAAGAGGAGGAAG ***** ***** ** *
3521	AGGTGGGTTTTCCAGTCAAACCTCAGGTACCTTTAAGACCAATGACTTAC
3520	AGGTGGGTTTTCCAGTCAGACCTCAGGTACCTCTAAGACCAATGAATTAC
3513	AGGTGGGTTTTCCAGTCAGACCTCAGGTACCTCTAAGACCAATGAATTAC
3510	AGGTGGGTTTTCCAGTCAGACCTCAGGTACCTCTAAGACCAATGACTTAC
3508	AGGTGGGTTTTCCAGTCAAACCTCAGGTACCTCTAAGACCAATAACTTAC
3507	AGGTAGGTTTCCAGTCAGACCTCAGGTACCTCTAAGACCAATAGATTAC
3503	AGGTGGGTTTTCCAGTCAGACCTCAGGTACCTCTAAGACCAATGAATTAC
3502	AAGTGGGTTTTCCAGTCAGACCTCAGGTACCTCTAAGACCAATGAATTAC * * * ***** ***** ***** *****

Clon	Secuencia
3521	AAGGGGGCTGTAGATCTTAGCCACTTTTTAAAGAGAAAAGGGGGGACTGGA
3520	AAGGGAGCTTTAGATCTTAGCCACTTTTTAAAAGAAAAGGGGGGACTGGA
3513	AAGGGAGCTTTAGATCTTAGCCACTTTTTAAAAGAAAAGGGGGGACTGGA
3510	AAGGGAGCTTTAGATCTTAGCCACTTTTTAAAAGAAAAGGGGGGACTGGA
3508	AAGGAAGCTTTAGATCTTAGCCACTTTTTAAAAGAAAAGGGGGGACTGGA
3507	AAAAGAGCTGTAGATCTTAGCCACTTTTTAAAAGAAAAGGGGGGACTGGA
3503	AAAGGGGCTTTAGATCTTAGCCACTTTTTAAAAGAAGGGGGGACTGGA
3502	AAGGGAGCTTTAGATCTTAGCCACTTTTTAAAAGAAAAGGGGGGACTGGA
	** *** ***** * **
3521	AGGGCTAATTTACTCCCAAAAAGACAAGATATCCTTGATCTGTGGGTCT
3520	AGGGCTAATTTACTCCCAAAAAGACAAGATATCCTTGATCTGTGGGTCT
3513	AGGGCTAATTTACTCCCAAAAAGACAAGATATCCTTGATCTGTGGGTCT
3510	AGGGCTAATTTACTCCCAAAAAGACAAGATATCCTTGATCTGTGGGTCT
3508	AGGGCTAATTTACTCCCAAAAAGACAAGATATCCTTGATCTGTGAGTCT
3507	AGGGCTAATTTACTCCCAAAAAGACAAGATATCCTTGATCTGTAGGTCT
3503	AGGGCTAATTTACTCCCAAAAAGCCACGATATCTTTTGATCTGTGGGTCT
3502	AGGGCTAATTTACTCCCAAAAAGACAAGATATCCTTGATCTGTGGGTCT
	***** ** ** ***** ***** ****
3521	ACCACACACAAGGATACTTCCCTGATGGGCAGAACTACACACCAGGGCCA
3520	ACCACACACAAGGATACTTCCCTGATTGGCAGAACTACACACCAGGGCCA
3513	ACCACACACAAGGATACTTCCCTGATTGGCAGAACTACACACCAGGGCCA
3510	ACCACACACAAGGATACTTCCCTGATTGGCAGAACTACACACCAGGGCCA
3508	ACCACACACAAGAATACTTCCCTAATTGGCAGAACTACACACCAGGGCCA
3507	ACCACACACAAGGATACTTCCCTGATTGGCAGAACTACACACCAGGGCCA
3503	ACCACACACAAGGATACTTCCCTGATTGGCAGAACTACACACCAGGGCCA
3502	ACCACACACAAGGATACTCCCCTGATTGGCAGAACTACACACCAGGGCCA
	***** ***** ** ***** *****
3521	AGGGACCAGATTCCCTGACATTTGGATGGTGCTTCAAGCTAGTACCAGT
3520	GGGATCAGATTCCCCTGACATTTGGATGGTGCTTCAAGCTAGATCCAGT
3513	GGGATCAGATTCCCCTGACATTTGGATGGTGCTTCAAGCT-----AGT
3510	GGGACCAGATTCCCCTGACATTTGGATGGTGCTTCAAGCT-----AGT
3508	GGGATCAGATACCCCTGACACTTGAATGGTGCTTCAAGCT-----AGT
3507	GGGGCCAGATTCCCCTGACATTTGGATGGTGCTTCAAGCT-----AGT
3503	GGGATCAGATTCCCCTGACATTTGGATGGTGCTTCAAGCT-----AGT
3502	GGGATCAGATTCCCCTGACATTTGGATGGTGCTTCAAGCT-----AGT
	** * ** * ***** ** ***** *****
3521	-----TGAGCCAGAGAAGGTAGAAGAGGCCAATGAAGGAGAGAACA
3520	TGAGCCAATTTGAGCCAGAGAAGATAGAAGAGGCCAATGAAGGAGAGAACA
3513	---ACCAGTTGAGCCAGAGAAGATAGAAGAGGCCAATGAAGGAGAGAACA
3510	---ACCAGTTGAGCCAGAGAAGGTAGAAGAGGCCAATGAAGGAGAGAACA
3508	---ACCAGTTGAGCCAGAGAAGATAGAAGAGGCCAATAAAGAAGAGAACA
3507	---ACCAGTTGAGCCAGAGAAGGTAGAAGAGGCCAATGAAGGAGAAGGCA
3503	---ACCAGTTGAGCCAGAGAAGATAGAAGAGGCCAATGAAGGAGAGAACA
3502	---ACCAGTTGAGCCAGAGAAGATAGAAGAGGCCAATGAAGGAGAGAACA
	** ***** ***** ***** ** ** **

Clon	Secuencia
3521	ACAGCTTATTACACCCCTATGAGCCTGCATGGGATGGATGATCCGGAGAAA
3520	ACAGCTTATTACACCCCTATGAGCCTGCATGGGATGGATGACCCGGAGAAA
3513	ACAGCTTATTACACCCCTATGAGCCTGCATGGGATGGATGACCCGGAGAAA
3510	ACAGCTTATTACACCCCTATGAGCCTGCATGGGATGGATGACCCGGAGAGA
3508	ACAGCTTATTACACCCCTATGAGCCTGCATGGGATGGATAACCCGGAGAAA
3507	ACAGCGTTFATTACACCCCTATGAGCCTGCATGGGATGGATGACCCGGAGAAA
3503	ACAGCTTATTACACCCCTATGAGCCTGCATGGGATGGATGACCCGGAGAAA
3502	ACAGCTTATTACACCCCTATGAGCCTGCATGGGATGGATGACCCGGAGAAA ***** * ***** * ***** *
3521	GAAGTGTTFACAGTGGAAAGTTTGACAGCCGCC TAGCATTTTCATCACATGCGC
3520	GAAGTGTTFACAGTGGAAAGTTTGACAGCCGCC TAGCATTTTCATCACATGCGC
3513	GAAGTGTTFACAGTGGAAAGTTTGACAGCCGCC TAGCATTTTCATCACATGCGC
3510	GAAGCGTTFACAGTGGAAAGTTTGACAGCCGCC TAGCATTTTCATCACATGCGC
3508	GAAGTGTTFACAGTGGAAAGTTTAACAGCCGCC TAGCATTTTCATCACATGCGC
3507	GAAGTGTTFACAGTGGAAAGTTTGACAGCCGCC TAGCATTTTCATCACATGCGC
3503	GAAGTGTTFACAGTGGAAAGTTTGACAGCCGCC TAGCATTTTCATCACATGCGC
3502	GAAGTGTTFACAGTGGAAAGTTTGACAGCCGCC TAGCATTTTCATCACATGCGC **** ***** ***** ***** ****
3521	CCGAGAGCTGCATCCGGAGTACTACAAGAAGTATGATGACACCCGAGCTTTGCT
3520	CCGAGAGCTGCATCCGGAGTACTACAAGAAGTATGATGACACCCGAGCTTTGCT
3513	CCGAGAGCTGCATCCGGAGTACTACAAGAAGTATGATGACACCCGAGCTTTGCT
3510	CCGAGAGCTGCATCCGGAGTACTACAAGAAGTATGATGACACTGAGCTTTGCT
3508	CCAAGAGCTGCATCCGGAGTACTACAAGAAGTATGATGACACCCGAGCTTTGCT
3507	CCGAGAGCTGCATCCGGAGTACTACAAGAAGTATGATGACACTGAGCTTTGCT
3503	CCGAGAGCTGCATCCGGAGTACTACAAGAAGTATGATGACACTGAGCTTTGCT
3502	CCGAGAGCTGCATCCGGAGTACTACAAGAAGTATGATGACACCCGAGCTTTGCT ** ***** ***** *****
3521	ACAACGGACTTTCCGGGGTAA
3520	ACAAGGGACGTTCCGGGGTAA
3513	ACAAGGGACTTTCCGGGGTAA
3510	GCAAGGGACTTTCCGGGGTAA
3508	ACAAGGGACTTTCCGGGGTAC
3507	GCAAGGGACTTTCCGGGGTAA
3503	GCAAGGGACTTTCCGGGGTAA
3502	ACAAGGGACTTTCCGGGGTAA *** **** *****

Figura 19: Alineamiento de secuencias de aminoácidos de los alelos de nef del paciente 2 a tiempo final

Clon	Secuencia
3521	MGGKWSKRSRD-WTDVREMRRAEPQAEPAAAGVGAVSRDLERHGAITSS
3520	MGGKWSKHSRDRWTDVREMRRAEPQAEPAAAGVGAVSRDLERHGAITSS
3513	MGGKWSKRSGRWTDVREMRRAEPQAEPAAAGVGAVSRDLERHGAITSS
3510	MGGKWSKRSEGRWTDVREMRRAEPQAEPAAAGVGAVSRDLERHGAITSS
3508	MGGKWSKRSGNK-TAVKKKIKRAKPAKPAARVEAVSQNLKRHRITSS
3507	MGGKWSKRSKD--TDVKERMRAEPQAEPAAAEVAVSRDLERHRITSS
3503	MGGKWSKRSGRWTTVREMRQAEPQAEPAAAGVGAVSRDLERHGAITSS
3502	MGGKWSKRSGRWTTVREMRPAKPLSQRLVGSQVSRDLERHGAITSS *****.* * * . . . * ** **..* ** *****
3521	NTNNAACAWLEAQEEEEVGFVVKPQVPLRPMTYKGAVDLSHFLREKGGLE
3520	NTNNAACAWLEAQEEEEVGFVVRPQVPLRPMNYKGALDLSHFLKEKGGLE
3513	NTNNAACAWLEAQEEEEVGFVVRPQVPLRPMNYKGALDLSHFLKEKGGLE
3510	NTNNAACAWLEAQEEEEVGFVVRPQVPLRPMTYKGAVDLSHFLKEKGGLE
3508	NTNNAACAWLKAQEKKKVGFVVKPQVPLRPITYKEALDLSHFLKEKGGLE
3507	NTNNAACAWLEAQEEEEVGFVVRPQVPLRPIDYKRAVDLSHFLKEKGGLE
3503	NTNNAACAWLEAQEEEEVGFVVRPQVPLRPMNYKGALDLSHFFKRRGGLE
3502	NTNNAACAWLKAQEEEEVGFVVRPQVPLRPMNYKGALDLSHF-KKRGGLE ***** ** *****.***** ** * ***** . ****
3521	GLIYSQKRQDILDWVYHTQGYFPDQNYTPGPRDRDSLTFGWCFLVVPV
3520	GLIYSQKRQDILDWVYHTQGYFPDQNYTPGPGIRFPLTFGWCFLDPV
3513	GLIYSQKRQDILDWVYHTQGYFPDQNYTPGPGIRFPLTFGWCFLVVPV
3510	GLIYSQKRQDILDWVYHTQGYFPDQNYTPGPGTRFPLTFGWCFLVVPV
3508	GLIYSQKRQDILD-VYHTQEYFPNQNYTPGPGIRYPLTLEWCFLVVPV
3507	GLIYSQKRQDILD-VYHTQGYFPDQNYTPGPGARFPLTFGWCFLVVPV
3503	GLIYSQKSHDIFDLWVYHTQGYFPDQNYTPGPGIRFPLTFGWCFLVVPV
3502	GLIYSQKRQDILDWVYHTQGYSPDQNYTPGPGIRFPLTFGWCFLVVPV ***** .**.* ***** * * . ***** * .**.* ***** **
3521	SP---EKVEEANEGENNSLLHPMSLHGMDPEKEVLQWKFDLSRLAFHHVA
3520	EPIEPEKIEEANEGENNSLLHPMSLHGMDPEKEVLQWKFDLSRLAFHHMA
3513	---EPEKIEEANEGENNSLLHPMSLHGMDP-KEVLQWKFDLSRLAFHHMA
3510	---EPEKVEEANEGENNSLLHPMSLHGMDDPEREAQWKFDLSRLAFHHVA
3508	---EPEKIEEANKEENNSLLHPMSLHGMDNPEKEVLQWKFNLSRLAFHHMA
3507	---EPEKVEEANEGEGNSVLHPMSLHGMDPEKEVLQWKFDLSRLAFHHVA
3503	---EPEKIEEANEGENNSLLHPMSLHGMDPEKEVLQWKFDLSRLAFHHVA
3502	---EPEKIEEANEGENNSLLHPMSLHGMDPEKEVLQWKFDLSRLAFHHMA **.* ***** * **.* *****.* * *****.* *****.*
3521	RELHPEYYKN
3520	RELHPEYYKN
3513	RELHPEYYKN
3510	RELHPEYYKN
3508	QELHPEYYKN
3507	RELHPEYYKN
3503	RELHPEYYKN
3502	RELHPEYYKN .*****

Figura 20: Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de los distintos alelos *nef* del paciente 1 a tiempo inicial.

Clon	Secuencia
801	MGGKWSKRSVGGWPAVRERMRRTTEPAEPAADGVGAVSRDLEKHGAITNSN
805	MGGKWSKRSVGGWPAVRERMRRTTEPAEPAADGVGAVSRDLEKHGAITNSN
823	MGGKWSKRSVGGWPAVRERMRRTTEPAEPAADGVGAVSRDLEKHGAITSSN
821	MGGKWSKRSVGGWPAVRERMRRTTEPAEPAADGVGAVSRDLEKHGAITSSN
820	MGGKWSKRSVGGWPAVRERMRRTTEPAEPAADGVGAVSRDLEKHGAITSSN
812	MGGKWSKRSGGGWPAVRERMRRTTEPAEPAADGVGAVSRDLEKHGAITSSN
804	MGGKWSKRSMGGWPAVRERMRRTTEPAEPAADGVGAVSRDLEKHGAITNSN
802	MGGKWSKRSVGGWPAVRERMRRTTEPAEPAADGVGAVSRDLEKHGAITNSN ***** .***** .***** .**
801	TAANNAACAWLEAQEEEEVGFVPRPQVPLRPMTYKGAVDLSHFLKEKGGL
805	TAANNAACAWLEAQEEEEVGFVPRPQVPLRPMTYKGAVDLSHFLKEKGGL
823	TAANNAACAWLEAQEEEEVGFVPRPQVPLRPMTYKGAVDLSHFLKEKGGL
821	TAANNADCAWLEAQEDEEVGFVPRPQVPLRPMTYKGAVDLSHFLKEKGGL
820	TAANNAACAWLEAQEEEEVGFVPRPQVPLRPMTYKGAVDLSHFLKEKGGL
812	TAANNAACAWLEAQEEEEVGFVPRPQVFPFRPMTYKGAVDLSHFLKRKGGL
804	TAANNAACAWLEAQEEEEVGFVPRPQVPLRPMTYKGAVDLSHFLKEKGGL
802	TAANNAACAWLEAQEEEEVGFVPRPQVPLRPMTYKGAVDLSHFLKEKGGL ***** .***** .***** .***** .****
801	EGLIYSQKRQDILDLWVYHTQGYFPDWQNYTPGPGVRYPLTFGWCFKLVP
805	EGLIYSQKRQDILDLWVYHTQGYFPDWQNYTPGPGVRYPLTFGWCIKLVP
823	EGLIYSQKRQDILDLWVYHTQGYFPDWQNYTPGPGVRYPLTFGWCIKLVP
821	EGLIYSQKRQDILDLWVYHTQGYFPDWQNYTPGPGVRYPLTFGWCIKLVP
820	EGLIYSQKRQDILDLWVYHTQGYFPDWQNYTPGPGVRYPLTFGWCIKLVP
812	EGLIYSQKRQDILDLWVYHTQGYFPDWQNYTPGPGVRYPLTFGWCIKLVP
804	EGLIYSQKRQDILDLWVYHTQGYFPDWQNYTPGPGVRYPLTFGWCIKLVP
802	EGLIYSQKRQDILDLWVYHTQGYFPDWQNYTPGPGVRYPLTFGWGIKLVP ***** .***** .***** .***** .****
801	VEPDKVEEANEGENNSLLHPMSLHGMDPEKEVLQWKFDLSRLAFHHMARE
805	VEPDKVEEANEGENNSLLHPMSLHGMDPEKEVLQWKFDLSRLAFHHMARE
823	VEPDKVEEANEGENNSLLHPMSLHGMDPEKEVLQWKFDLSRLAFHHMARE
821	VEPDKVEEANEGENNSLLHPMSLHGMDPEKEVLQWKFDLSRLAFHHMARE
820	VEPDKVEEANEGENNSLLHPMSLHGMDPEKEVLQWKFDLSRLAFHHMARE
812	VEPDKVEEANEGENNSLLHPMSLHGMDPEKEVLQWKFDLSRLAFHHMARE
804	VEPDKVEEANEGENNSLLHPMSLHGMDPEKEVLQWKFDLSRLAFHHMARE
802	VEPDKVEEANEGENNSLLHPMSLHGMDPEKEVLQWKFDLSRLAFHHMARE ***** .***** .***** .**** .*****
801	LHPEYYKNC
805	LHPEYYKNC
823	LHPEYYKNC
821	LHPEYYKNC
820	LHPEYYKNC
812	LHPEYYKNC
804	LHPEFYKNC
802	LHPEYYKNC **** .****

Figura 21: Alineamiento de secuencias de aminoácidos de los alelos nef del paciente 1 a tiempo final.

```

122      MGGKWSKRSVGGWPAVRERMRRTEP-AEPAADGGWEQYLVTWKNMAQLQV
121      MGGKWSKRSVGGWPAVRERMRRTEP-AEPAADGGWEQYLVTWKNMAQLQV
120      MGGKWSKRSGGGWPAVRERMRRTEP-AEPAAARGWEQYLVTWKNMEQLQI
110      MGGKWSKRSVDRWTA VRERMRRTEP-AEPAADGG-GQYLETWKNMAQLQV
107b     MGGKWSKRSLGGWSAVRERMRRTEP-TEPAADGGWEQHLVTWKNMEQLQV
107a     MGGKWSKRSLGGWPAVRERMRRTEP-SEPAADGGWEQHLVTWKNMEQLQV
103      MGGKWSKRSVDRWTA VRERMRRRAEPQAEPAAAGGWEQYLETWKDMEQSQV
          ***** . * ***** . ** . ***** * * * * * . * * * .

122      AIQQLTMLLSAWLEAQEEEEVGFVPRPQVPLRPMTYKGAVDLSHFLKEKG
121      AIQQLTMLLSAWLEAQEEEEVGFVPRPQVPLRPMTYKGAVDLSHFLK-KG
120      AIQQLTMLLCAWLEAQEEEEVGFVPRPQVPLRPMTYKGAVDLSHFLKGDW
110      AIH--TLLTSTWLEAQEEGEVGFVPRPQVPLRPMTYKGAALDLSHFLKKG
107b     AIQQLTMLLCAWLEAQEEGEVGFVPRPQVPLRPMTYKETIDLSHSPKENQ
107a     AIQQLTMLLCAWLEAQEEGEVGFVPRPQVPLRPMTYKGTIDLSHSPKENQ
103      AIQ--TMLLSTWLEAQEEGEVGFVPRPQVPLRPMTYKGAALDLSHFLKKG
          ** . * * . ***** ***** . ***** *

122      GLKGLIYSQKRQDILDLDLVYHTQGYFPDWQNYTPGPGV-RYPLTFGWCYK
121      GTEGANYSQKRQDILDLDLVYHTQGYFPDWQNYTPGGLDRYPLTFGWCYK
120      KGRAI-YSQKRQDILDLDLVYHTQGYFPDWQNYTPGPGV-RYPLTFGWCYK
110      TGRA-NYSQKRQDILDLDLVYHTQGYFPDWQNYTPGPGV-RYPLTFGWCYK
107b     KRRA-NYSQKKKIDLDLDLVYHTQGYFLYWQNYTPGPGV-RYPLTFGWCYK
107a     KRRA-NYSQKKKIDLDLDLVYHTQGYFPYWQNYTPGPGV-RYPLTFGWCYK
103      TGRA-NYSQKRQDILDLDLVYHTQGYFPDWQNYTPGPGI-RYPLTLGWCFK
          . ***** . ***** . ***** . ***** . *

122      LVPVEPKVEEANEGENNSLLHPMSLHGMDDPEKEVLQWKFD SRLFHHM
121      LVPVEPKVEEANEGENNSLLHPMSLHGMDDPEREVLQWKFD SRLFHHM
120      LVPVEPKVEEANEGENNSFVHPMSLHGMDDPEKEVL-----
110      LVPVEPKVEEANEGENNSLLHPMSLHGMDDPEKEVLQWKFD SRLFHHM
107b     LVPVEPKVEEANEGENNSLLHPMSLHGMDDPEKEVLQWKFD SRLFHHM
107a     LVPVEPKVEEANEGENNSLLHPMSLHGMDDPEKEVLQWKFD SRLFHHM
103      LVPVEPEKIEEANEGENNSLLHPMSLHGMDDPEKEVLQWKFD SRLFHHM
          ***** . * ***** . ***** . ***** . *

122      ARELHPEYYKNC
121      ARELHPEYYKN-
120      -RSLTAA-----
110      ARELHPEYYKNC
107b     ARELHPEYYKD-
107a     ARELHPEYHKD-
103      ARELHPEYYKN-
          * * .

```

Figura 22: Alineamiento de secuencias de aminoácidos de los distintos alelos nef del paciente 2 a tiempo inicial

Clon	Secuencia
3336	MGGKWSKHSGDRWTA VRERM RRAEPQAEPAAAGV GAVSRDLERHGAI TSS
3335	MGGKWSKPSGDRWTA VRERM RRAEPQAEPAAAGV GAVSRDLERHGAI TSS
3334	MGGKWSKR SADRWPA VRERM RRAEPQAEPAAAGV GAVSRDLERHGAI TSS
3333	MGGKWSKRSGDRWTA VRERM RRAEPQAEPAAAGV GAVSRDLERHGAI TSS
3331	MGGKWSKRSGDRWTA VRERM RRAEPQAEPAAAGV GAVSRDLERHGAI TSS
3320	MGGKWSKRSGDRWTT VRERM RRAEPQAEPAAAGV GAVSRDLERHGAI TSS
3316	MGGKWSKRSVDRWTA VRERM RRAEPQAEPAAAGV GAVSRDLERHGAI TSS
3308	MGGKWSKRSGDRWTA VRERM RRAEPQAEPAAAGV GAVSRDLERHGAI TSS
3301	MGGKWSKHSGDRWTA VRERM RRAEPQAEPAAAGV GAVSRDLERHGAI TSS ***** * *** .***** .***** .***** .***** .***** .***** .*****
3336	NTNNAACAWLEAREEEEEVGF PVPKQVPLRPMTYK GALDLSHF -KRRGGLE
3335	NTNDAACAWLEAQEEEEEVGF PVRPQVPLRP MNYK GALDLSHF LKKEGGLE
3334	NTNNAACAWLEAQEEEEEVGF PVRPQVPLRPMTYK GALDLSHF LKKEGGLE
3333	NTNNAACAWLEAQEEEEEVGF PVRPQVPLRPMTYK GALDLSHF LKKEGGLE
3331	NTNNAACAWLEAQEEEEEVGF PVRPQVPLRPMTYK GALDLSHF LKKEGGLE
3320	NTNNAACAWLEAQEEEEEVGF PVRPQVPLRP MNYK GALDLSHF LKKEGGLE
3316	NTNNAACAWLEAQEEEEEVGF PVRPQVPLRPMTYK GALDLSHF LKKEGG -P
3308	NTNNAACAWLEAQEEEEEVGF PVRPQVPLRP MNYK GALDLSHF LKKEGGLE
3301	NTNNAACAWLEAREEEEEVGF PVPKQVPLRPMTYK GALDLSHF LKKEGGLE *** .***** .***** .***** .***** .***** .***** .***** * .**
3336	ALIYSQKRQDILD L--WVYHTQG YFPDWQNYTPGPG IRFPLTFGWCFKLV
3335	GLIYSQKRQDILD L--WVYHTQG YFPDWQNYTPGPG IRFPLTFGWCFKLV
3334	GLIYSQKRQDILD L--WVYHTQG YFPDWQNYTPGPG IRYPLTFGWCFKLV
3333	GLIYSQKRQDILD L--WVYHTQG YFPDWQNYTPGPG IRYPLTFGWCFKLV
3331	GLIYSQKRQDILD L--WVYHTQG YFPDWQNYTPGPG IR--LTFGWCFKLV
3320	GLIYSQKRQDILD L--WVYHTQG YFPDWQNYTPGPG IRFPLTFGWCFKLV
3316	GRGISPKKDKI S L ICGSTTHKDTSL IGR TTH -QGQSDTHL TLGWCFKLV
3308	GLIYSQKRQDILD L--WVYHTQG YFPDWQNYTPGPG IRYPLTLGWCFKLV
3301	GLIYSQKRQDILD L--WVYHTQG YFPDWQNYTPGPG IRFPLTFGWCFKLV . * * . * . * * * ** .*****
3336	PVTPYEPAWDGP GERSVTVEVQ PPSISSRG PRAASGV LQ-----EL
3335	PVEPEKI--E ANEGENNSLLHPMS LHGMDD- PEKEVLQWKFSRLAFHH
3334	PVEPEKI--E ANEGENNSLLHPMS LHGMDD- PEKEVLQWKS DSR LAFHH
3333	PVEPEKI--E ANEGENNSLLHPMS LHGMDD- PEKEVLQWKS DSR LAFHH
3331	PVEPEKI--E ANEGENNSLLHPMS LHGMDD- PEKEVLQWKS DSR LAFHH
3320	PVEPEKI--E ANEGENNSLLHPMS LHGMDD- PEKEVLQWKFSRLAFHH
3316	QVEPEKI--E ANEGENNSLLHPMS LHGMDD- PEKEVLQWKFSRLAFHH
3308	PVEPEKI--E ANEGENNSLLHPMS LHGMDD- PEKEVLQWKFSRLAFHH
3301	PVEPEKI--E ANEGENNSLLHPMS LHGMDD- PEKEVLQWKFSRLAFHH * * . . . * . . . * ***

Clon	Secuencia
3336	MTPSFLQGTFRG
3335	VARELHPEYYKN
3334	MARELHPEYYKN
3333	MARELHPEYYKN
3331	MARELHPEYYKN
3320	VARELHPEYYKN
3316	MARELHPEYYKN
3308	MARELHPEYYKN
3301	VARELHPEYYKN

Relación entre la carga viral, progresión de la enfermedad y variabilidad genética

Como se observa en la figura 14, ambos pacientes son equiparables en carga viral y en nivel de variabilidad inicial. Sin embargo el paciente 1 presenta un gran incremento de la carga viral después de 15 meses de evolución. No existe relación entre la progresión clínica y el nivel de variabilidad inicial ni final. Si alguna diferencia en el porcentaje de provirus defectivos, el paciente 1 tiene un 10% de provirus defectivos para *nef* a tiempo inicial y un 12% a tiempo final. El paciente 2 tuvo un 12% y 25% respectivamente. Con respecto al análisis cualitativo de los cambios observados, vemos que aparecen muchas mutaciones no-sinónimas frente a mutaciones sinónimas. Revelando una gran presión selectiva para el cambio de aminoácido (Tabla 5)

Tabla 5: Resumen de cambios cualitativos de secuencia en el gen *nef* antes y después de 15 meses de seguimiento.

Paciente	Cambios nucleòtido	%	Cambios aminoàcidos	%	Mutaciones		Mutaciones	
					S	% mutaciones S	NS	% mutaciones NS
1 T=0	34	5,39	8	3,86	3	22	11	78
1 T=F	94	14,2	48	22	16	29	41	71
2 T=0	36	5,71	21	10	6	25	18	75
2 T=F	101	21	68	32	7	16	35	84

Evolución intraindividual

Discusiò

La frecuencia de mutaciones està relacionada con la tasa de errores en la incorporaciòn de nucleòtidos por parte de la maquinaria de replicaciòn del material genètico y con el nùmero de ciclos replicativos llevados a termino por el virus. Los niveles de varibilidad genètica en estos dos pacientes son semejantes en los dos tiempos estudiados, lo que sugiere que ambos han pasado por un nùmero semejante de eventos de replicaciòn. Sin embargo la carga viral es muy distinta y la situaciòn clìnica tambièn. Este hecho podria revelar que el paciente no-progresor aunque presenta unos niveles de replicaciòn viral semejantes a los del individuo progresor, tiene una mayor capacidad para eliminar virus dependiente de una mejor respuesta inmunitaria específica. Las poblaciones virales màs heterogèneas son apriori màs adaptables a un ambiente cambiante y pudiesen tener cierta relaciòn con una mayor velocidad de progresiòn de la enfermedad. Sin embargo los datos del anàlisis de secuencias de dos pacientes con una diferente dinàmica de la carga viral y diferente grado de progresiòn de la enfermedad, revelan que no existe una relaciòn clara entre ambos paràmetros. Los dos pacientes tienen niveles comparables de heterogeneidad genètica antes y despuès del seguimiento. Parece ser el tiempo el ùnico factor determinante de la evolucion viral. El tamaño de la poblaciòn no parece tener relaciòn con la velocidad de evolucion viral.

Un dato a destacar es que el paciente no-progresor tiene hasta un 25% de los provirus defectivos para nef, se han comunicado datos () sobre pacientes no progresores a largo plazo que presentan genes nef defectivos, sin embargo no parece que este sea el caso, ya que el resto de los alelos analizados tienen una secuencia consenso Nef correcta.

Capítulo 3

Evolución de la carga proviral en pacientes tratados con AZT

La información sobre la evolución de la carga viral obtenida a partir de los pacientes que no recibieron tratamiento farmacológico, permite determinar el efecto del AZT sobre la dinámica de replicación viral. Se estudiaron dos grupos de pacientes, el primero de los cuales eran 8 individuos inicialmente sometidos a placebo y que después se trataron con AZT y que recibieron 250 mg del fármaco cada 8 horas, excepto los pacientes 10 (500 mg/12 horas) y 18 (250 mg/12 horas). Este grupo nos permite comparar la dinámica de cambio de la carga proviral directamente antes y después del tratamiento en los mismos pacientes. El segundo grupo estuvo constituido por 12 pacientes que no recibieron placebo en ningún momento y desde el inicio del seguimiento tomaron AZT a una dosis de 500 mg de AZT cada 12 horas.

Efecto de la terapia con AZT sobre la evolución de la carga proviral

La evolución de la carga proviral, r y niveles de linfocitos CD4+ de los pacientes que recibieron AZT están representados en la tabla 5. Los pacientes que recibieron AZT desde el inicio del seguimiento tenían niveles de linfocitos CD4+ al inicio del estudio similares a los del grupo placebo ($P= 0.58$) y una mayor carga viral (aunque no estadísticamente significativa) ($P=0,58$, tabla 5). Sin embargo el valor de la tasa intrínseca de crecimiento fue menor en el grupo de AZT que en el de placebo, aunque con una mayor desviación estándar, figura 14. El descenso medio observado del valor de r en el grupo AZT no fue estadísticamente significativo ($p=0,477$) cuando fue comparado con el test no-paramétrico de Mann-Whitney.

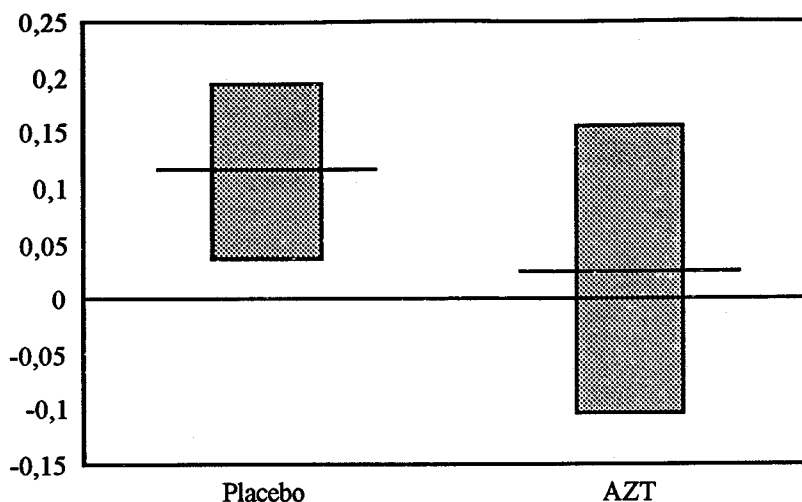


Figura 14: Descenso medio de r en el grupo tratado con AZT comparado con placebo. Media \pm desviación estándar.

Todos los pacientes tratados con AZT fueron incluidos en tres grupos dependiendo de si el valor de r alcanzado después de varios meses de tratamiento con AZT estaba o no dentro del intervalo de confianza de la carga proviral definido para el grupo de placebo. Así 7 pacientes presentaron valores de r situados por debajo del intervalo de confianza, y 12 tenían valores dentro del intervalo y 3 por encima.

Tabla 5: Cambios en la carga viral y en la tasa intrínseca de crecimiento en los pacientes tratados con zidovudina después de un periodo en placebo (pacientes 4-22). Y pacientes tratados con AZT desde el inicio del seguimiento (pacientes 23-34). CPV: Carga proviral al inicio del seguimiento (CPV0) y a los 15 meses (aproximadamente) (CPV1). R1: tasa intrínseca de crecimiento para el periodo de estudio, T1: tiempo de seguimiento de los pacientes, RT215: genotipo en el codon 215 de la transcriptasa inversa, S: Silvestre (Treonina) y M: Mutante (Tirosina o fenilalanina).

Pacientes tratados con AZT después de placebo						
Paciente	CD4/ml inicio	CPV 0	CPV1	R1	T1	RT 215
4	307	43,8	23,88	-0,04	15	S
9	835	43,8	1,25	-0,237	15	S
10	609	13,27	2,92	-0,138	11	S
11	258	1,56	120,8	0,29	15	M
14	469	42,72	25,83	-0,021	24	S
15	139	63,8	114,84	0,037	16	M
18	235	7,21	8,85	0,014	15	S
20	262	58,75	151	0,063	15	M
21	209	319,58	5813,84	0,193	15	M
22	157	12,64	1706,66	0,350	14	M
Pacientes tratados con AZT desde el inicio del seguimiento						
Paciente	CD4/ml inicio	CPV 0	CPV1	R1	T1	RT 215
23	1365	0,14	1,76	0,169	15	S
24	834	24,31	7,41	-0,079	15	S
25	807	24,62	35,07	0,024	15	S
26	733	3,79	0,86	-0,099	15	S
27	554	4,62	1,71	-0,066	15	S
28	523	33,42	31,00	-0,005	15	M
29	492	19,00	22,18	0,010	15	S
30	480	3,8	13,44	0,084	15	M
31	426	14,44	4,77	-0,092	12	S
32	411	2,17	0,75	-0,071	15	S
33	375	0,78	3,52	0,1	15	S
34	256	50,10	188,74	0,088	15	M

Evolución de la carga proviral en pacientes tratados con AZT con un periodo previo de placebo

La dinámica de la carga proviral en este grupo de pacientes está representada en la tabla 5. Se observa que 7 de 10 pacientes presentaron descensos de la tasa intrínseca de crecimiento de la carga proviral. Los otros 3 pacientes experimentaron un incremento muy notable de la r que en algún caso como en el paciente 22 llegó a multiplicarse por 29000, figura 17. El valor medio de r fue de $0,101 \pm 0,084$ en placebo y $0,059 \pm 0,192$ después del tratamiento. Esta reducción del valor de r no fue estadísticamente significativa ($P=0,56$). De estos pacientes 2 tuvieron valores de r por debajo del intervalo de confianza, 5 dentro y 3 por encima. De los 10 pacientes seguidos 6 presentaron síntomas de progresión de la enfermedad (pacientes 11, 15, 18, 20, 21, 22).

Relación entre la mutación de resistencia al AZT en el codón 215 de la transcriptasa inversa y la respuesta virológica a la terapia

Durante los 15 meses aproximadamente que los pacientes estuvieron en tratamiento con AZT se analizaron muestras de ADN para detectar por PCR la aparición de virus con la mutación T215Y/F en el gen de la transcriptasa inversa del virus, que produce resistencia al AZT (). Se detectó la presencia de virus mutantes en un total de 8 pacientes (tabla 5). Ninguno de los cuales presentó un valor de r por debajo del intervalo de confianza, 5 estuvieron dentro y 3 por encima. El valor de r fue positivo en 7 de 8 de los pacientes con virus mutantes (88%), pero sólo en 5 de los 14 pacientes (36%) que no desarrollaron mutantes. El valor de r fue estadísticamente significativamente más alto en el grupo con virus mutantes que en de virus silvestres ($p=0,02$), figura 15.

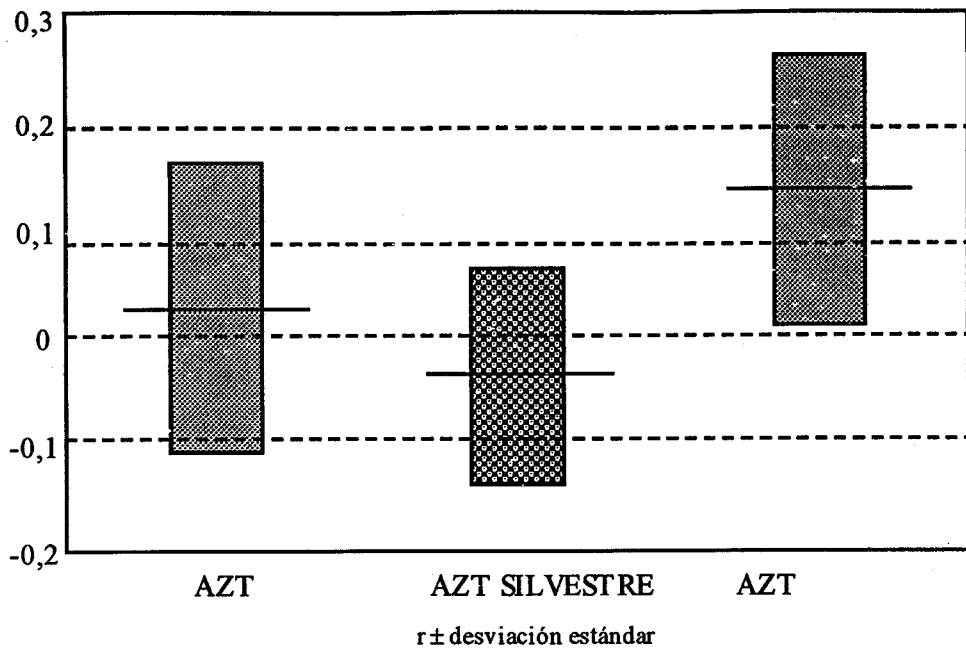


Figura 15: Valores de r en pacientes que desarrollaron cepas mutantes en el codón 215 (AZT mutante) y aquellos que se mantuvieron silvestres (AZT silvestre). En la primera línea se representa el valor medio de todos los pacientes que tomaron AZT.

El desarrollo de virus mutantes estuvo fuertemente asociado a peor situación clínica, todos los pacientes con virus mutantes (8 en total) fueron diagnosticados de enfermedad progresiva. Por el contrario, tan solo 2 pacientes con virus silvestres progresaron clínicamente ($p < 0,01$), figura 16.

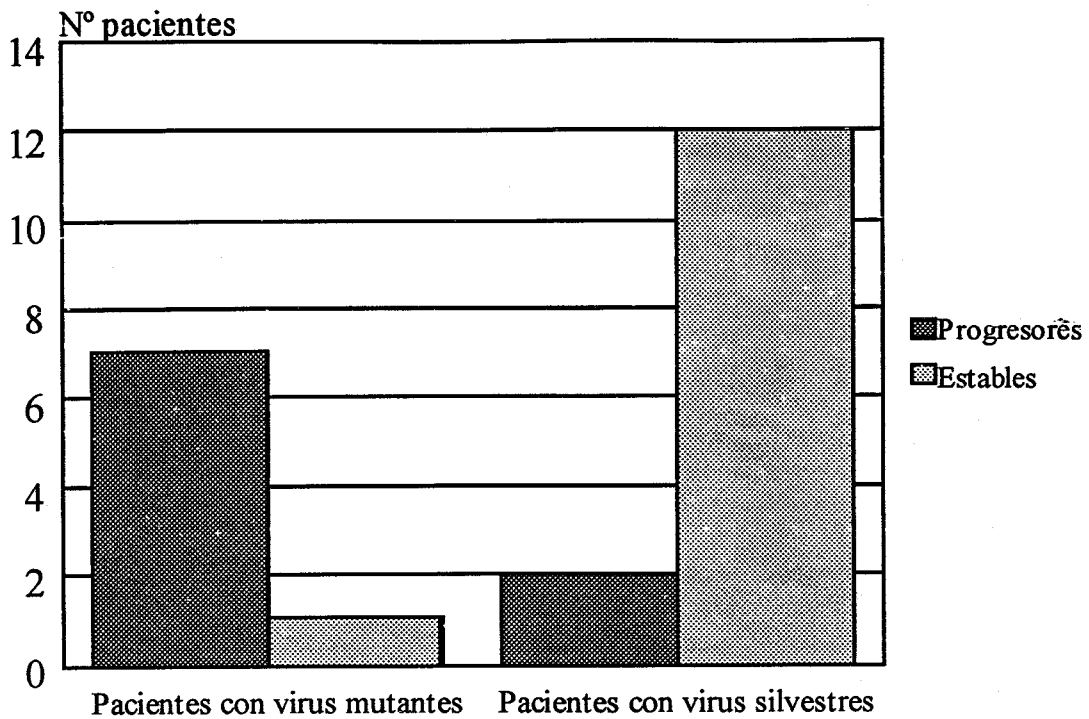


Figura 16: Relación entre la detección de cepas mutantes en el codón 215 y la enfermedad progresiva.

También es de destacar que los pacientes con cepas mutantes comenzaron el tratamiento con menor nivel de linfocitos CD4+ ($P < 0,01$) y con mayor carga proviral, aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa ($P = 0,12$). Cuando comparamos la evolución de los pacientes sometidos a tratamiento después de placebo, se observa que los pacientes que desarrollaron virus mutantes presentan un valor de r media mayor que en placebo. Tres de los pacientes con cepas virales mutantes tuvieron incrementos muy elevados del valor de r durante el tratamiento con AZT, y otros dos presentaron descensos, pero de baja cuantía. La diferencia aunque notable, no alcanzó significación estadística, figura 17.

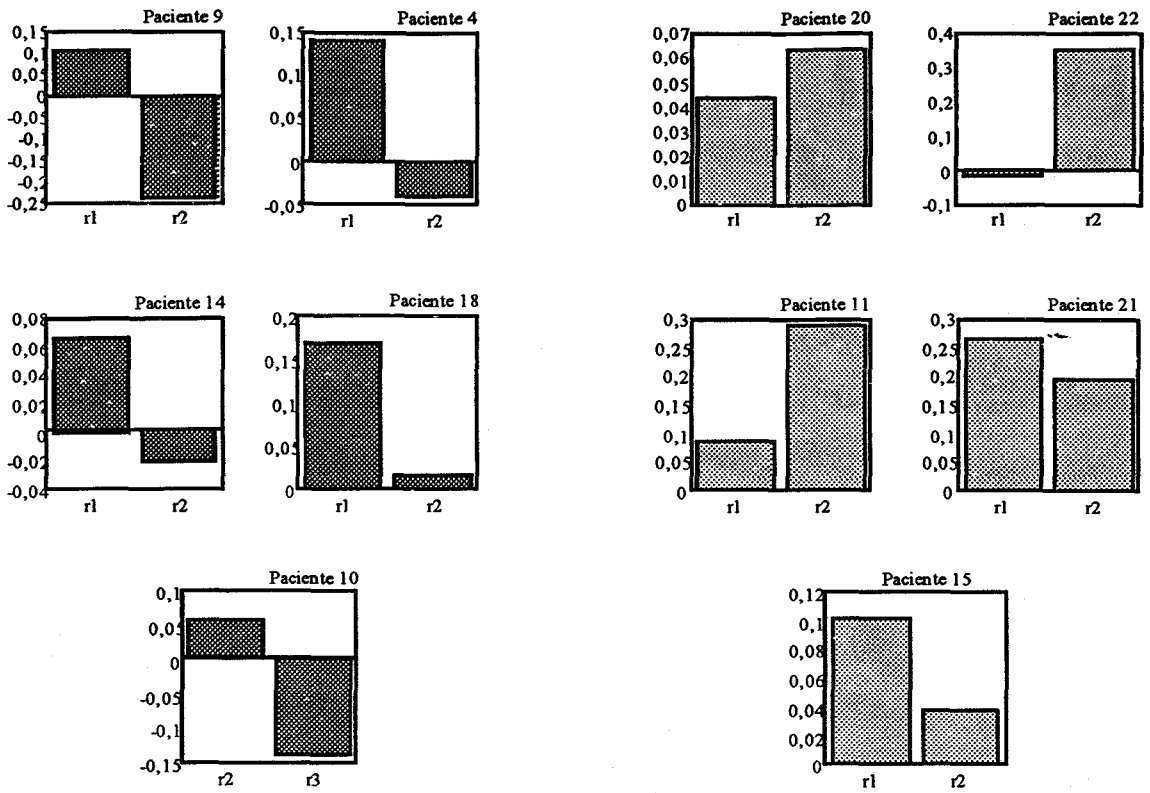


Figura 17: Comparación de r durante placebo (r1) y después de 15 meses de media en AZT (r2), para pacientes con cepas mutantes en el codón 215 (color claro) y silvestres (color oscuro).

Relación entre respuesta al tratamiento con AZT y estadio inmunológico

Los pacientes que iniciaron el tratamiento con unos niveles de linfocitos CD4+ > 500/ml tuvieron una respuesta positiva, desde el punto de vista virológico y clínico, no se observó una frecuencia alta de pacientes con virus mutantes. Los pacientes con unos niveles de linfocitos CD4+ de entre 500-300/ml tuvieron un comportamiento moderado, pero aquellos pacientes que iniciaron la terapia con menos de 300 linfocitos CD4+/ml tuvieron la peor respuesta clínica, acumulando la mayor frecuencia de pacientes con virus mutantes, y sufriendo los mayores incrementos de la carga proviral, figura 18. La probabilidad de desarrollar virus mutantes está relacionado con el número de linfocitos CD4+ ($p < 0,01$) y la carga viral al comienzo del tratamiento ($p < 0,01$), figura 18.

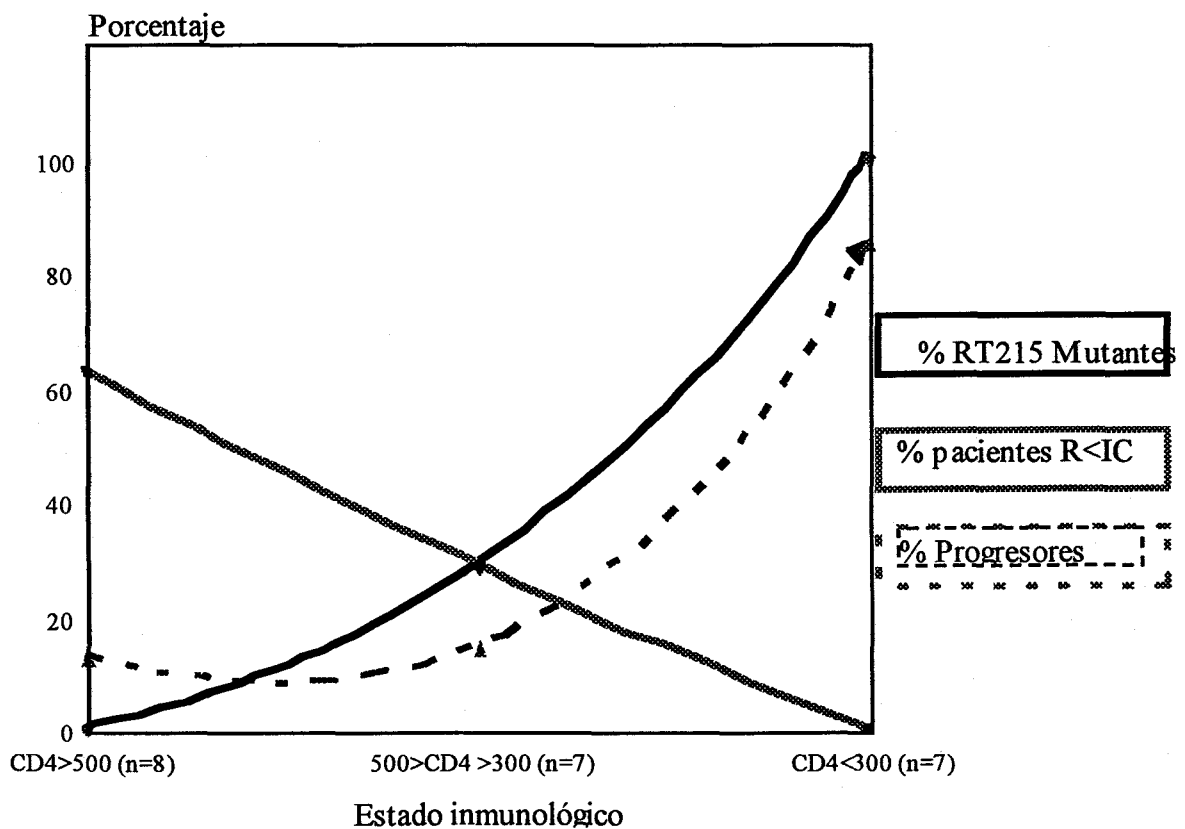


Figura 18: Respuesta antiviral en terapia temprana y tardía. IC: Intervalo de confianza definido para placebo.

Discusión

La información generada por el estudio de la historia natural de la infección por el HIV-1 permitió comprobar el efecto virológico del AZT en pacientes tratados con este fármaco. Se observó un descenso medio de r en los pacientes tratados con respecto a los sometidos a placebo, pero no fue estadísticamente significativo. Esta falta de significación puede estar motivada por varios factores, como el pequeño número de pacientes estudiado, variabilidad introducida por el error de la técnica empleada en medir la carga viral, pero sobre todo por que los pacientes respondieron de manera muy diversa al tratamiento. Los pacientes se podrían agrupar en respondedores y no-respondedores al tratamiento. Los primeros eran aquellos que presentaron valores muy negativos de r , descendiendo por debajo del intervalo de confianza definido para placebo. Otros tuvieron un comportamiento totalmente distinto, en algunos pacientes no-respondedores los valores de r llegaron incluso a sobrepasar el intervalo de confianza definido para placebo, superando su valor más alto. Cuando los datos son tomados en conjunto, los valores de r en el grupo de pacientes no-respondedores enmascaran la buena respuesta del primer grupo.

El valor clínico de r es claro tanto en los pacientes sometidos a placebo como en los tratados con AZT. La enfermedad progresiva estuvo asociada claramente con la posición de los valores individuales de r en el intervalo de confianza definido para placebo, siendo significativo estadísticamente. El parámetro r tiene una gran potencia cuando se utiliza para monitorizar la respuesta de fármacos antivirales, aunque también tiene un valor relativo en la previsión de la progresión a SIDA en los pacientes no tratados.

Constatada la falta de eficacia virológica del AZT en el grupo de pacientes no-respondedores, cabría preguntarse por la causa de la misma. Se han argumentado dos razones principales que pueden afectar a la eficacia del AZT: mutaciones en el gen de la transcriptasa inversa viral y fenotipo viral (formador o no de sincitios en cultivo). Se estudió el posible papel de las mutaciones de resistencia al AZT en la pérdida de eficacia de la droga, encontrándose una fuerte asociación entre la presencia de virus mutantes y falta de respuesta al tratamiento.

La aparición de la mutación T→Y/F en el codón 215 de la transcriptasa inversa ha resultado estar significativamente asociada con una mala respuesta al AZT y con una progresión a SIDA más rápida, por ello es fundamental conocer que factores favorecen la aparición y selección de las cepas virales mutantes. La principal fuente de variación genética viral es la misma transcriptasa inversa que presenta una alta frecuencia de mutación, pudiendo intercalar un nucleótido erróneo de cada 10^4 (). Cada generación viral es más heterogénea que la anterior. La probabilidad de que espontáneamente se produzca la mutación de resistencia al AZT aumenta espectacularmente con la carga viral y con el número de ciclos de replicación viral. La presencia del fármaco no hace sino de agente de selección natural sobre una población heterogénea y permite la replicación ventajosa de los virus mutantes. Por ello como ha quedado demostrado, la mayor frecuencia de pacientes con cepas virales mutantes se encuentra entre los que tienen mayor carga viral y menor número de linfocitos CD4+.

Otro dato importante que se desprende de los resultados expuestos, es que algunos pacientes tratados con AZT tienen una evolución de la carga proviral peor que cuando estaban en placebo, figura 17. Este hecho sugiere que al menos en un porcentaje de pacientes con cepas virales mutantes, el AZT presenta un efecto negativo deletéreo. La falta de eficacia virológica de la droga por la presencia de virus mutantes no hace del AZT un equivalente a placebo. En estas condiciones el AZT podría perjudicar seriamente a estos pacientes aumentando la velocidad de progresión a SIDA.

El AZT fue originariamente diseñado como posible droga antitumoral () y en algunos casos presenta efectos secundarios adversos como supresión de la médula ósea () y disfunción en la hemopoyesis (), también está descrita una alteración en la inmunidad humoral asociada al uso de AZT (). La ADN polimerasa γ (mitocondrial) es altamente sensible y algunos tejidos pueden verse afectados muy negativamente por el fármaco (). Por ello, estos datos sugieren la posibilidad de que los efectos secundarios del AZT unidos a la propia patogénesis de la infección viral pudiesen ejercer un efecto aditivo o sinérgico en la progresión a SIDA de pacientes con cepas virales mutantes en el codón 215 de la transcriptasa inversa.

Todos estos datos muestran que en líneas generales el tratamiento con AZT da resultados positivos en el 50% de los pacientes aproximadamente. La falta de respuesta se asocia a unos bajos niveles de linfocitos CD4+ al inicio del la toma del fármaco, un alto nivel de carga viral y a la detección de virus mutantes en la transcriptasa inversa. Por todo ello estos datos sugieren que el inicio del tratamiento ha de ser lo más temprano posible, y que es importante monitorizar la respuesta de los pacientes al tratamiento mediante la medida de la carga viral y la detección de mutaciones de resistencia.

El AZT puede beneficiar a pacientes infectados por el HIV-1, reduciendo el riesgo de aparición de enfermedades oportunistas e incrementando los niveles de linfocitos CD4+ en pacientes con enfermedad avanzada (). Sin embargo la eficacia de esta droga disminuye con el tiempo, fundamentalmente por la aparición de variantes del virus con una menor sensibilidad al fármaco (). El DDI es otro análogo de nucleósido que bloquea la elongación de la cadena de ADN en síntesis (). Se ha demostrado que puede incrementar los niveles de linfocitos CD4+ y retrasar la progresión a SIDA en pacientes previamente tratados con AZT (). Pero al igual que el AZT, selecciona la aparición de virus resistentes, fundamentalmente por la mutación en el codón 74 de la transcriptasa inversa.

Existen varias consideraciones teóricas sobre el beneficio potencial que una terapia combinada de varias drogas pudiese tener sobre la replicación del HIV-1. Entre ellas destacarían: un efecto aditivo o sinérgico, reducción en la toxicidad, menor posibilidad de aparición de resistencias, ya que cada droga presenta un perfil de mutaciones distinto y no compartido. También pudiese ser importante el distinto metabolismo celular del AZT y del DDI. Que afectan a distintos tipos celulares con varios patrones de fosforilación de los precursores ().

Estudios pilotos previos () y resultados preliminares del ensayo clínico ACTG 175 () y del estudio DELTA (), han sugerido que la terapia combinada con AZT y DDI es más efectiva que la monoterapia con AZT. Un punto importante es que la mutación más común de resistencia al DDI en el codón 74 puede ser antagonista de la mutación en el codón 215 asociada a resistencia a AZT (). También se ha observado la aparición de mutaciones nuevas que confieren multiresistencia *in vitro* (). Sin embargo se necesitan más datos sobre el desarrollo de resistencias en terapia combinada y su relación con los cambios en la viremia, estado inmunológico y evolución clínica.

En este estudio se ha comparado la eficacia de la terapia combinada con AZT y DDI frente a AZT solo en pacientes sin tratamiento previo con ningún fármaco antiviral. Para ello se ha comparado la evolución de la carga viral en suero (medida por PCR cuantitativa) y los

niveles de linfocitos CD4+. Además se determinó por PCR específica de alelo la dinámica de aparición de mutaciones de resistencia al AZT y DDI. Intentando correlacionar el desarrollo de las mutaciones con la progresión de la enfermedad.

De acuerdo con las recomendaciones del panel de expertos del United States National Institute of Health () y la sociedad española interdisciplinaria del SIDA (), desde junio del año 1993, en la unidad de Medicina Interna del Hospital Universitario Virgen del Rocío se trataron con AZT (250 mg/12 horas) y DDI (200 mg/12 horas) todo individuo infectado por HIV-1 que reunía las siguientes características:

- Sin tratamiento previo con fármacos antivirales
- Menos de 300 linfocitos CD4+/ml de sangre

En el momento del estudio se seleccionaron de todos los pacientes tratados con terapia combinada 16 pacientes que presentaban los siguientes criterios:

1. Un nivel de linfocitos CD4+ menor de 300 células/ml de sangre en dos determinaciones independientes antes del inicio del tratamiento.
2. Ausencia de enfermedades oportunistas en el momento del inicio
3. Un seguimiento mínimo de 24 semanas sin interrupción de la terapia
4. Cumplimiento del tratamiento igual o mayor al 80 % y un incremento en el volumen corpuscular medio de al menos 10 fL. Este grupo se emparejó con otros 16 pacientes que recibieron AZT solo. Los criterios de emparejamiento fueron la edad, nivel de linfocitos CD4+ y categoría clínica definida por el CDC en 1993 (). Todos los pacientes fueron evaluados en carga viral, linfocitos CD4+ y parámetros clínicos cada 12 semanas. El seguimiento se prolongó hasta un máximo de 48 semanas.

Características basales de los pacientes

Los dos grupos de tratamiento eran comparables en edad, niveles de linfocitos CD4+ y estadio clínico (tabla 5). Además, otros parámetros no reflejados en la tabla, como la β 2-microglobulina y la proporción de pacientes con antigenemia para la proteína del core viral p24, también tenían valores similares en ambos grupos. Sin embargo, la carga viral en suero antes del tratamiento fue significativamente más alta en el grupo de pacientes tratados con AZT y DDI (tabla 5). Todos los pacientes excepto uno del grupo de terapia combinada tenían niveles detectables de carga viral al inicio. Este paciente fue persistentemente negativo para carga viral durante el seguimiento y no fue incluido en los cálculos que incluían este parámetro. Es de destacar que este paciente aunque negativo para carga viral estaba realmente infectado, diagnóstico realizado por técnicas convencionales de serología y por PCR específica del gen *pol* del HIV-1.

Evolución de los parámetros virológicos e inmunológicos

Los valores de carga viral, niveles de linfocitos CD4+, peso, antigenemia para la proteína del core viral p24, niveles de β 2-microglobulina y estadio clínico están representados en la tabla 6 para los pacientes que recibieron AZT y en la tabla 7 para los que recibieron terapia combinada de AZT + DDI. En líneas generales ambos grupos presentaron un patrón similar de respuesta, caracterizado por un descenso inicial de la carga viral y un ascenso en paralelo del nivel de linfocitos CD4+. Al final del periodo de estudio se observa una tendencia hacia los valores iniciales de todos los parámetros.

Cuando se compara la evolución de cada grupo con respecto a si mismo a tiempo inicial, se observa que el grupo de AZT presentó cambios significativos de carga viral en las semana 12, 24 y 36; el número de linfocitos CD4+ sufrió un incremento significativo en la semana 24. Al final del estudio los niveles de carga viral y linfocitos CD4+ estaban en un nivel similar al inicial, tabla 6 y figuras 19 y 20. El grupo de coterapia presentó una respuesta más intensa, los cambios de la carga viral con respecto a los valores iniciales fueron significativos durante todo

Tabla 6: Evolución de los pacientes tratados con monoterapia de AZT. * Definición del CDC en el año 1993, la carga viral está expresada en número de copias de ARN de HIV-1 por ml de suero. Ag p24: Antigenemia para la proteína del core viral p24, β 2-M: β 2-microglobulina. ND: No determinado.

Paciente	Semana	Peso	Estadío *	CD4+/ml	Ag p24	β 2-M	Carga Viral
13	0	67.8	B	139	N	2.11	16890
	12	67.7	B	114	N	2.95	1421
	24	66.2	B	202	N	1.46	9930
	36	65	B	178	N	2.1	7056
	48	64.2	B	154	N	1.59	36019
34	0	69	A	294	N	1.42	2596
	12	71.7	A	226	N	1	184
	24	71.5	A	317	N	1.61	913
	36	75	A	340	ND	1.78	460
	48	76	A	279	N	ND	384
39	0	70.3	C	200	P	2.7	166325
	12	71.3	C	470	P	2.07	62276
	24	68	C	320	P	2.52	73872
	36	66.4	C	190	P	2.74	45640
	48	67.5	C	220	P	2.38	458391
53	0	63.3	A	372	N	2.33	42029
	12	65.5	A	374	N	1.97	ND
	24	64.1	A	272	N	2.12	21221
	36	62.7	A	410	N	2.16	27870
	48	63.2	A	340	N	2.5	44964
55	0	73.3	A	205	N	1.7	13146
	12	76.1	A	228	N	1.51	3188
	24	73.8	A	334	N	1.71	2928
	36	ND	A	380	N	ND	10409
61	0	59.9	A	210	N	3.07	39232
	12	61.6	A	185	N	2.27	21651
	24	59.1	A	330	N	2.26	40307
64	0	46.7	C	20	P	3.14	61744
	12	54.2	C	40	P	2.19	18753
	24	48.5	C	20	P	1.99	23925
	36	49.4	C	20	P	0	25051

Tabla 6 (2): Evolución de los pacientes tratados con monoterapia de AZT. * Definición del CDC en el año 1993, la carga viral está expresada en número de copias de ARN de HIV-1 por ml de suero. Ag p24: Antigenemia para la proteína del core viral p24, β 2-M: β 2-microglobulina. ND: No determinado.

Paciente	Semana	Peso	Estadío *	CD4+/ml	Ag p24	β 2-M	Carga Viral
68	0	51	C	100	P	2.71	83398
	12	51.5	C	150	N	1.7	34273
	24	52	C	190	N	1.73	26447
	36	51.5	C	150	N	2.2	26737
	48	51.5	C	100	N	1.91	102894
69	0	71.7	A	169	N	2.8	14620
	12	74.1	A	110	N	ND	8477
	24	75	B	140	N	ND	8387
	36	ND	B	ND	N	ND	17888
76	0	53.3	C	40	P	2.82	336919
	12	57.3	C	55	P	3.04	155695
	24	58	C	20	P	2.69	6737
	36	52.7	C	10	P	2.55	ND
	48	47.5	C	1	P	2.61	139197
84	0	53.5	B	80	P	2.33	130955
	12	57.3	B	130	P	2.47	13378
	24	58	B	110	P	2.1	29622
	36	56.3	B	40	P	2.3	21213
	48	54.5	B	30	P	2.63	136175
89	0	66	A	104	P	2.31	295420
	12	72.5	A	244	P	1.98	23752
	24	69	A	310	N	2.32	22960
	36	70	A	230	ND	ND	ND
	48	72	A	240	P	1.93	106271
92	0	64.6	C	220	P	3.64	38739
	12	64.5	C	210	I	3.04	7868
	24	63.8	C	190	P	3.4	18832
	36	69	C	200	N	2.26	9376
	48	75.5	C	230	N	2.75	25442
103	0	76.8	A	42	P	ND	33471
	12	77.5	B	120	P	ND	27775
	24	82.3	B	101	P	ND	31977
	36	80.7	B	145	P	ND	73019
	48	78	B	28	P	ND	113209
116	0	66	B	200	P	3.35	20034
	12	71	B	430	N	2.71	14042
	24	74.5	B	428	N	2.9	3679
	36	0		384	N	ND	2842

Tabla 7: Evolución de los pacientes tratados con terapia combinada. * Definición del CDC en el año 1993, La carga viral está expresada en número de copias de ARN de HIV-1 por ml de suero. Ag p24: Antigenemia para la proteína del core viral p24, β 2-M: β 2-microglobulina.

Paciente	Semana	Peso	Estadio *	CD4+/ml	AGP24	β 2-M	Carga Viral
44	0	64	A	60	P	2.9	28642
	12	66	A	140	P	2.4	3502
	24	63	A	95	N	2.33	8075
	36	60.3	A	70	P	2.07	12347
	48	63	A	90	P	2.87	22399 \equiv
83	0	59.5	C	140	P	2.49	81454
	12	65.6	C	160	N	2.51	515
	24	70.5	C	140	N	2.15	8893
	36	70.6	C	280	N	2.7	11008
	48	68.5	C	135	N	2.61	11708
96	0	84.5	B	10	N	2.34	24689
	12	87	B	10	N	1.82	1882
	24	87.5	B	20	N	2.14	19905
	36	88	B	50	N	2.73	27596
	48	87	B	9	N	2.67	16486
100	0	71.5	C	120	N	3.25	150000
	12	75	C	190	N	2.03	820
	24	76.5	C	190	N	2.21	48059
	36	76	C	250	N	2.61	31551
	48	71	C	152	N	2.73	27433
113	0	58	A	270	N	1.22	73378
	12	62	A	290	N	0.99	INDETECTABLE
	24	62	A	420	N	0.97	1212
	36	ND	B	421	N	ND	INDETECTABLE
	48	ND	B	296	N	ND	INDETECTABLE
121	0	66.7	B	70	N	4.81	175103
	12	70.7	B	140	N	2.2	570
	24	71	B	244	N	2.24	338
	36	73	B	208	N	2.25	INDETECTABLE
	48	74	B	265	N	2.25	INDETECTABLE

Tabla 7 (2): Evolución de los pacientes tratados con terapia combinada. * Definición del CDC en el año 1993, La carga viral está expresada en número de copias de ARN de HIV-1 por ml de suero. Ag p24: Antigenemia para la proteína del core viral p24, β 2-M: β 2-microglobulina.

Paciente	Semana	Peso	Estadio *	CD4+/ml	AGP24	β 2-M	Carga Viral
124	0	56.4	B	140	P	3.33	98837
	12	60.5	B	290	N	2.64	ND
	24	58	B	341	N	2.49	19350
	36	57.4	B	254	P	2.53	ND
	48	58.5	B	253	P	3.8	58929
136	0	61.5	C	40	P	3.78	2424756
	12	73	C	160	P	3.03	2054608
	24	71.5	C	106	P	2.11	54198
	36	71	C	102	P	ND	ND
	48	74	C	98	P	2.54	88929
138	0	58	A	290	P	2.72	61624
	12	58.5	A	339	P	1.88	21289
	24	62	A	306	N	1.64	15911
	36	60	A	358	N	1.72	3354
	48	60.5	C	236	P	ND	15636
144	0	76	C	10	P	3.35	323827
	12	87.5	C	255	N	2.2	14299
	24	95	C	514	N	2.04	56050
	36	98	C	548	N	2.93	76364
	48	96.5	C	184	ND	ND	90336
150	0	47.2	C	9	P	2.7	191258
	12	50	C	42	P	2.28	12740
	24	52	C	62	P	2.44	62649
	36	54	C	34	P	2.51	164462
158	0	89	B	212	P	2.79	25013
	12	91.7	B	56	N	2.02	192
	24	89.7	B	115	N	ND	INDETECTABLE
	36	ND	B	119	ND	ND	374
159	0	101.9	A	38	N	2.83	456875
	12	107.5	A	60	N	1.73	INDETECTABLE
	24	109.6	A	76	N	ND	189
	36	ND	A	66	N	ND	1607
164	0	56.5	A	93	P	3.07	87000
	12	58	A	132	N	1.28	INDETECTABLE
	24	ND	A	135	N	ND	INDETECTABLE

Cuando son comparados ambos grupos entre si, el descenso en la carga viral en el grupo de coterapia fue significativamente mayor que el de monoterapia en las semanas 12, 24 y 36, tabla 8 y figura 19. El ascenso del nivel de los linfocitos CD4+ fue significativamente más alto en el grupo de coterapia en la semana 36. En la semana 48, el grupo de coterapia presentaba unos niveles de linfocitos elevados un $+50 \% \pm 15$ con respecto al valor inicial, por el contrario el grupo tratado sólo con AZT presentó un descenso medio del $-18 \% \pm 18$, figura 20.

Cuando se analizó la intensidad del efecto antiviral, se observó que en el grupo tratado con coterapia 12 pacientes (80%) tuvieron descensos de carga viral mayores de una unidad logarítmica, frente a 4 (25%) de los tratados sólo con AZT, ($P < 0,001$, test de Fischer). Además, la terapia combinada llegó a hacer a la carga viral técnicamente indetectable en 5 (33 %) de los pacientes, frente a ninguno del grupo de monoterapia ($P < 0,01$, test de Fisher).

Figura 19: Evolución de la tasa de incremento de la carga viral r a lo largo del seguimiento en los dos grupos terapéuticos.

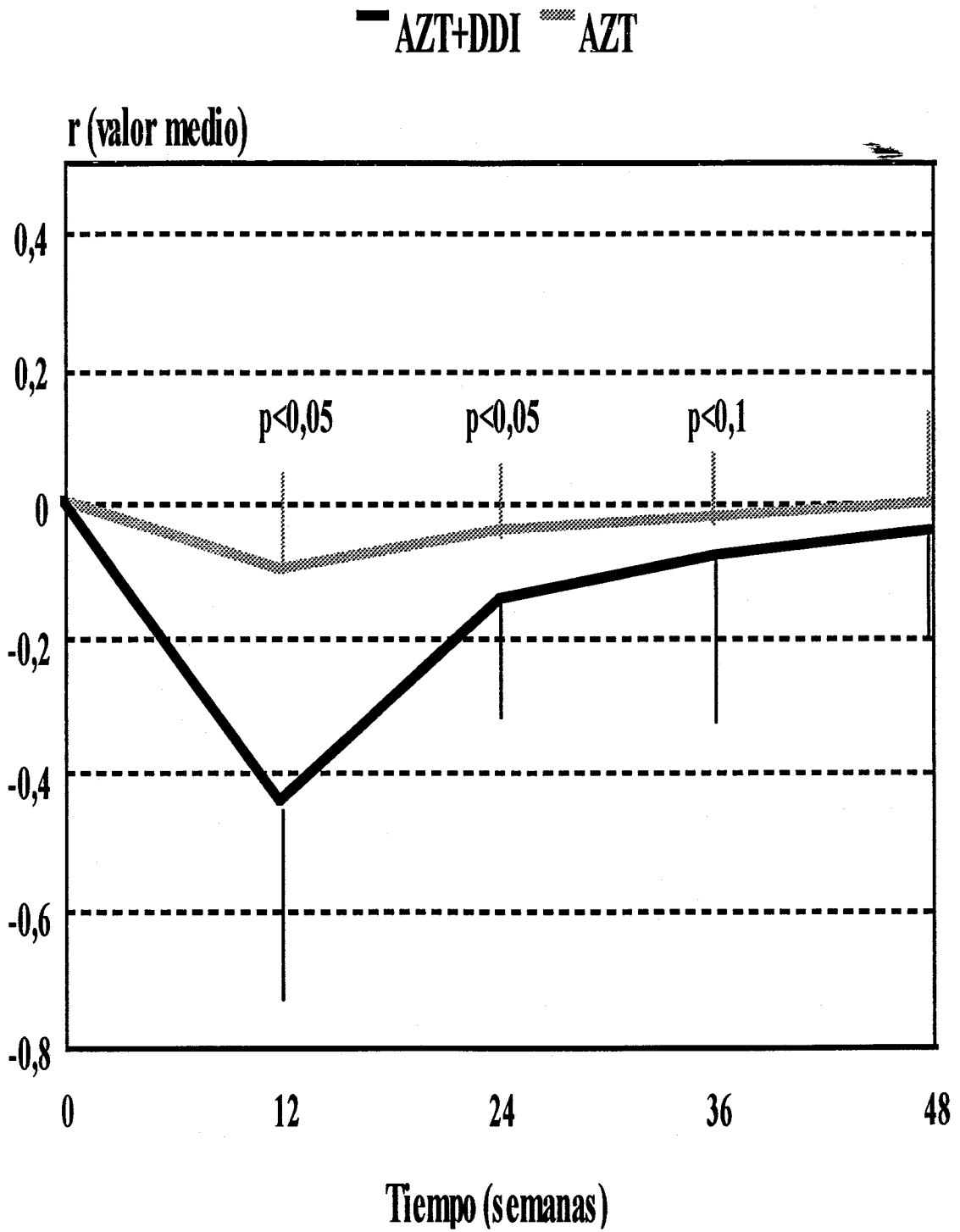
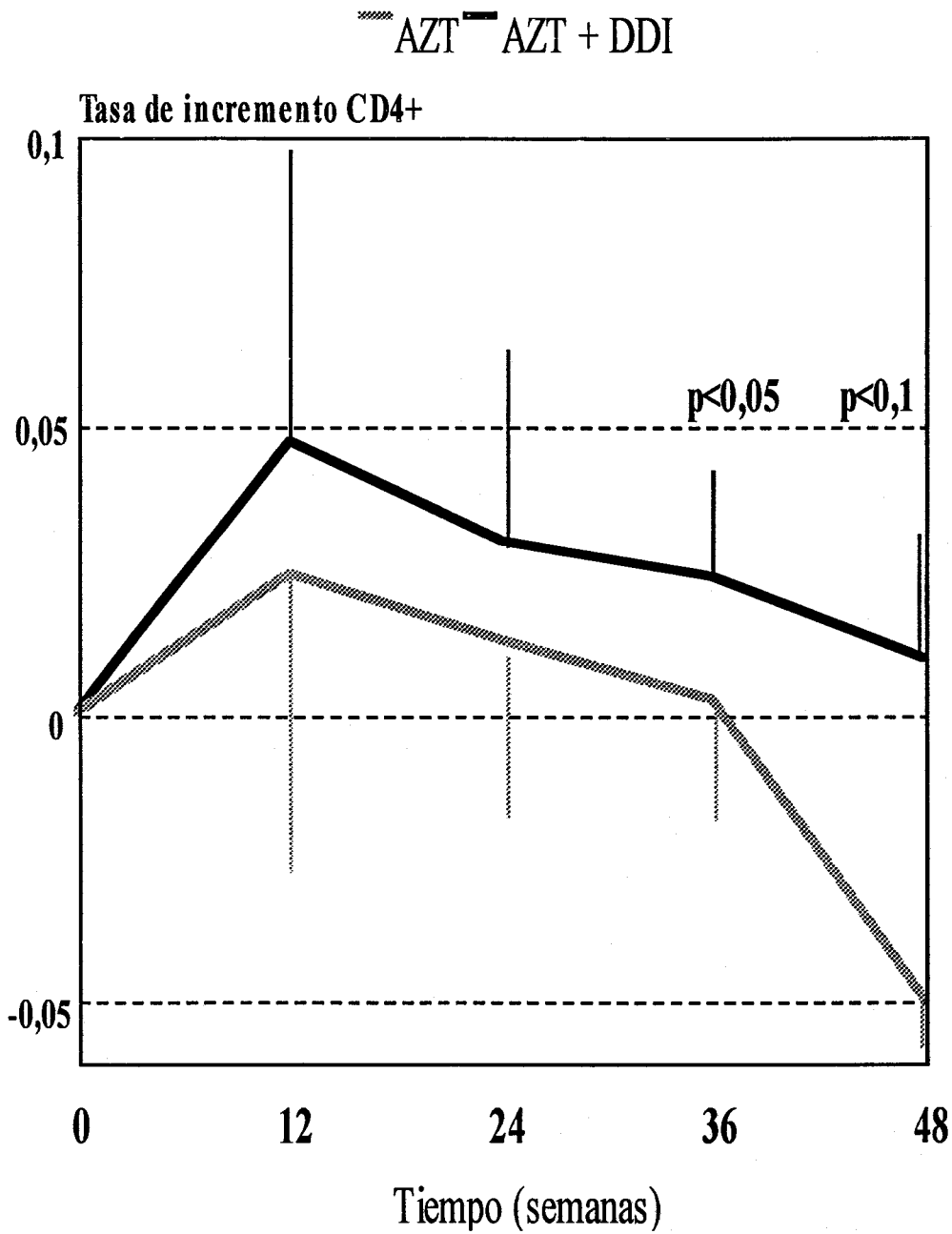


Figura 20: Evolución de la tasa intrínseca de crecimiento de los linfocitos CD4+ en los dos grupos terapéuticos.



Cambios en los parámetros clínicos

Los incrementos de peso con respecto al valor inicial fueron significativos para el grupo tratado con AZT sólo en la semana 12. A partir de este mes el tratamiento no mantiene el peso significativamente más alto que al inicio. Por el contrario, el grupo de terapia combinada mantuvo una diferencia estadísticamente significativa en el peso hasta la semana 48, tabla 9.

Tabla 9: Evolución del peso en los pacientes tratados. NS: No significativo, NA: No aplicable.

Tiempo (semanas)	AZT		AZT + DDI	
	Peso (Media±DS)	Significación	Peso (Media±DS)	Significación
0	64,29±9,08	NA	68,04±14,07	NA
12	66,68±8,15	p<0,01	72,25±14,8	P<0,001
24	65,98±10,17	p<0,1	73,74±15,52	P<0,01
36	64,45±10,17	NS	70,46±13,3	P<0,05
48	65,43±10,39	NS	72,64±11,73	P<0,05

Con respecto a la β 2-microglobulina, se produjo un descenso de su concentración en ambos grupos terapéuticos, pero fue más mantenido en el grupo de terapia con AZT y DDI, tabla 10.

En ninguno de los dos grupos se produjeron progresiones a SIDA, no pudiéndose extraer relaciones entre los cambios de los parámetros virológicos-inmunológicos y la progresión clínica de la enfermedad.

Tabla 10: Evolución de los valores de β 2-microglobulina (β 2-M) a lo largo del seguimiento, en ambos grupos terapéuticos. NA: No aplicable, NS: No significativo.

Tiempo (Meses)	AZT		AZT + DDI	
	β 2-M (Media \pm DS)	Significación	β 2-M (Media \pm DS)	Significación
0	2,38 \pm 0,88	NA	3,27 \pm 0,77	NA
12	2,21 \pm 0,60	p<0,05	2,12 \pm 0,55	P<0,01
24	2,20 \pm 0,53	p<0,05	2,10 \pm 0,42	P<0,001
36	2,23 \pm 0,28	NS	2,45 \pm 0,33	P<0,05
48	2,26 \pm 0,40	NS	2,79 \pm 0,45	NS

Aparición de mutaciones de resistencia al AZT (T215YF) y al DDI (V74L) en el gen de la transcriptasa inversa

En el grupo tratado con AZT, no se detectó la mutación T215Y/F en el momento de iniciar el tratamiento (figura 21). A la semana 24 cuatro pacientes (29 %) desarrollaron virus con esta mutación. Esta tasa de acumulación de la mutación alcanzó hasta el 62% de los pacientes en la semana 48, tabla 11.

Tabla 11: Dinámica de aparición de la mutación T215Y/F en los pacientes tratados con AZT. S: Silvestre, M: Mutante.

Paciente	Semanas de seguimiento				
	0	12	24	36	48
13	S	S	S	S	S
15	S	S	M	M	M
34	S	S	S	S	S
39	S	S	M	M	M
53	S	S	S	S	S
55	S	S	S	S	S
61	S	S	S	S	ND
64	S	S	M	M	M
68	S	S	S	S	S
69	S	S	S	S	ND
76	S	S	M	M	M
84	S	S	S	M	M
89	S	S	S	S	ND
92	S	S	S	M	M
103	S	S	S	M	M
116	S	S	M	M	M

En el grupo tratado con AZT + DDI tres pacientes (19%) presentaban virus con esta mutación en el momento de iniciar el tratamiento, es importante recordar que ninguno de estos pacientes había tomado con anterioridad AZT u otro fármaco antiviral. Durante el resto del seguimiento, el porcentaje de individuos con virus mutantes alcanzó el 100 % en la semana 48. Cuando fue determinada la presencia de virus mutantes, estos se mantuvieron detectables durante el resto del tiempo de observación, tabla 12 y figura 21.

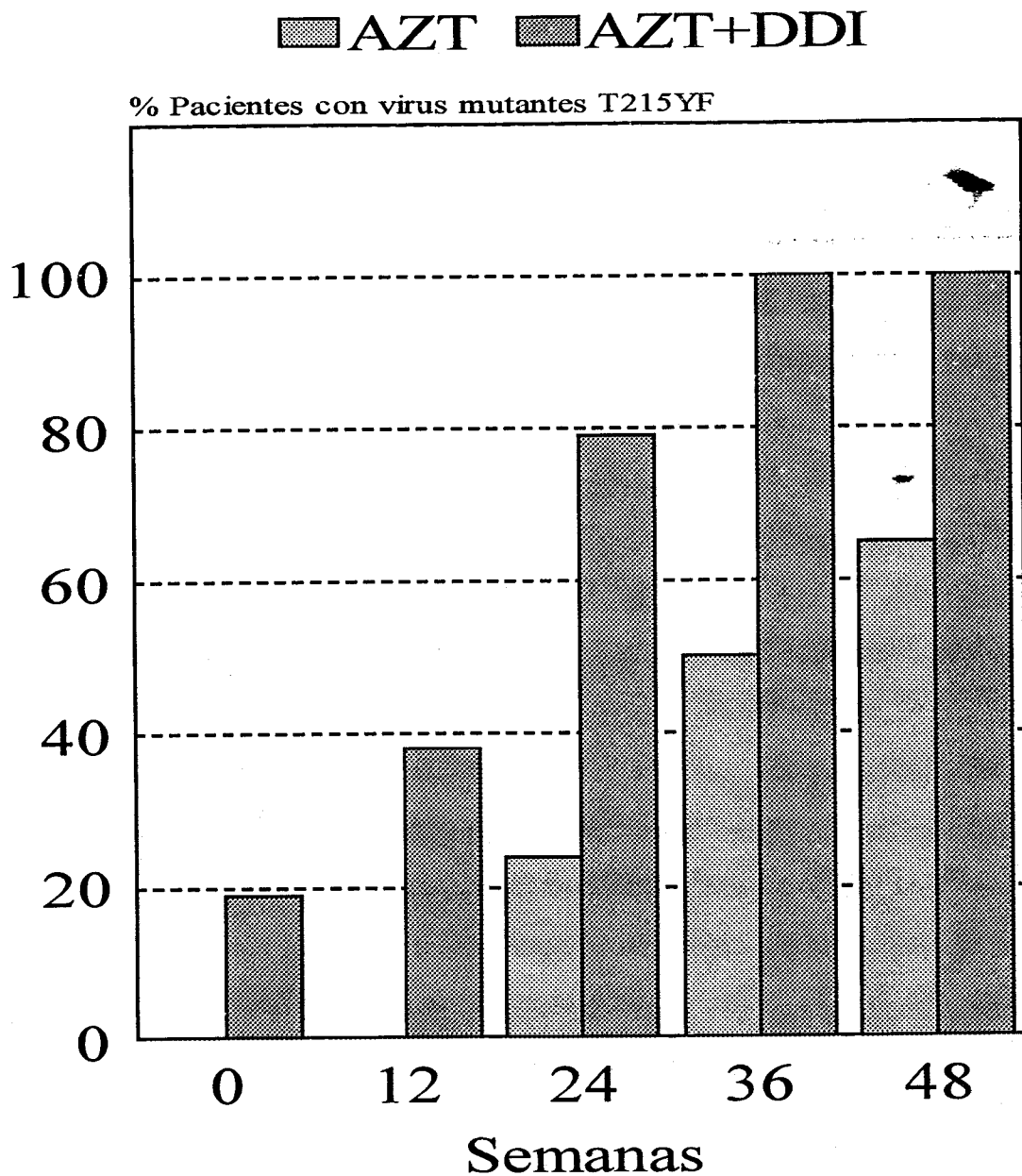
Con respecto a la mutación en el codón 74 (resistencia al DDI) ninguno de los pacientes del grupo de coterapia presentaba virus mutantes en el momento inicial. Durante el resto del tiempo de observación, aparecieron virus mutantes en 4 pacientes (25%). En uno de ellos se detectaron virus mutantes en la semana 12 y desaparecieron en la semana 36, no detectándose con posterioridad. Los otros 3 pacientes desarrollaron virus mutantes en la semana 48. Se dispuso de muestras de estos pacientes en la semana 60 y en todos ellos no se pudieron detectar virus mutantes, produciéndose una reversión hacia el genotipo silvestre, tabla 12.

Tabla 12: Dinámica de aparición de las mutaciones en los codones 215 y 74 de la transcriptasa inversa en el grupo tratado con AZT + DDI.

Paciente	Genotipo en el codón 215					Genotipo en el codón 74					
	Semanas de seguimiento					Semanas de seguimiento					
	0	12	24	36	48	0	12				
44	S	S	M	M	M	S	S	S	S	S	ND
83	S	S	S	M	M	S	S	S	S	S	ND
96	S	M	M	M	M	S	S	S	S	S	ND
100	S	S	S	M	M	S	S	S	S	M	S
113	S	M	M	M	ND	S	S	S	S	ND	ND
121	M	M	M	M	M	S	S	S	S	M	S
124	S	M	M	M	M	S	S	S	S	S	ND
128	S	S	M	M	M	S	S	S	S	M	S
136	M	M	M	M	M	S	S	S	S	S	ND
138	S	S	M	M	M	S	S	S	S	S	ND
144	S	S	M	M	M	S	S	S	S	S	ND
150	M	M	M	M	ND	S	M	M	S	ND	ND
158	S	M	M	M	ND	S	S	S	S	ND	ND
159	S	S	M	M	ND	S	S	S	S	ND	ND
160	S	S	S	S	ND	S	S	S	S	ND	ND
164	S	S	S	ND	ND	S	S	S	ND	ND	ND

M: Virus mutantes, S: Virus silvestres, ND: No determinado.

Figura 21: Dinámica de aparición de la mutación T215Y/F de la transcriptasa inversa en los dos grupos terapéuticos.



Relación entre tasa de incremento de la carga viral y detección de mutación en el codón 215 de la transcriptasa inversa.

Los pacientes sometidos a AZT en los que se detectó la presencia de virus mutantes en la semana 48 de seguimiento presentaban un nivel de tasa de incremento de la carga viral y más elevado y de linfocitos CD4+ más bajos que los pacientes con virus silvestres, aunque no alcanzó significación estadística, tabla 8.

Tabla 13: Evolución de las tasas intrínsecas de crecimiento de la carga viral (r) y de los linfocitos CD4+ en la semana 48 de seguimiento en función del genotipo viral en el codón 215

	Pacientes virus silvestres	Pacientes virus mutantes
r	-0,0120±0,022	-0,0047±0,0210
c	0,0033±0,008	-0,0190±0,0260

En el grupo tratado con coterapia no se pudo realizar tal comparación debido a que en la semana 48 todos los pacientes incluidos en el estudio presentaban virus mutantes. Se analizó el efecto sobre la dinámica de la carga viral de la detección precoz de la mutación en el codón 215. Aquellos pacientes que presentaban esta mutación al inicio, respondieron peor a las doce semanas que el resto, aunque no alcanzó significación estadística debido al bajo número de pacientes (n =3) (-0,45±0,37 en los silvestres frente a -0,23±0,23 de los mutantes).

Discusión

Estos resultados confirman que la terapia con AZT y DDI es más efectiva que la terapia con AZT, ya que produce incrementos más marcados y sostenidos de los linfocitos CD4+ y también hace descender la carga viral más intensamente. Pero esta espectacular respuesta temprana no es mantenida en el tiempo, después de las primeras 24 semanas se observa una tendencia muy clara de todos los parámetros virológicos-inmunológicos hacia los valores iniciales. Otro descubrimiento importante es que la mutación de resistencia al DDI en el codón 74 de la transcriptasa inversa aparece con muy baja frecuencia y de una manera transitoria en los pacientes que recibieron terapia combinada. Este tratamiento no fue capaz de suprimir o retrasar la selección positiva de virus mutantes en el codón 215, resistentes al AZT. Este hecho parece sugerir que mutaciones de resistencia al AZT, en concreto la del codón 215 pudiesen estar implicadas en la coresistencia a AZT y DDI. También es de destacar, que tres pacientes sin tratamiento previo con AZT o ningún otro fármaco antiviral, estuviesen infectados por virus mutantes con un genotipo resistente al AZT. Lo cual hace pensar que el uso habitual del AZT ha hecho aumentar la frecuencia de esta mutación en la población no tratada. Seguramente por infecciones a partir de individuos tratados y portadores de cepas mutantes.

Este estudio no puede determinar si el efecto de la terapia combinada sobre la carga viral y los niveles de linfocitos CD4+ es suficiente para incrementar la supervivencia o retrasar la progresión a SIDA, sin embargo aporta datos relevantes que apoyan un mayor beneficio de la coterapia frente a la monoterapia. Estos hallazgos han sido corroborados por resultados preliminares de un ensayo clínico () que demuestra el mayor beneficio de la terapia combinada.

La explicación biológica de la diferencia en intensidad y duración de la respuesta obtenida con monoterapia frente a terapia combinada incluye varias posibilidades teóricas. La primera es, el posible efecto sinérgico o aditivo, este tipo de drogas no son capaces de bloquear absolutamente la infección de nuevas células, probablemente porque su actividad biológica depende de algunos factores celulares tales como la fosforilación anabólica de los precursores,

que no es homogénea a través de los distintos tejidos diana del virus. Perno et al () y Gao et al () han demostrado que los patrones de activación (paso hasta la forma trifosforilada activa del nucleósido) son diferentes entre los distintos estadios del ciclo celular y de la diferenciación, por ello la actividad de la droga está limitada a ciertos momentos de la maduración celular. El AZT parece ser fosforilado hasta el compuesto activo en linfocitos estimulados, mientras que el DDI tiene mejores propiedades como inhibidor viral en células en reposo. La consecuencia primaria del uso de una terapia combinada es que un mayor rango de tipos celulares será protegido de la infección, esto se traduciría en una represión más intensa de la replicación viral, tal y como se observa en los resultados presentados en este estudio.

Otra posibilidad para explicar los resultados, es que la resistencia a AZT, DDI o a ambas, pudiese desarrollarse más lentamente que con el regimen de terapia combinada. Estudios previos han demostrado que la resistencia al AZT está asociada con la presencia de varias mutaciones en la transcriptasa inversa: M41L, D67N, K70R, T215Y/F ó K219Q/E (). Mientras que la resistencia al DDI está asociada a las mutaciones L74V, V75T ó M184V (). Un punto importante es que la mutación L74V puede restablecer parcialmente la sensibilidad al AZT de virus con genotipo mutante en el codón 215 (). Es decir que ambas mutaciones son antagónicas, siendo más improbable la aparición de virus corresistentes. Este hecho es otro de los argumentos teóricos que con más fuerza avalan el uso de una terapia combinada, ya que el desarrollo de resistencias es el gran problema de fondo de toda la terapéutica antiviral.

Los resultados expuestos responden a estas dos cuestiones, la terapia combinada no bloquea la replicación de virus mutantes en el codón 215, ya que en tres pacientes fueron detectados virus mutantes en el momento inicial y el tratamiento no fue capaz de ejercer una presión selectiva negativa sobre estas cepas, tal y como ocurre cuando pacientes con virus mutantes en 215 son cambiados a monoterapia con DDI (). Es más, durante el seguimiento hasta el 100% de los pacientes seleccionaron virus mutantes para este codón. Cuando son comparados los datos con los pacientes en monoterapia, observamos que la terapia combinada en el mejor de los casos no puede frenar la expansión de los virus mutantes aunque podría incluso favorecerla.

En terapia combinada, la mutación en el codón 74 (resistencia a DDI), aparece con menor frecuencia que en pacientes sometidos a monoterapia con DDI (). El tratamiento combinado ejerce una presión selectiva negativa neta sobre virus mutantes en el codón 74, este hecho había sido previamente observado en un paciente ().

Cuando se detectó la presencia de virus con genotipo mutante en el codón 74, pudieron competir con virus silvestres para ese codón y en los cuatro pacientes donde fueron detectados, desaparecieron en las siguientes semanas de seguimiento. Esta observación revela que la selección de virus mutantes en el codón 74 es parcial. En algún momento de la infección, la selección natural potencia la replicación de esta cepa, alcanzando niveles que la hacen técnicamente detectable, para después ser desplazada por cepas silvestres para ese codón. En estos pacientes estamos asistiendo a una sucesión ecológica de cepas virales que se sustituyen de una manera ordenada en *fitness* y adaptación a un medio fuertemente condicionado por la presencia de dos agentes selectivos, el AZT y el DDI. Las cepas virales con una mutación en el codón 215 presentan una ventaja selectiva sobre aquellas que llevan la mutación en el codón 74, la resistencia a AZT podría dificultar la selección de cepas resistentes a la didanosina. Mayers et al () comunicaron que en pacientes sometidos a terapia combinada de AZT y DDI después de haber fracasado en monoterapia con AZT, se producía un descenso en la sensibilidad a las drogas que era 8 veces mayor para el AZT que para el DDI. La mutación T215Y/F provoca un descenso en la sensibilidad en torno al 16-20 veces, sin embargo con el DDI sólo se observan resistencias de bajo nivel, que llegan a 8 veces con L74V (), 3-5 veces con M184V () y 4-8 veces con K65R (). Como ha sido sugerido por Holodny et al (), la resistencia al AZT puede producir un nivel de resistencia al DDI que es comparable a otras mutaciones de resistencia específicas de esta droga. Este fenómeno no es exclusivo de la combinación AZT-DDI, sino que ha sido observado también con AZT-Nevirapina (), es posible que la mutación T215Y/F confiera una ventaja selectiva, permitiendo el crecimiento en presencia de otros inhibidores de la transcriptasa inversa. Estos datos sugieren que la mutación en el codón 215 pudiese tener un papel destacado en la corresponsabilidad al AZT y DDI.

Una observación muy importante que se desprende de este trabajo es que tres pacientes del grupo de coterapia presentaban virus mutantes resistentes al AZT antes de ser

sometidos a tratamiento. Nunca antes habían recibido AZT ni ningún otro fármaco antviral. Por ello se puede aventurar la hipótesis de que estos pacientes han sido infectados primariamente o reinfectados a partir de individuos en tratamiento con AZT y portadores de virus resistentes. Los pacientes sometidos a terapia combinada iniciaron el tratamiento en 1993 cuando el AZT ya llevaba 5 años usándose en España. Por el contrario, los pacientes del grupo de monoterapia iniciaron el tratamiento en 1989, cuando el uso de esta droga no estaba tan expandido. Este hecho puede explicar que los pacientes de este grupo terapéutico no tuviesen virus mutantes al inicio.

Esta observación es la primera descripción en España de la detección de virus con genotipos mutantes resistentes al AZT en pacientes sin tratamiento. En otros países europeos como Suiza () se han observado varios casos similares, lo que puede significar que estamos presenciando un hecho extendido y de indudable interés clínico, ya que un porcentaje que puede rondar el 20-40% de los pacientes pueden presentar resistencia genotípica a la droga más ámpliamente utilizada en la lucha contra el SIDA. Si se confirmasen estos datos con estudios que englobasen un mayor número de pacientes estaríamos ante una situación que no es nueva en la lucha contra las enfermedades infecciosas, y que obligaría a modificar el uso y el control del AZT. Fundamentalmente mediante la determinación del genotipo viral al inicio del tratamiento y un seguimiento individualizado del paciente infectado por el HIV-1.

Capitulo 5:

Evolucion del gen *pol* del HIV-1 bajo terapia combinada

Dentro de un mismo individuo infectado por HIV-1 coexisten múltiples variantes virales (). El grado de heterogeneidad de la población permite que el virus pueda escapar frente a la presión selectiva impuesta por los anticuerpos neutralizantes o los linfocitos citotóxicos. La variabilidad genética tiene también importancia en la patogénesis () y en la transmisión del virus (). Las fuentes de variabilidad genética están en la maquinaria de replicación del genoma viral que se vale de dos enzimas que carecen de corrección de copia: la transcriptasa inversa y la ARN polimerasa II. Los cambios introducidos en cada ciclo de replicación son sometidos a la selección natural. Estos cambios pueden ser divididos en sinónimos (S) que mantienen el aminoácido codificado por el codón y en no-sinónimos (NS) que cambian el aminoácido. La tasa de sustituciones S es mayor que la de NS en todos los organismos estudiados incluidos los virus más variables como el HIV-1 y el virus de la influenza (). La mayoría de las mutaciones sinónimas son neutrales (excepto aquellas que alteran una región reguladora en cis). Por el contrario, las mutaciones no-sinónimas (NS) están sujetas en su mayoría a selección negativa y sólo algunas de ellas son seleccionadas positivamente. Las mutaciones sinónimas se acumulan en proporción al número de ciclos replicativos y a la tasa de error en la replicación del material genético. La tasa de cambios NS/S, es un marcador de evolución de la proteína y refleja la potencia de la selección en contra o a favor para algunos aminoácidos (). Ya que la mayor limitación en los cambios de aminoácido, determinan una menor tasa de cambio de nucleótidos. No se conoce si el nivel de variabilidad genética en el gen *pol* durante el tratamiento con terapia combinada cambia sustancialmente. Tampoco es conocido si pudiese condicionar la respuesta a largo plazo. En este capítulo se analiza la evolución molecular no sólo desde un punto de vista cualitativo, observando la aparición de mutaciones previamente asociadas a resistencia a fármacos o describiendo cambios potencialmente importantes para la resistencia. Sino que también se analiza de una forma cuantitativa las tasas de divergencia en el gen *pol* después de varios meses de tratamiento. Intentando correlacionar la respuesta a los antivirales en el marco de la evolución de la variabilidad genética.

El uso de varios fármacos en terapia combinada contra el HIV-1 provoca descensos más fuertes de la carga viral que el uso de una sola droga, sin embargo como ha quedado patente en el capítulo anterior el efecto no se mantiene a largo plazo. Tan pronto como a las 24

semanas se observan incrementos de la carga viral y en las siguientes semanas se asiste a un retorno a los valores iniciales. El efecto antiviral es transitorio a pesar de no seleccionarse la mutación más frecuente de resistencia al DDI. Esto puede ser explicado porque la resistencia al AZT conferida por la mutación en el codón 215 produzca resistencia al DDI, tal como ha sido sugerido previamente. Otra explicación es que puedan seleccionarse otras mutaciones distintas que confieran corresponsencia. El objetivo de este capítulo es estudiar la evolución del gen pol de HIV-1 bajo terapia combinada para determinar si son seleccionadas otras mutaciones no descritas o si se reproducen las que han sido observadas en sistemas “in vitro” ().

En este trabajo se asumió que el grado de corresponsencia “in vivo” de las cepas virales aisladas de los pacientes, está correlacionado con la evolución de la carga viral a lo largo del seguimiento. Considerándose que niveles altos de carga viral (mayores de 10.000 unidades de HIV-1 por ml de suero) al final del periodo de seguimiento se corresponden con cepas virales fenotípicamente resistentes in vivo. Para ello 10 pacientes tratados con terapia combinada de AZT y DDI fueron divididos en “respondedores” y “no-respondedores” en función del nivel de carga viral que tenían en el último momento del estudio.

Cuantificación de la carga viral en suero

La carga viral en suero fue determinada para cada paciente en el momento de inicio del tratamiento y cada 12 semanas durante un tiempo total que varió entre 36 y 48 semanas. Los valores absolutos de la carga viral están representados en las figura 23 (pacientes no-respondedores) y figura 24 (pacientes respondedores). Estos últimos no sólo tenían un nivel de carga viral menor de 10.000 copias al final del seguimiento, sino que también en algún momento del periodo de observación presentaron niveles de carga viral técnicamente indetectables. En la figura 22 se representan los valores medios de ambos grupos, es notable destacar que los pacientes no presentaban niveles significativamente distintos de carga viral al inicio, pero tan pronto como las doce semanas de seguimiento, observamos que existen fuertes

diferencias entre ambos grupos de pacientes y estas diferencias se mantienen significativas hasta el final del periodo de observación.

Figura 22: Evolución de la carga viral (Ln) frente al tiempo de seguimiento (semanas) en los pacientes respondedores.

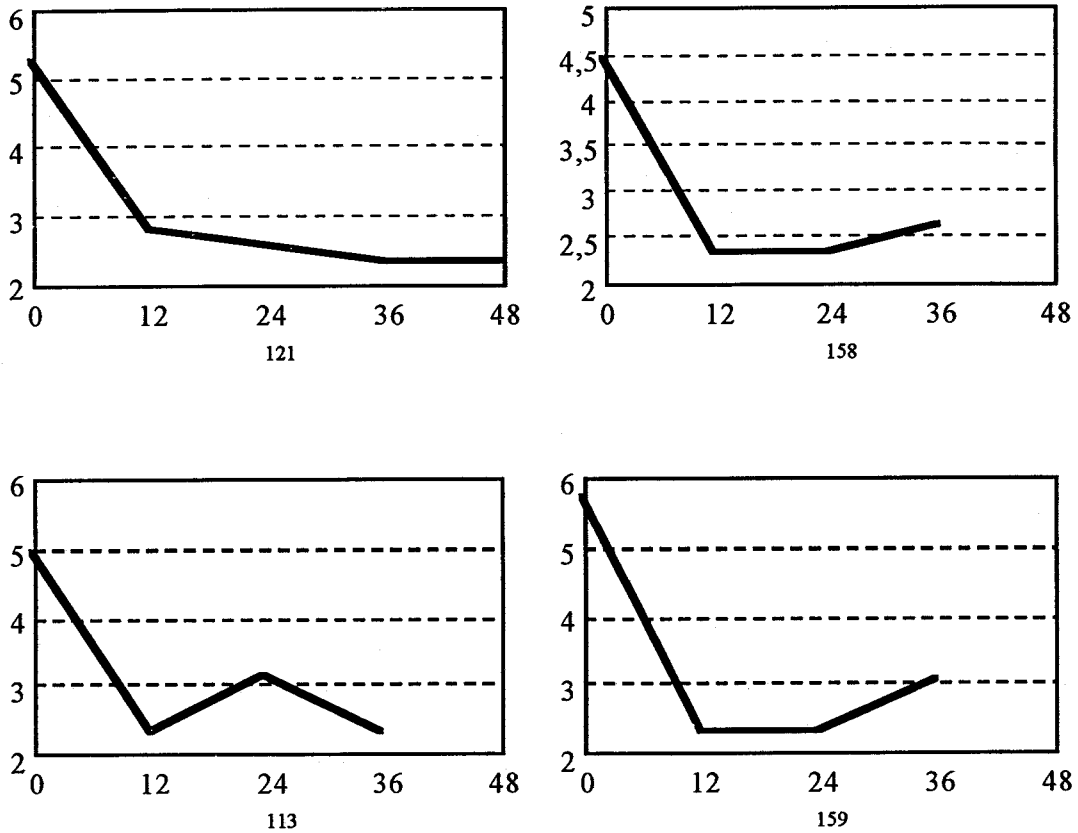


Figura 23: Evolución de la carga viral (Ln) frente al tiempo de seguimiento en semanas en los pacientes no-respondedores.

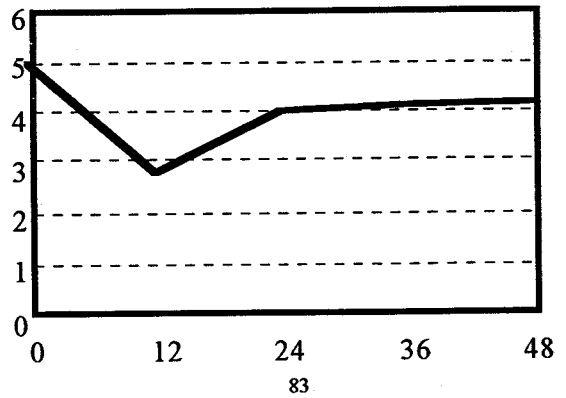
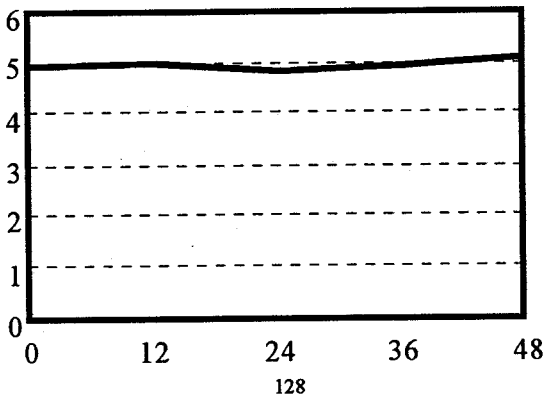
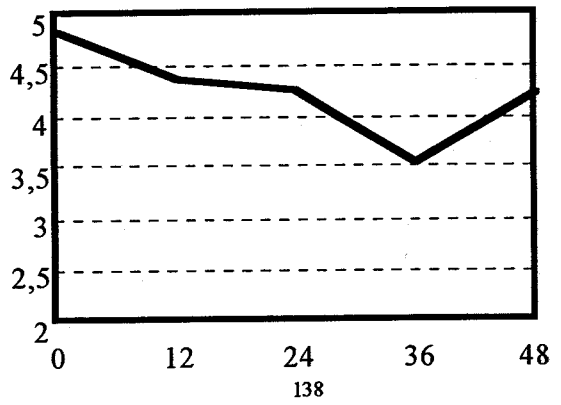
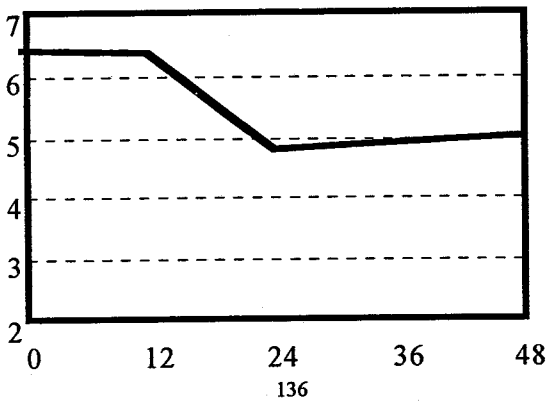
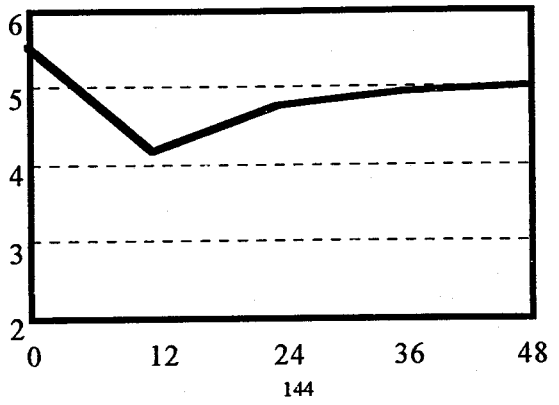
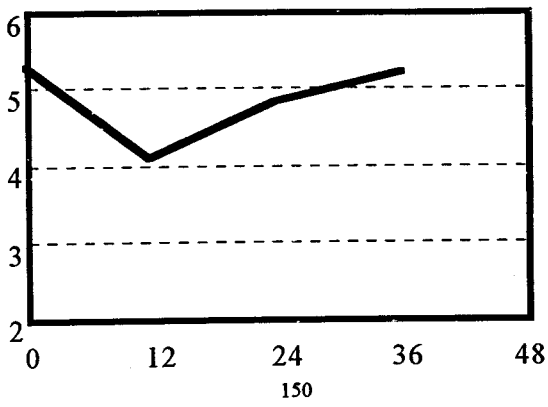
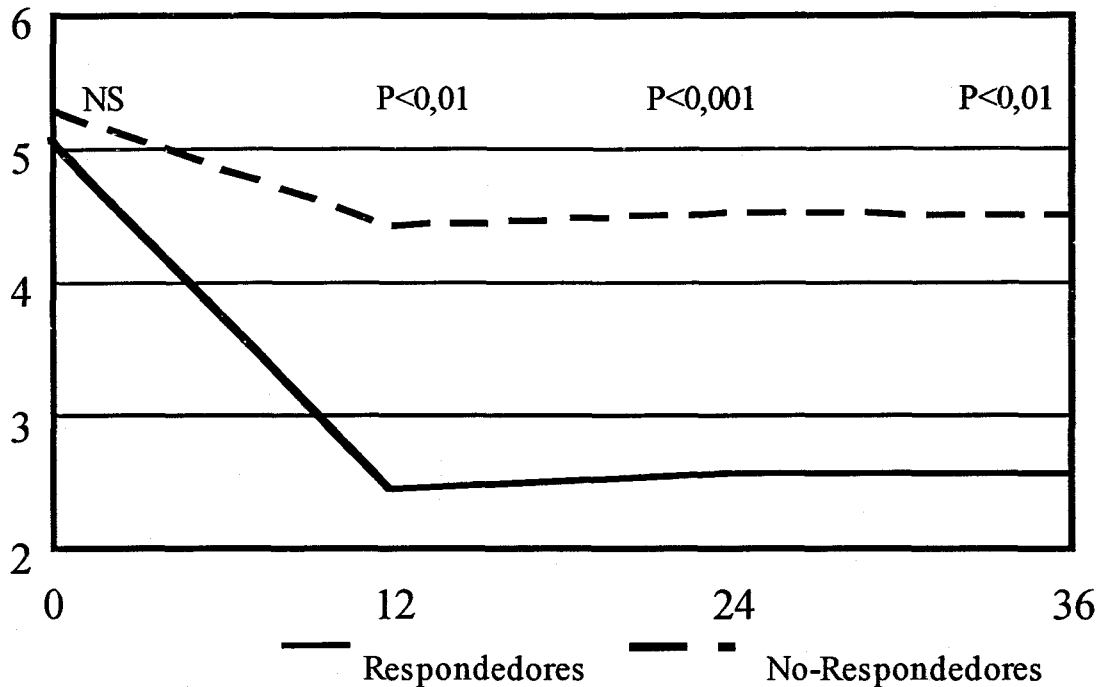


Figura 24: Media de la carga viral (Ln) a lo largo del tiempo (semanas) para los pacientes respondedores y no-respondedores al tratamiento.



Evolución del gen *pol* durante terapia combinada con AZT y DDI

Tal como está indicado en materiales y métodos, ADN procedente de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de los pacientes en tratamiento fue utilizado para amplificar por PCR la zona del gen *pol* de HIV-1 que codifica para el fragmento de la transcriptasa inversa comprendido entre el aminoácido 41 y el 240, zona donde aparecen las mutaciones de resistencia a los fármacos dirigidos contra la transcriptasa inversa. El producto de la amplificación por PCR fue secuenciado directamente sin realizar un paso previo de clonación, con lo cual los resultados de la secuenciación reflejan la secuencia consenso del virus en cada paciente y en cada momento concreto. Bajo estas condiciones es común encontrar indeterminaciones en la secuenciación que se corresponden con codones donde existe variabilidad genética, el umbral de detección de heterocigosidad en la secuenciación es del 20%. En las tablas 14-24 se representan las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de cada paciente.

A tiempo inicial no se observan mutaciones de resistencia al AZT, DDI ó multirresistencia en ningún paciente. Al final del seguimiento todos los pacientes excepto dos presentaban alguna mutación previamente asociada a resistencia al AZT o DDI (figura 23). Cinco pacientes tenían la mutación M41L de resistencia al AZT, aunque en dos de ellos se observó una mezcla de cuasiespecies silvestres y mutantes. En el codón 215 aparecieron dos tipos de mutantes, los previamente descritos de resistencia al AZT (cambio T por Y/F) y una nueva mutación (cambio de T por S). Como se observa en la figura 23, aparecen 5 variantes distintas en esta posición, el codón silvestre (T), el mutante resistente al AZT (Y), el nuevo mutante (S) y mezclas de T/S y S/Y. En ningún caso aparece la mutación T215F.

Es de destacar que el paciente no-responder n° 136 presentó un perfil de mutaciones absolutamente típico de monoterapia con AZT, desarrolló además de las mutaciones M41L, T215Y, la mutación D67N (que junto con las anteriores puede conferir una resistencia al AZT de 180 veces).

Con respecto a mutaciones de resistencia al DDI, tres pacientes presentan un cambio en el codón 65, uno con la mutación K65R (aumento de la resistencia al DDI y DDC de 4 a 10 veces) y dos pacientes con la mutación K65E de significado desconocido. Ninguno desarrolla la mutación L74V, muy importante en monoterapia con DDI. Sólo un paciente presenta una mutación descrita para corresponsencia *in vitro* (F77L) y en ningún caso aparecen otras previamente descritas por varios autores () en modelos “*in vitro*” de multirresistencia en los codones 62, 75, 77, 116 y 151. Finalmente cuatro pacientes 3 no-respondedores y un respondedor desarrollaron virus con una mutación en el codón 226 de cambio de P por L. Esta mutación siempre apareció como una mezcla de cuasiespecies (figura 23).

Relación entre la carga viral, respuesta al tratamiento y evolución molecular

No existe relación entre la carga viral inicial y la probabilidad de mala respuesta clínica, sin embargo si hay una gran asociación entre la respuesta y el efecto antiviral temprano a las 12 semanas (figura 24). Los pacientes respondedores presentaron niveles de carga viral inicial menores que los no respondedores aunque esta diferencia no alcanzó significación estadística ($5,03 \pm 0,5$ versus $5,26 \pm 0,62$). A lo largo del seguimiento, se observa que los pacientes respondedores tuvieron una respuesta inicial muy fuerte (figura 24). Estas diferencias iniciales se mantuvieron a lo largo del resto del seguimiento.

En la tabla 25 se muestra un resumen cuantitativo de los cambios en la secuencia del gen *pol*. La tasa de sustitución de nucleótidos del gen *pol* entre el tiempo inicial y el final está relacionada estadísticamente con la carga viral inicial, los pacientes con mayor carga viral tienen una mayor tasa de cambio que los de menor carga viral (figura 26).

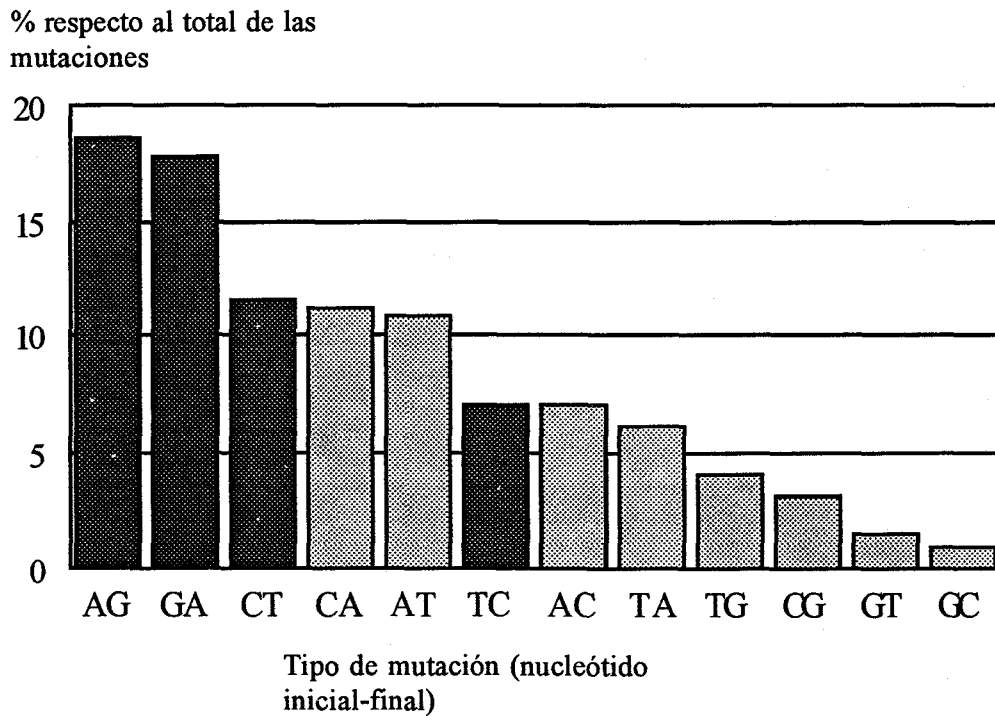
Tabla 25: Resumen de los cambios cuantitativos de secuencia en el gen *pol* antes y después del tratamiento con coterapia.

Paciente	Cambios nucleótidos	% de divergencia	Cambios en aminoácidos	% de divergencia	Mutaciones sinónimas	% mutaciones sinónimas	Mutaciones no-sinónimas	% mutaciones no-sinónimas
83	31	5,1	18	9	13	42	18	58
113	26	4,3	12	6	14	54	12	46
121	21	3,5	15	7,5	6	28	15	72
128	30	5	23	11,5	7	23	23	77
136	42	7	18	9	24	57	18	43
138	31	5,1	16	8	15	48	16	52
144	31	5,1	14	8	16	51	14	49
150	27	4,5	21	10,5	6	22	21	78
158	8	1,3	6	3	2	25	6	75
158	36	6	27	13,5	9	25	27	75

Frecuencia de cambios de nucleótidos y aminoácidos

El análisis de secuencias ha revelado que la aparición de los distintos cambios de nucleótidos no sigue una distribución homogénea, en concreto, se observa que existe una tendencia a acumular las mutaciones de transición A→G ó G→A que ocurren en casi el 40% de los cambios. Otras mutaciones aparecen con una frecuencia menor (figura 24).

Figura 24: Sustituciones de nucleótidos preferidas



El análisis del tipo de sustitución de nucleótido encontrado al final del seguimiento de los pacientes revela una fuerte tendencia hacia mutaciones que cambian el aminoácido codificado por el codón correspondiente. El cálculo de la proporción de mutaciones no-sinónimas (que cambian el aminoácido) comparadas con las mutaciones sinónimas o silenciosas (que mantienen el aminoácido) revelan que de media, el $69,72 \pm 17,11\%$ de ellas son no-sinónimas frente a $30,27 \pm 17,11\%$ de sinónimas.

Con respecto a las diferencias en la evolución molecular del gen *pol* bajo terapia combinada en los pacientes respondedores frente a los pacientes no-respondedores al tratamiento, se observa

que en ninguno de los parámetros utilizados para medir la tasa de cambio de las secuencias se encuentran diferencias significativas entre los dos grupos de pacientes. Aunque los no-respondedores tienen más elevadas todas las tasas de medida de la evolución molecular. La porcentaje de cambio de aminoácidos y nucleótidos en ambos grupos está representado en la tabla 26, donde también se representa el porcentaje de cambios sinónimos y la relación sinónimos/no-sinónimos.

Tabla 26: Cambios en los parámetros de evolución molecular para los pacientes respondedores y no-respondedores. En ninguna de las comparaciones las diferencias alcanzaron significación estadística.

Divergencia aminoácidos	Respondedores	7,5±4,4%
	No-respondedores	9,3±1,4%
Divergencia nucleótidos	Respondedores	3,75±1,95%
	No-respondedores	5,3±0,86%
Porcentaje de cambios sinónimos	Respondedores	33±14,07%
	No-respondedores	40,5±14,76%
Tasa de cambios no-sinónimos/sinónimos	Respondedores	2,3±1,015
	No-respondedores	1,8±1,2

Comparando las tasas de divergencia entre un mismo paciente en dos tiempos distintos con los datos de la bibliografía de las distancias medias entre distintos aislados HIV-1, se observa que la divergencia de nucleótidos del gen pol entre aislados no-zaireños del HIV-1 varía entre el 1,9% y el 4,1% (media del 3,3%), en nuestro caso las tasas de divergencia son del 3,75±1,95% para los pacientes respondedores y del 5,3±0,86 para los no-respondedores. Lo cual es bastante elevado, teniendo en cuenta que se trata del mismo subtipo viral aislado del mismo paciente en dos momentos distintos. Aunque no alcanza los niveles de variabilidad del SIV_{agm} que llega hasta un 26%. Con respecto a la tasa de cambios NS/S encontramos que tanto para HIV-1 no-zaireños (HAN, SF2, MN, LAI, OYI, SC, JRCSE, SF162, RF, WMJ12,

CDC42, BAL2, ALA1, BRVA, JH32, NY5NEW, JFL ADA) como HIV-1 zaireños (ELI, Z2, NDK, MAL, JY1, Z321) están comprendidos entre 0,5 y 0,7. En los aislados analizados en este trabajo las tasas de NS/S se sitúan en un rango situado desde 0,75 hasta 3,5 (media $2,02 \pm 1,13$) considerablemente más elevado y situado en el mismo orden de magnitud que la proteína gp120 completa (), ver figura .

No existen diferencias significativas entre el valor de la tasa de divergencia de nucleótidos ($3,75 \pm 1,95$ en respondedores versus $5,3 \pm 0,86$ en no-respondedores) ó la tasa NS/S ($2,3 \pm 1,05$ versus $1,8 \pm 1,2$ respectivamente).

Discusión

Las fuerzas selectivas que contribuyen a los patrones de variación encontrados en esta porción del gen *pol* durante el tratamiento combinado no están sólo determinadas por la resistencia conferida a los fármacos por los distintos cambios observados. Ya que individuos con muy diferente carga viral al final del seguimiento presentan niveles de evolución de la variabilidad genética similares. Cabe la posibilidad que los patrones de cambio observados en este estudio no se relacionen con la adquisición de resistencia, sino que sean meros productos del azar y de la deriva genética a la que se ve sometido el virus cuando genera una nueva población a partir de unos pocos provirus que escapan a la acción de los antivirales. Otra posible explicación a esta variabilidad es que los virus analizados no sean funcionales y sólo se contempla una población defectiva que se comportaría de manera similar a como lo hacen los pseudogenes. En contra de esta posibilidad está el hecho de que se han estudiado secuencias provirales y que en consecuencia han debido de ser retrotranscritas antes de ser insertadas en los cromosomas de las células hospedadoras. Por ello no tendría sentido que el virus fuera defectivo para la transcriptasa inversa cuando ha logrado sintetizar un provirus.

Las diferencias entre los pacientes no son de carácter cuantitativo sino cualitativo. Los pacientes no-respondedores acumulan virus con mutaciones previamente asociadas a resistencia. Otra diferencia importante estriba en el hecho de que los pacientes no-respondedores tienen una peor respuesta temprana.

Se ha observado que existe una fuerte evolución en el gen *pol* durante terapia combinada con AZT y DDI, los parámetros que miden el nivel de cambio (tasas de divergencia y sustituciones sinónimas frente a no-sinónimas) revelan que existe una gran presión selectiva para el cambio de aminoácidos. Pero los niveles de evolución no están asociados con una peor respuesta al tratamiento, revelando que no existe una relación cuantitativa entre la respuesta y la tasa de evolución molecular.

La tasa de mutaciones que presenta esta porción de la transcriptasa inversa es superior a valores previamente calculados para virus procedentes de distintos orígenes y revela que esta proteína también puede permitir ciertos niveles de cambio de aminoácidos en su secuencia.

Aunque se ha observado que la tasa de aparición de las distintas mutaciones no es homogénea para los cuatro nucleótidos en eucariotas (), el porcentaje de transiciones GA ó AG es alto en torno al 40%. Este fenómeno está asociado con la incorporación errónea por la transcriptasa inversa y ha sido ampliamente documentado para el HIV-1 (). Existen varias razones que explican este fenómeno como la preferencia del enzima a copiar erróneamente G→A ó la deaminación de citosinas metiladas en moléculas integradas (SIV) ().

Tabla 14: Secuencia de nucleótidos y aminoácidos del gen *pol* de virus procedentes del paciente 83 antes del tratamiento.

ATGGAAAAGGAAGGGAAAATTTCAAAAATTGGGCCTGAAAATCCATACAA	50
M E K E G K I S K I G P E N P Y N	17
TACTCCAATATTTGCCATAAAGAAAAAAGACAGTACTAAATGGAGAAAAT	100
T P I F A I K K K D S T K W R K L	34
TAGTAGATTTTCAGAGAACTTAATAAGAAAACCTCAAGAcTTcTGGGAGGTT	150
V D F R E L N K K T Q D F W E V	50
CAATTAGGAATACCACATCCCGCAGGTTTACAAAAGAAGAMATCAGTMAC	200
Q L G I P H P A G L Q K K 1 S 2 T	67
AGTACTGGATGTGGGTSATGCATATTTTcCAGTTCCCTTAGATAAGGACT	250
V L D V G 3 A Y F P V P L D K D F	84
TCAGGAAGTATACTGCATTTACCATACCTAGTGTAACAATGAGACACCA	300
R K Y T A F T I P S V N N E T P	100
GGGATTAGATATCAGTACAATGTGCTTCCACAGGGATGGAAAGGATCACC	350
G I R Y Q Y N V L P Q G W K G S P	117
AGCGATATTCCAAAGTAGCATGACAAAAAtcTYtGAGCCCTTTAGARAAM	400
A I F Q S S M T K I 4 E P F R 5 6	134
AAAAtCCAGACATAGTTATCTATCAATACATGGATKATTTgTTTgtGGtc	450
N P D I V I Y Q Y M D 7 L F V V	150
TCTkgctTAGAAATgGGGCAGCATAGaACAAAAATAGgGGAActGAGACA	500
S 8 L E M G Q H R T K I G E L R Q	167
gCATCTGTTGAGGTGGGGATTTACCACMCCAGACAAAAACATCAGAAGG	550
H L L R W G F T 9 P D K K H Q K E	184
AACCTCCCTTCCTTTGGATGGGTTATGAgCTCCATCCTGATAAATGGACA	600
P P F L W M G Y E L H P D K W T	199

Tabla de codones heterogéneos

Codón	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	AMA	GTM	SAT	TYT	RAA	MAA	KAT	KGC	CAM
Aminoácidos	K T	V	H G	S F	R	Q	D Y	G C	T

Tabla 15: Secuencia de nucleótidos y aminoácidos del gen *pol* de virus procedentes del paciente 83 después de 48 semanas de tratamiento.

ATGGAAAAGGAAGGGAAAAATTTCAAARATTTGGGCCTGAAAATCCATACAA	50
M E K E G K I S I I G P E N P Y N	17
TACTCCAGTATTTGCCATAAAGAAAAAGACAGTACTAAATGGAGAAAAT	100
T P V F A I K K K D S T K W R K L	34
TAGTAGATTTTCAGAGAACTTAATAAGAGAACTCAAGACTTCTGGGAAGTT	150
V D F R E L N K R T Q D F W E V	50
CAATTAGGAATACCACATCCCGCAgGGTTAAAAAGAAAAAGTCAGTAAC	200
Q L G I P H P A G L K K K K S V T	67
AGTACTGGATGTGGGTGATGCATATTTTTTCAGTTCCCTTAGATAAAGACT	250
V L D V G D A Y F S V P L D K D F	84
TCAGGAAGTATACTGCATTTACCATACCTAGTATAAACAATGAGACACCA	300
R K Y T A F T I P S I N N E T P	100
GGGATTAGATATCAGTACAATGTGCTTCCACAGGGATGGAAAGGATCACC	350
G I R Y Q Y N V L P Q G W K G S P	117
AGCAATATTTCCAAAGTAGCATGATAAAGATCTTAGAGCCATCTAGAAAAC	400
A I F Q S S M I K I L E P F R K Q	134
AAAATCCAGACATAGTTATCTATCAATACATGGATGATTTGTATGTAGGA	450
N P D I V I Y Q Y M D D L Y V G	150
TCTGACTTAGAAAATAGGGCAGCATAGAACAAAAATAGAGGAAC TGAGACA	500
S D L E I G Q H R T K I E E L R Q	167
GCATCTGTTGAGGTGGGGATTTACCACACCAGACAAAAACATCAGAAGG	550
H L L R W G F T T P D K K H Q K E	184
AACCTCCMTTCCTTTGGATGGGTTATGARCTCCATCCTGATAAATGGACA	600
P 2 F L W M G Y 3 L H P D K W T	199



Tabla de codones heterogéneos

Codón	1	2	3
	AAR	CCM	GAR
Aminoácidos	K	P	E

Tabla 16: Secuencia de nucleótidos y aminoácidos del gen *pol* de virus procedentes del paciente 113 antes del tratamiento.

ATGGAAAAGGAAGGGAAAATTTCAAAAATTTGGGCCTGAMAATCCATATAA	50
M E K E G K I S K I G P I N P Y N	17
CACTCCAGTATTTGCTATAAAAGAAAAAGACAGCACTAAATGGAGAAAAT	100
T P V F A I K K K D S T K W R K L	34
TAGTAGATTTTCAGAGAACTTTAATAAGAAAACCTCAAGACTTCTGGGAAATT	150
V D F R E L N K K T Q D F W E I	50
CAATTAGGAATACCACATCCCGCAGGATTAAGAAAAAGAAAAATCAGTAAC	200
Q L G I P H P A G L K K K K S V T	67
AGTACTGGATGTGGGTGATGCGTACTTTTCAGTTCCCTTAGATAAAGACT	250
V L D V G D A Y F S V P L D K D F	84
TCAGGAAGTATACTGCATTTACCATACCTAGTATAAACAATGAGACACCA	300
R K Y T A F T I P S I N N E T P	100
GGGATTAGATATCAGTACAaTGTGCTCCCACAGGGATGGAAAGGATCACC	350
G I R Y Q Y N V L P Q G W K G S P	117
AGCAATATTTCCAAAGDAGCATGACAAAAATCTTAGAGCCTTTTAGAAAAC	400
A I F Q 2 S M T K I L E P F R K Q	134
AAAACCCAGACATAGTTATCTATCAAWACATGGATGATTTGTATGTAGGA	450
N P D I V I Y Q 3 M D D L Y V G	150
TCTGACTTAGAAATAGGGCCGCATAGAACAAAAATAGAGAAAWTGAGACA	500
S D L E I G P H R T K I E K 4 R Q	167
ACATCTGTTGAGGTGGGGATTTTACACACCAGACAAAAAACATCAGAAAG	550
H L L R W G F Y T P D K K H Q K E	184
AACCTCCATTTCCTTTGGATGGGTTATGAACTCCATCCTGATAAATGGACA	600
P P F L W M G Y E L H P D K W T	199

Tabla de codones heterogéneos

Codón	1	2	3	4
	AM	GD	WAC	WTG
Aminoácidos	E D	S R	Y Q	M L

Tabla 17: Secuencia de nucleótidos y aminoácidos del gen *pol* de virus procedentes del paciente 113 después de 48 semanas de tratamiento.

CTKGVAAAGGAAGGVAAAAATTTSAAAAAATTGGGCCTGAVAAATCCATATAA	50
1 2 K E 3 K I 4 K I G P 5 N P Y N	17
CACTcCAGTATTTGCTATAAAGAAAAAAGACAGCACTAAATGGAGAAAAT	100
T P V F A I K K K D S T K W R K L	34
TAGTAGATTTTCAGAGAACTTAATAAGAAAACTCAAGACTTcTGGGaaATT	150
V D F R E L N K K T Q D F W E I	50
CAATTAGGAATACCACATCCCGCAGGATTAATAAAAAataaaaaatcattaac	200
Q L G I P H P A G L K N K K S L T	67
attactgaccgtgggtgatgcatatTTTTcagtgcccttagataaagact	250
L L T V G D A Y F S V P L D K D F	84
tcagaaagtatactgcatttaccatacctagtataaacaatgagacaccg	300
R K Y T A F T I P S I N N E T P	100
gggattagatatcagtacaatgtgcttccacagggatggaaggatcacc	350
G I R Y Q Y N V L P Q G W K G S P	117
agcaATATTCATRGTAGcTTGNcMAAAATCTTAGARcCTTTTAGAAAAC	400
A I F H 6 S L 7 K I L 8 P F R K Q	134
AAAACCCGAGACATAGTTATCTATCAAWACATGGATGATTTGTATGTAGGA	450
N P D I V I Y Q 9 M D D L Y V G	150
TCTGACTTAGAAAATAGGGCCGCATAGAACaaAAAATAGAGaAAWtGAGACA	500
S D L E I G P H R T K I E K 10 R Q	167
ACATCTGTTGAGGTGGGGATTTTACACACCAGACAAAAACATCAGAAAG	550
H L L R W G F Y T P D K K H Q K E	184
AACCTCCATTCCTTTGGATGGGTTATGAACTCCATCCTGATAAAATGGACA	600
P P F L W M G Y E L H P D K W T	199

Tabla de codones heterogéneos

Codón	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	CTK	GVA	GGV	TSA	GAV	RGT	NCM	GAR	WAC	WTG
Aminoácidos	L	GAE	G	S	E D	Q	T			M L

Tabla 18: Secuencia de nucleótidos y aminoácidos del gen *pol* de virus procedentes del paciente 121 antes del tratamiento.

ATGGAAAAGGAAGGAMAAATTTTCAMAAATTTGGGCCTGAVAATCCATACAA	50
M E K E G 1 I S 2 I G P 3 N P Y N	17
TACTCCAGTATTTTGCCATAAAGAAAAAGACAGTACTAAATGGAGAAAAT	100
T P V F A I K K K D S T K W R K L	34
TAGTAGATTTTCAGAGAACTTAAATAAGAGAACTCAAGACTTCTGGSAGGTT	150
V D F R E L N K R T Q D F W 4 V	50
CAATTAGGAATACCACATCCCGCAGGCTTAAAAAAGACAAAATCAGTMAC	200
Q L G I P H P A G L K K T K S 5 T	67
AGTACTGGATGTGGGTAAATGCATATTTTCCAGTTCCTTAGATGAAGACT	250
V L D V G N A Y F P V P L D E D F	84
TTAGGAAGTATACTGCATTTTACCATACCTAGTACAAACAATGAGACACCG	300
R K Y T A F T I P S T N N E T P	100
GGGATTAGATATCAGTACAATGTGCTTCCACAGGGATGGAAGGATCACC	350
G I R Y Q Y N V L P Q G W K G S P	117
AGCGATATTTCCAAAGTAGCATGACAAAAATCTTAGAGCCATTTAGAAAAC	400
A I F Q S S M T K I L E P F R K Q	134
AAAATCCAGACATAGTTATCTATCAATACATGGATGATTTTGTATGTAGGA	450
N P D I V I Y Q Y M D D L Y V G	150
TCTGACTTAGAAAATAGAGCAGCATAGAACAAAAATAGAGGAACTAAGACA	500
S D L E I E Q H R T K I E E L R Q	167
ACATCTGTTGAGGTGGGGATTTACCACACCAGACAAAAAACATCAGAAAAG	550
H L L R W G F T T P D K K H Q K E	184
AACCTCCATTCCTTTGGATGGGTTATGAACTCCATCCTGATAAATGGACA	600
P P F L W M G Y E L H P D K W T	199

Tabla de codones heterogéneos

Codón	1	2	3	4	5
	MAA	MAA	GAV	SAG	GTM
Aminoácidos	K Q	K Q	L	Q E	V

Tabla 19: Secuencia de nucleótidos y aminoácidos del gen *pol* de virus procedentes del paciente 121 después de 48 semanas de tratamiento.

ATGGAAGGAAGGAAAAATTTCAAAAATTGGGCCTGAHAATCCATACAA	50
M E K E G K I S K I G P I N P Y N	17
TACTCCAGTATTTGCCATAAAGAAAAAAGACAGTACTAAATGGAGAAAAT	100
T P V F A I K K K D S T K W R K L	34
TAGTAGATTTTCAGAGAACTTAATAAGAGAACTCAAGACTTCTGGGAGGTT	150
V D F R E L N K R T Q D F W E V	50
CAATTAGGAATACCACATCCCGCAGGCTTAAAAAAGAAAAATCAGTAAC	200
Q L G I P H P A G L K K K K S V T	67
AgTACTGGATGTGGGTGATGCatATTTTTCAGTTCCctTAGATGAAGACT	250
V L D V G D A Y F S V P L D E D L	84
TaAGGAaGTATACTGCattaccatacctagtataaacaatgagacaccg	300
R K Y T A F T I P S I N N E T P	100
gggattagatatcagtacaatgtgcttccacagggatggaaaggatcacc	350
G I R Y Q Y N V L P Q G W K G S P	117
agcaatattccaagctagcatgacaAGAATCTTAGAGCCTTTTAGAaAaC	400
A I F Q A S M T R I L E P F R K Q	134
aAAAtCCAGAAataGTTATCTATCAATACATGGATGATTTGTATGTAGGA	450
N P E I V I Y Q Y M D D L Y V G	150
TCTGACTTAGAAATAGGGCAGCATAGAACAAAGATAGAGGAACYGAGACA	500
S D L E I G Q H R T K I E E 2 R Q	167
ACATTTGTTGAGGTGGGGATTTACCACACCAGACAAAAAACATCAGAAAG	550
H L L R W G F T T P D K K H Q K E	184
AaCCTCCATTCTTTGGATGGGTTATGAACTCCATCCTGATAAATGGACA	600
P P F L W M G Y E L H P D K W T	199

Tabla de codones heterogéneos

Codón	1 GAH	2 CYG
Aminoácidos	D E	P L

Tabla 20: Secuencia de nucleótidos y aminoácidos del gen *pol* de virus procedentes del paciente 128 antes del tratamiento.

v	v	v	v	v	
ATGGAAAAGGAAGGGAAAATCTCAAGAATTGGGCCTGAVAAATCCATACAA					50
M E K E G K I S R I G P I N P Y N					17
v	v	v	v	v	
TACTCCAATATTTGCCATAAAGAAAAAAGACAGTACTAAATGGAGAAAAT					100
T P I F A I K K K D S T K W R K L					34
v	v	v	v	v	
TAGTAGATTTTCAGAGAACTTAATAAGAAGACTCAAGACTTCTGGGAAGTT					150
V D F R E L N K K T Q D F W E V					50
v	v	v	v	v	
CAATTAGGAATACCACATCCAGCAGGGTTACAAAAGATAAAAaTCAGTAAC					200
Q L G I P H P A G L Q K I K S V T					67
v	v	v	v	v	
AGTACTGGATGTGGGTGATGCATATTTTTTCAGTTCCCTTAGATAAGGACT					250
V L D V G D A Y F S V P L D K D F					84
v	v	v	v	v	
TCAGGAAGTATACTGCATTTACCATACCTAGTGTAACAATGAGACACCA					300
R K Y T A F T I P S V N N E T P					100
v	v	v	v	v	
GGGATTAGATATCAGTACAATGTGCTTCCACAGGGATGGAAAGGATCACC					350
G I R Y Q Y N V L P Q G W K G S P					117
v	v	v	v	v	
AGCGATATTTCCAAAGTAGCATGACAAAAATCTtaGAGCCATTTWGAAATC					400
A I F Q S S M T K I L E P F 2 N Q					134
v	v	v	v	v	
AAAAYCCAGACATAGTTATCTATCAATACATGGATGATTTGTATGTAGGA					450
3 P D I V I Y Q Y M D D L Y V G					150
v	v	v	v	v	
TCTGMCTTAGAAATAGGGCAGCATAGAACAAAAATAGAGGAACTGAGACA					500
S 4 L E I G Q H R T K I E E L R Q					167
v	v	v	v	v	
ACATCTGTTGAGGTGGGGTTTACCACACCAGACWAAAAACATCAGAAAG					550
H L L R W G F T T P D 5 K H Q K E					184
v	v	v	v	v	
AACCTCCATTCCTTTGGATgGGTTATGAACTCCATCCTGATAAAatgGACA					600
P P F L W M G Y E L H P D K W T					199

Tabla de codones heterogéneos

Codón	1	2	3	4	5
	GAV	WGA	AAY	GMC	WAA
Aminoácidos	D E		N	D A	

Tabla 21: Secuencia de nucleótidos y aminoácidos del gen *pol* de virus procedentes del paciente 128 después de 48 semanas de tratamiento.

v	v	v	v	v		
WTGGMAAAGGAAGGAAAATCTCAGGADTTGGGCCCTGAGAATCCATACAA					50	
1 2 K E G K I S G 3 G P E N P Y N					17	
v	v	v	v	v		
TACTCCAATATTTGCCATAAAGAAAAAAGACAGTACTAAATGGAGAAAAT					100	
T P I F A I K K K D S T K W R K L					34	
v	v	v	v	v		
TAGTAGATTTTCAGAGAACTTAATAAGAAGACTCAAGACTTCTGGGAAGTT					150	
V D F R E L N K K T Q D F W E V					50	
v	v	v	v	v		
CAATTAGGAATACCACATCCAGCAGGGTTACAAAAGAAAAAATCAGTAAC					200	
Q L G I P H P A G L Q K K K S V T					67	
v	v	v	v	v		
AGTACTGGATGTGGGTGATGCATATTTTYCAGTTCCCTTAGATAAAGACT					250	
V L D V G D A Y F 4 V P L D K D F					84	
v	v	v	v	v		
TCAGGGAATaTATGGCATTTCACCATACCTAGTGTAACAATGAGACACCA					300	
R E Y M A F T I P S V N N E T P					100	
v	v	v	v	v		
GGGATTAGATATCAGTACAATGTGCTTCCACAGGGATGGAAAGGATCACC					350	
G I R Y Q Y N V L P Q G W K G S P					117	
v	v	v	v	v		
AGCGATATTCCAAAGTAGCATGACAAAAATCTTAGAGCATTTAAAASATC					400	
A I F Q S S M T K I L E H L K 5 Q					134	
v	v	v	v	v		
AAAABCMAGACATAGTTATCTATCAATACATGGATRAWTTGTATGTAGGA					450	
6 7 D I V I Y Q Y M D 8 L Y V G					150	
v	v	v	v	v		
TCTGACTTAGAAATAGGGMAGCATAGAGCAAAAATAGAGGAACTGAGACA					500	
S D L E I G 9 H R A K I E E L R Q					167	
v	v	v	v	v		
ACATCTGTTGAGGTGGGGT'TTMCACACCAGASDAAANACATCAGAAAG					550	
H L L R W G F 10 T P 11 K 12 H Q K E					184	
v	v	v	v	v		
AACCTCCATTCC'TTGGATGGGTTATGAACTCCATCCTGATAAATGGACA					600	
P P F L W M G Y E L H P D K W T					199	

Tabla de codones heterogéneos

Codón	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	WTG	GMA	DTT	YCA	SAT	AAB	CMA	RAW	MAG	TMC	ASD	NAC
Aminoácidos	M L	E A	VIF	P S	H D	K Q	Q P	D	K Q	S Y		

Tabla 23: Secuencia de nucleótidos y aminoácidos del gen *pol* de virus procedentes del paciente 136 después de 48 semanas de seguimiento.

CTGGAAAAAGATGGMMAAAMTTTCAGAHATTGGGCcTGAAAATCCATATAA	50
L E K D 1 K 1 S 2 I G P E N P Y N	17
TACTCCAGTGTTTGCCATAAAGAAAAAARACAGTACTAAATGGRGAAAAT	100
T P V F A I K K K 3 S T K W 4 K L	34
TAGTAGATTTTCAGAGAACTTAATAAGAGAACTCAAGACTTCTGGGAAGTT	150
V D F R E L N K R T Q D F W E V	50
CAATTAGGAATACCACACCCTGCAGGgTTTRAAAAGAAAAGTCAGTaaC	200
Q L G I P H P A G 5 K K K K S V T	67
AGTCCTAGATGTGGGTGATGCATATTTTTTCAGTTCCCTTAGATGAAGACT	250
V L D V G D A Y F S V P L D E D F	84
TCAGGAAGTATACTGCATTTTACCATACCTAGTACTAACAATGAGACACCA	300
R K Y T A F T I P S T N N E T P	100
GGGATTAGATATCAGTACAaTGTGCTTCCACAGGGATGGAAAGGATCACC	350
G I R Y Q Y N V L P Q G W K G S P	117
AGCGATATTTCCAATGTRGCATGACAAAAATCTTAGAGCC'TTTTAGAAAAC	400
A I F Q C 6 M T K I L E P F R K Q	134
AAAATCCAGAAATAGTTATCTATCAATACATGGATGATTTGTATGTGGGA	450
N P E I V I Y Q Y M D D L Y V G	150
TCTGATTTAGAAATAGGGCAGCATAGAACAAAAATAGAGGAACTGAGAGA	500
S D L E I G Q H R T K I E E L R E	167
GCATCTGTGGAGGTGGGGGTTTTACACACCAGACAAAAGCATCAGAAAG	550
H L W R W G F Y T P D K K H Q K E	184
AACCTCYATTCCCTCTGGATGGGTTATGAACTCCATCCTGATAAATGGACA	600
P 7 F L W M G Y E L H P D K W T	199

Tabla de codones heterogéneos

Codón	1	2	3	4	5	6	7
	GGM	MTT	GAH	RGA	TTR	RGC	CYA
Aminoácidos	G	L I	D E	N D	L	S G	P L

Tabla 24: Secuencia de nucleótidos y aminoácidos del gen *pol* de virus procedentes del paciente 138 antes del tratamiento.

V	V	V	V	V		
ATGGAAAAGGAAGGGAAAAATTTCAAAAAATGGGCCTGAAAAATCGATACAA					50	
M E K E G K I S K I G P E N R Y N					17	
	V	V	V	V	V	
TACTCCAGTATTTGCCATAAAAGAAAAAGACAGTACTAAAATGGAGAAAAT					100	
T P V F A I K K K D S T K W R K L					34	
	V	V	V	V	V	
TAGTAGATTTTGTAGAGAACTTAATAAGAGAACTCAAGACTTCTGGGAAGTT					150	
V D F R E L N K R T Q D F W E V					50	
	V	V	V	V	V	
CAATTAGGAATACCACATCCCGCAGGTtTAAAAAAGAAAAATCAGTAAC					200	
Q L G I P H P A G L K K K K S V T					67	
	V	V	V	V	V	
AGTACTGGATGTGGGTGATGCATATTTTTCAGTTCCCTTAGATAAGGACT					250	
V L D V G D A Y F S V P L D K D F					84	
	V	V	V	V	V	
TCAGGAAGTATACTGCATTTACCATACCTAGTGTAACAATGAGACACCA					300	
R K Y T A F T I P S V N N E T P					100	
	V	V	V	V	V	
GGGATTAGATATCAGTACAATGTGCTTCCACAGGGATGGAAAGGATCACC					350	
G I R Y Q Y N V L P Q G W K G S P					117	
	V	V	V	V	V	
AGCGATATTTCCAAAGTAGCATGACAAAAATCTTAGAGCCATTTAGAAAAC					400	
A I F Q S S M T K I L E P F R K Q					134	
	V	V	V	V	V	
AAAATCCAGACATAGTTATCTATCAATACATGGATGATTTGTATGTAGGA					450	
N P D I V I Y Q Y M D D L Y V G					150	
	V	V	V	V	V	
TCTGACTTAGAAAATAGAGCAGCATAGAACAAAAATAGAGGAACTAAGACA					500	
S D L E I E Q H R T K I E E L R Q					167	
	V	V	V	V	V	
ACATCTGTTGAGGTGGGGATTTACCACACCAGACAAAAACATCAGAAAG					550	
H L L R W G F T T P D K K H Q K E					184	
	V	V	V	V	V	
AACCTCCATTCCTTTGGATGGGTTATGAACTCCATCCTGATAAATGGACA					600	
P P F L W M G Y E L H P D K W T					199	

Tabla 25: Secuencia de nucleótidos y aminoácidos del gen *pol* de virus procedentes del paciente 138 después de 48 semanas de seguimiento.

WTGGVAAAGGAAGGGAAAAATTTTSARAGATTGGGCCTGAAATCCGATAYAA	50
1 2 K E G K I 3 4 I G P E I R 5 N	17
TACTCCAGTATTGGCCATAAAGAAAAAGACAGTACTAAATGGAGAAAAT	100
T P V F A I K K K D S T K W R K L	34
TAGTAGATTTCAGAGAACTTAATAAGAGAACTCAAGAYTTYTGGAAGTT	150
V D F R E L N K R T Q 6 7 W E V	50
CAwTTAGGAATACCACATCCCGcAGGtTTAAAAAagGAAAAGTCAgTCaC	200
8 L G I P H P A G L K K E K S V T	67
AgTTcTGGTTgTGGGTGaTGCATTTTTTTCAGTTCCCTTAGATAAAGAcT	250
V L V V G D A F F S V P L D K D F	84
TcAGGAAGTTTACTDCATTTACCATACCTAGGGTAAACAATGAGACACCA	300
R K F T ? F T I P R V N N E T P	100
GGGATTAGATATCAGTACAATGTGCTTCCACAGGGATGGAAAGGATCACC	350
G I R Y Q Y N V L P Q G W K G S P	117
AGCGATAATCCAAAGTAGCATGACAAARATCTTAGAGCCTTTTAGAAAAC	400
A I F Q S S M T ? I L E P F R K Q	134
AAAATCCAGACATAGTTATCTATCAATACATGGATGATTTGTATGTAGGA	450
N P D I V I Y Q Y M D D L Y V G	150
TCTGACTTAGAAAATAGGRCAGCATAGAACAAAAATAGAGGAACTGAGACA	500
S D L E I ? Q H R T K I E E L R Q	167
ACATCTGTTGAAGTGGGGATTTTCCACACCAGAYAAAAACATCAGAAAG	550
H L L K W G F S T P ? K K H Q K E	184
AACCTCCATTCCTTTGGATGGGKTATGAACTCCATCCTGATAAATGGACA	600
P P F L W M ? Y E L H P D K W T	199

Tabla 26: Secuencia de nucleótidos y aminoácidos del gen *pol* de virus procedentes del paciente 144 antes del tratamiento.

v	v	v	v	v	
ATG	GAAA	AGGA	GGG	AAAA	TTTCAAGAGTTGGGCCTGAAAATCCATACAA
M	E	K	E	G	K I S R V G P E N P Y N
					50
					17
v	v	v	v	v	
TACTCCAGTGT	TTTGCCATAAAG	AAAAAAGACAGTACT	TAAATGGAGAAAAT		
T	P	V	F	A	I K K K D S T K W R K L
					100
					34
v	v	v	v	v	
TAGTAGATTT	CAGAGA	ACTTAATAAGAGAACT	CAAGACTTCTG	GGGAAGTT	
V	D	F	R	E	L N K R T Q D F W E V
					150
					50
v	v	v	v	v	
CAATTAGGAAT	ACCACATCCC	GCAGGTTTAAAAA	AGAAAAGTCAGT	GAC	
Q	L	G	I	P	H P A G L K K K K S V T
					200
					67
v	v	v	v	v	
AGTACTGGATGT	GGGTGATGC	ATATTTTTCAGT	TCCCTTAGATGA	AGACT	
V	L	D	V	G	D A Y F S V P L D E D F
					250
					84
v	v	v	v	v	
TCAGGAAGT	TACTGCATTT	TACCATACCTAGT	ACTAACAATGAG	ACCA	
R	K	Y	T	A	F T I P S T N N E T P
					300
					100
v	v	v	v	v	
GGGATTAGAT	ATCAGTACA	aTGTGCTTCC	CAGGGATGGA	AAGGATCACC	
G	I	R	Y	Q	Y N V L P Q G W K G S P
					350
					117
v	v	v	v	v	
AGCGATAT	TCCAATGTAG	CATGACAAAA	TCTTAGAGCCT	TTT	TAGAAAAC
A	I	F	Q	C	S M T K I L E P F R K 1
					400
					134
v	v	v	v	v	
MAAATCCAGAA	TAGTTATCT	TATCAAWACAT	GGATGATTT	TKTATGTAGGA	
N	P	E	I	V	I Y Q 2 M D D 3 Y V G
					450
					150
v	v	v	v	v	
TCTGATTT	TAGAAATAG	GGCAGCATAG	RACMAAAATAG	AGGAACTGAGACA	
S	D	L	E	I	G Q H 4 5 K I E E L R Q
					500
					167
v	v	v	v	v	
ACATCTGTT	GAGGTGGGG	TTTACCACACC	CAGACAAAAA	CATCAGAAAG	
H	L	L	R	W	G F T T P D K K H Q K E
					550
					184
v	v	v	v	v	
AACCTCCAT	TCCTTTGG	ATGGGTTAT	GAACTCCAT	CCTGATAAAT	GGACA
P	P	F	L	W	M G Y E L H P D K W T
					600
					199

Tabla de codones heterogéneos

Codón	1	2	3	4	5
	CMA	WAC	TTK	AGR	ACM
Aminoácidos	Q P	N Y	F L	R	T

Tabla 27: Secuencia de nucleótidos y aminoácidos del gen *pol* de virus procedentes del paciente 144 después de 48 semanas de tratamiento.

ATGGA M E K E G K I S K L G P E I P Y N	50 17
TACTCCAGTATTTGCCATAAAGAAAAAGACAGTACTAAATGGAGAAAAT T P V F A I K K K D S T K W R K L	100 34
TAGTAGATTTTAGAGAACTTAATAAGAGAACTCAAGACTTCTGGGAAGTT V D F R E L N K R T Q D F W E V	150 50
CAATTAGGAATACCACATCCCGCAGGTTTAAAAAGAAAAaTCAGTAAC Q L G I P H P A G L K R K K S V T	200 67
AGTACTGGATGTGGGTGATGCATATTTTTCAGTTCCTTAGATAAGGcCT V L D V G D A Y F S V P L D K A F	250 84
TCAGGAAGTATACTGCATTTACCATACCTAGTGTAACAATGAGACACCA R K Y T A F T I P S V N N E T P	300 100
GGGATTAGATATCAGTACAATGTGCTTCCACAGGGATGGAAAGGATCACC G I R Y Q Y N V L P Q G W K G S P	350 117
AGCGATATTCCAAAGTAGCATGACAAAAaTCTTAGAGCCATTTAGAAAaC A I F Q S S M T K I L E P F R K Q	400 134
AAAATCCAGACATAGTTATCTATCAATACATGGATGATTTtGTATGTGGGA N P D I V I Y Q Y M D D L Y V G	450 150
TCTGACTTAGAAAATAGAGCAGCATAGAACAAAAATAGAGGAACTAAGACA S D L E I E Q H R T K I E E L R Q	500 167
ACATCTGTTGAGGTGGGGATTTWCCACACCAGACAAAAAACATCAGAAAG H L L R W G F 2 T P D K K H Q K E	550 184
AACCTCHATTTCCTTTGGATGGGTATGAACCCATCCTGATAAATGGACA P 3 F L W M G Y E L H P D K W T	600 199



Tabla de codones heterogéneos

Codón	1	2	3
	AAY	WCC	CHA
Aminoácidos	N	S T	P L

Tabla 28: Secuencia de nucleótidos y aminoácidos del gen *pol* de virus procedentes del paciente 150 antes del tratamiento.

ATGGAAAAGSAAGGAAAAATTTTYAAAAATTGGGCCYGAAAATCCaTACAA	50
M E K 1 G K I 2 K I G 3 E N P Y N	17
TACTCCAGTATTTGCCATAAAGAAAAAGACAGTACTAAATGGAGAAAAT	100
T P V F A I K K K D S T K W R K L	34
TAGTAGATTTTCAGAGAGCTTAATAAGAGAACTCAAGACTTTCGGGAAGTT	150
V D F R E L N K R T Q D F W E V	50
CAATTAGGAATACCACATCCCGCAGGGTTAAAAAAGAAAAAATCAGTAAC	200
Q L G I P H P A G L K K K K S V T	67
AGTACTGGATGTGGGTGATGCATATTTTTTYAGTTCCCTTAGATAAAGACT	250
V L D V G D A Y F 4 V P L D K D F	84
TCCGGAAGTATACTGCATTTACCATACTAGTACAAACAATGAGACACCA	300
R K Y T A F T I P S T N N E T P	100
GGGATTAGATATCAGTACAATGTGCTTCCACAGGGATGGAAAGGATCACC	350
G I R Y Q Y N V L P Q G W K G S P	117
AGCAATATTCCAAAGTAGTATGACAAAAATCTTAGAGCCTTTASAAAAC	400
A I F Q S S M T K I L E P F 5 K Q	134
AAAACCCAGACATAGTTATCTATCAATACATGGATGATTTGTATATASGA	450
N P D I V I Y Q Y M D D L Y I 6	150
TCTGACTTGGAAATTAGGGCAGCATAGAGTAAAAATAGAGGAATTGAGACA	500
S D L E L G Q H R V K I E E L R Q	167
ACATCTGTTGAAATGGGGACTTACCACACCAGATAAAAAACATCAGAAAG	550
H L L K W G L T T P D K K H Q K E	184
AACCTCCATTTCCTTTGGATGGGTTATGAACTCCATCCTGATAAATGGACA	600
P P F L W M G Y E L H P D K W T	199

Tabla de codones heterogéneos

Codón	1	2	3	4	5	6
	SAA	TYA	CCY	TYA	ASA	SGA
Aminoácidos	N Q	L S	P	L S	T R	R G

Tabla 29: Secuencia de nucleótidos y aminoácidos del gen *pol* de virus procedentes del paciente 150 después de 48 semanas de tratamiento.

v	v	v	v	v												
CTG	GAA	AAAG	GA	AAATTT	CAAA	aHTT	G	GC	CTG	AAAT	CCATACAA					
L	E	K	E	G	K	I	S	K	I	G	P	E	N	P	Y	N
																50
																17
	v	v	v	v	v											
TACTCCAGTATTTGCCATAAAGGAAAAAGACAGTACTAAATGGAGAAAAT																100
T	P	V	F	A	I	K	E	K	D	S	T	K	W	R	K	L
																34
	v	v	v	v	v											
TAGTAGATTTTCAGAGAACTTAATAAGAAAAC																150
T	C	A	G	A	C	T	T	C	T	G	G	A	A	G	T	T
V	D	F	R	E	L	N	K	K	T	Q	D	F	W	E	V	50
	v	v	v	v	v											
CAATTAGGAATACCCACATCCAGCAGGGTTAAAAAGAAAAAATCAGTAAC																200
Q	L	G	I	P	H	P	A	G	L	K	K	K	K	S	V	T
																67
	v	v	v	v	v											
AGTACTGGATGTGGGTGATGCATATTTTTTCAGTTCCTTRGAWAAAGATT																250
V	L	D	V	G	D	A	Y	F	S	V	P	2	3	K	D	F
																84
	v	v	v	v	v											
TCAGGAAGTATACTGCATTTACCATACCTAGTTTAAACAATGAGACACCA																300
R	K	Y	T	A	F	T	I	P	S	L	N	N	E	T	P	100
	v	v	v	v	v											
GGGWTTAGATATCAGTACAATGTGCTTCCMCAGGGATGGAAAGGRTCCCC																350
G	4	R	Y	Q	Y	N	V	L	5	Q	G	W	K	6	S	7
																117
	v	v	v	v	v											
MCGGATATTTCCAAAGTAGCATGACAAAAATCYTAGAGCCCGTTAGAAAAC																400
A	I	F	Q	S	S	M	T	K	I	8	E	P	V	R	K	Q
																134
	v	v	v	v	v											
AAAATCCAGACATAGTTATCTATCAATACATGGATGATTTGTATGTAGGA																450
N	P	D	I	V	I	Y	Q	Y	M	D	D	L	Y	V	G	150
	v	v	v	v	v											
TCTGACTTAGAAAATAGGGCAGCATAGAACAAAAATAGAGGAACTGAGASA																500
S	D	L	E	I	G	Q	H	R	T	K	I	E	E	L	R	9
																167
	v	v	v	v	v											
ACACCTGTTGARGTGGGGATTTACCACACCAGACAAAAACATCAGAAAG																550
H	L	L	10	W	G	F	T	T	P	D	K	K	H	Q	K	E
																184
	v	v	v	v	v											
AACCTCYATTCCTTTGGATGGGTATGAAC																600
A	C	C	T	C	T	C	T	T	G	G	A	T	G	A	A	A
P	11	F	L	W	M	G	Y	E	L	H	P	D	K	W	T	199

Tabla de codones heterogéneos

Codón	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
	HTT	TTR	GAW	WTT	CCM	GGR	CCM	YTA	SAA	ARG	CYA
Aminoácidos	FLI	L	E D	Y F	P	G	P	L	N Q	K R	P L

Tabla 30: Secuencia de nucleótidos y aminoácidos del gen *pol* de virus procedentes del paciente 158 antes del tratamiento.

v	v	v	v	v	
ATGGAAAAGGAAGGGAAAAATTTCAAAAAATGGGCCTGAAAAATCATTACAA					50
M E K E G K I S K I G P E N P Y N					17
v	v	v	v	v	
TACTCCAGTATTTGCCATAAAGAGAAAAGACAGTACTAAATGGAGAAAAT					100
T P V F A I K R K D S T K W R K L					34
v	v	v	v	v	
TAGTAGAWTTTGTAGAGAACTTAATAAGAGAACTCAAGACTTCTGGGAAGTT					150
V 1 F R E L N K R T Q D F W E V					50
v	v	v	v	v	
CAATTAGGAATACCACATCCCGCAGGTTTAAAAAAGAAAAAATCAGTAAC					200
Q L G I P H P A G L K K K K S V T					67
v	v	v	v	v	
AGTACTGGATGTGGGTGATGCATATTTTTTCAGTTCCCTTAGATAAGGACT					250
V L D V G D A Y F S V P L D K D F					84
v	v	v	v	v	
TCAGGAAGTATACTGCATTTACCATACCTAGTACAAACAATGAGACACCA					300
R K Y T A F T I P S T N N E T P					100
v	v	v	v	v	
GGGATTAGATATCAGTACAATGTGCTTCCACAGGGATGGAAGGATCACC					350
G I R Y Q Y N V L P Q G W K G S P					117
v	v	v	v	v	
AGCGATATCCAAAGTAGCATGACAAAAATCTTAGAGCCATTTAGAAAAG					400
A I F Q S S M T K I L E P F R K D					134
v	v	v	v	v	
ACAATCCAGACATAGTTATCTAYCAATACATGGATGATTTGTATGTAGGA					450
N P D I V I Y Q Y M D D L Y V G					150
v	v	v	v	v	
TCTGACTTAGAAATAGGGCAGCATAGRACAAAAATAGAGGAACTAAGACA					500
S D L E I G Q H R T K I E E L R Q					167
v	v	v	v	v	
ACATCTGTTGAGGTGGGGATTTACCACACCAGACAAAAACATCAGAAAG					550
H L L R W G F T T P D K K H Q K E					184
v	v	v	v	v	
AACCTCCATTCCTTTGGATGGGTTATGAACTCCATCCTGATAAATGGACA					600
P P F L W M G Y E L H P D K W T					199

Tabla de codones heterogéneos

Codón	1 GAW
Aminoácidos	E D

Tabla 31: Secuencia de nucleótidos y aminoácidos del gen *pol* de virus procedentes del paciente 158 después de 36 semanas de seguimiento.

ATGGAAAAGGAAGGAAAAATTTCAAAAAATTCGGCCTGAAAATCATTACAA	50
M E K E G K I S K I G P E N H Y N	17
TACTCCAGTATTTGCCATAAAGAAAAAGACAGTACTAAATGGAGAAAAT	100
T P V F A I K K K D S T K W R K L	34
TAGTAGATTTTAPAGAACTTAATAAGAGAACTCAAGACTTCTGGGAAGTT	150
V D F R E L N K R T Q D F W E V	50
CAATTAGGAATACCACATCCCGCAGGTtTAAAAAAGAAAAATCAGTAAC	200
Q L G I P H P A G L K K K K S V T	67
AGTACTGGATGTGGGTGATGCATATTTTTTTCAGTTCCCTTAGATAAGGACT	250
V L D V G D A Y F S V P L D K D F	84
TCAGGAAGTATACTGCATTTTACCATACCTAGTACAAACAATGAGACACCA	300
R K Y T A F T I P S T N N E T P	100
GGGATTAGATATCAGTACAATGTGCTTCCACAGGGATGYAAAGGATCNCC	350
G I R Y Q Y N V L P Q G 1 K G 2 P	117
AGCGATATTTCCAAAGTAGCATGACAAAAATCTTAGAGCCATTTAGAAAAA	400
A I F Q S S M T K I L E P F R K N	134
ACAATCCAGACATAGTTTATCTAYCAATACATGGATGATTTGTATGTAGGA	450
N P D I V I 3 Q Y M D D L Y V G	150
TCTGACTTAGAAAATAGGGCAGCATAGAGCAAAAAATAGAGGAACTAAGACA	500
S D L E I G Q H R A K I E E L R Q	167
ACATCTGTGAGGTGGGGATTTACCACACCAGACAAAAACATCAGAAAAG	550
H L L R W G F T T P D K K H Q K E	184
AACCTCCATTACTTTGGATGGGTATGAACTCCATCCTGATAAATGGACA	600
P P L L W M G Y E L H P D K W T	199

Tabla de codones heterogéneos

Codón	1	2	3
	TGY	TCN	TAY
Aminoácidos	C	S	Y

Tabla 32: Secuencia de nucleótidos y aminoácidos del gen *pol* de virus procedentes del paciente 159 antes del tratamiento.

v	v	v	v	v	v								
ATGGAAAAGGAAGGGAAAATTTCAAAAATTGGGCCTGAVAATCCATACAA													50
M E K E G K I S K I G P 1 N P Y N													17
v	v	v	v	v	v								
TACTCCAGTATTTGCCATAAAGAAAAAGACAGTACTAAATGGAGAAAAT													100
T P V F A I K K K D S T K W R K L													34
v	v	v	v	v	v								
TAGTAGATTTTCAGAGAACTTAATAAGAGAACTCAAGACTTCTGGGAGGTT													150
V D F R E L N K R T Q D F W E V													50
v	v	v	v	v	v								
CAATTAGGAATACCACATCCAGCAGGGTTAAAAAAGRAAAAaTCAGTMCC													200
Q L G I P H P A G L K K 2 K S 3 P													67
v	v	v	v	v	v								
AGTACTGGTTGTGGGgtgtGTCWTWTTTTCCAGTYCCCTTAGATAAGGACT													250
V L V V G V 4 5 F P 6 P L D K D F													84
v	v	v	v	v	v								
TCAGGAAGTATACTGCATTTACCATACCTAGTGTAACAATGAGACACCA													300
R K Y T A F T I P S V N N E T P													100
v	v	v	v	v	v								
GGGATTAGATATCAGTACAATGTGCTTCCACAGGGATGGACGGGATCaAC													350
G I R Y Q Y N V L P Q G W T G S T													117
v	v	v	v	v	v								
AGCGMTATTCCMAAGTAGCATGACCAAAATCTTAGAGCCTTTTAGAAMAC													400
A 7 F 8 S S M T K I L E P F R 9 Q													134
v	v	v	v	v	v								
AAAATCCAGACATAGTTATCTATCAATACATGGATGA ^t TTGTATGTAGGA													450
N P D I V I Y Q Y M D D L Y V G													150
v	v	v	v	v	v								
TCTGACTTAGAAATAGGGCAGCATAGMACMAAATAGAGGAGCTGAGACA													500
S D L E I G Q H 10 T 11 I E E L R Q													167
v	v	v	v	v	v								
ACATCTGTTGARGTGGGGATTTACCACACCAGACAAAAACATCAGAAAG													550
H L L 12 W G F T T P D K K H Q K E													184
v	v	v	v	v	v								
AACCTCCATTCTTTGGATGGGTATGAACTCCATCCTGATAAATGGACA													600
P P F L W M G Y E L H P D K W T													199

Tabla de codones heterogéneos

Codón	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	GAV	RAA	GTM	GCW	TWT	GTY	MTA	CMA	AMA	AGM	MAA	ARG
Aminoácidos	E D	K E	V	A	Y F	V	Y L	Q P	K T	S R	K Q	R K

Antonio J. Caruz Arcos
Evolución normal de la infección por el
VIH-1 y sus modificaciones por el tratamiento
antiviral.

Apto cum laude

17 octubre 97

Trina Rodríguez

Adrián

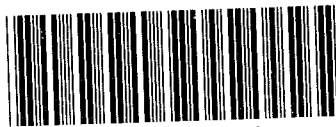
Ar.

[Signature]

[Signature]



UNIVERSIDAD DE SEVILLA



600672020